

DM

Detecção de Bactérias no ar em Ambiente Hospitalar  
com Recurso a Técnicas Moleculares

Roberto Alexandre Pisa Camacho

## Detecção de Bactérias no ar em Ambiente Hospitalar com Recurso a Técnicas Moleculares

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Roberto Alexandre Pisa Camacho

MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

A Nossa  
Universidade

Colégio dos Jesuítas  
Rua dos Ferreiros • 9000-082, Funchal

Tel: +351 291 209400  
Fax: +351 291 209410  
Email: [gabinetedareitoria@uma.pt](mailto:gabinetedareitoria@uma.pt)



  
UNIVERSIDADE da MADEIRA  
*A Nossa Universidade*  
[www.uma.pt](http://www.uma.pt)

Dezembro | 2010



**Centro de Competências de Ciências da Vida  
Mestrado em Biodiversidade e Conservação**

**Tese de Mestrado**

# **Detecção de bactérias no ar em ambiente hospitalar com recurso a técnicas moleculares**

**Tese submetida na Universidade da Madeira para obtenção de grau de  
Mestre em Biodiversidade e Conservação**

**Autor: Roberto Alexandre Pisa Camacho  
(Licenciado em Biologia – Ramo Científico pela Universidade da Madeira)**

**Orientação científica: Prof. Dr. Mahnaz Khadem  
(Centro de Competências de Ciências da Vida da Universidade da Madeira)**

**Funchal, Dezembro de 2010**



**Os melhores RUMOS para os Cidadãos da Região**



**REGIÃO AUTÓNOMA DA  
MADEIRA**



**REPÚBLICA PORTUGUESA**



**UNIÃO EUROPEIA**

**FSE**

# Detecção de bactérias no ar em ambiente hospitalar com recurso a técnicas moleculares

## FICHA CATALOGRÁFICA

Camacho, Roberto Alexandre Pisa

Detecção de bactérias no ar em ambiente hospitalar com recurso a técnicas moleculares. 205 pp.

Bioaerossóis, Ambiente hospitalar, Identificação bacteriana, Sequenciação.

Dissertação de Mestrado – Universidade da Madeira – Programa de Mestrado em Biodiversidade e Conservação

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Camacho, RAP (2010). Detecção de bactérias no ar em ambiente hospitalar com recurso a técnicas moleculares. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Conservação), Universidade da Madeira, Portugal, 205 pp.

## NORMALIZAÇÃO ADOPTADA

Regulamento específico do 2º Ciclo em Biodiversidade e Conservação da Universidade da Madeira

Referências bibliográficas – adaptado de *American Psychological Association (APA)*

Abreviaturas dos jornais referenciados – concordante com *Index Medicus - abbreviations of journal titles*

Dedico este trabalho à minha esposa Irene,  
por toda a ajuda e companheirismo.

## RESUMO

A Qualidade do Ar Interior (QAI) revela-se de grande importância no ambiente hospitalar devido à disseminação aérea de bactérias potenciar as infecções nosocomiais. Os estudos nesta temática são raros em Portugal e inexistentes na Madeira.

Este trabalho tem como objectivos identificar com elevada precisão a flora bacteriana aerossolizada no Hospital Dr. João de Almada (HJA) utilizando técnicas moleculares, determinar a sua origem, disseminação e especificidades e analisar globalmente a QAI.

O ar exterior e de 15 locais no interior do HJA foi amostrado em Abril de 2009. Foram medidas a temperatura, humidade e concentração de CO<sub>2</sub> e NO<sub>2</sub> e quantificadas as bactérias e fungos no ar. Utilizaram-se testes bioquímicos e técnicas moleculares para caracterização e identificação de bactérias e foram comparadas comunidades bacterianas.

A biodiversidade bacteriana no ar interior do HJA é dominada pelo género *Staphylococcus* (68%), sendo as espécies mais frequentes *S. cohnii urealyticus*, *S. haemolyticus*, *S. capitis* ou *S. caprae* e *Micrococcus luteus*. A maioria das espécies encontradas é comum em ambiente hospitalar e na flora comensal humana. As *Staphylococcus spp.* detectadas são consideradas patogénicas oportunistas envolvidas em infecções nosocomiais.

A QAI é conforme com a legislação na maioria dos locais, havendo microorganismos em excesso em 12 das 72 amostras. O excesso de fungos relacionou-se com eventos de bruma no exterior e o excesso de bactérias correlacionou-se com a actividade humana e foi potenciado pela fraca ventilação e a presença ou manipulação de materiais contaminados. O ar exterior tem boa qualidade para ventilação do HJA, excepto durante eventos de bruma. As comunidades bacterianas aerossolizadas têm maior similaridade entre locais do mesmo tipo, sendo os ocupantes o principal foco de contaminação.

São propostas medidas correctivas como o aumento da ventilação dos locais com elevada actividade humana e cuidados na manipulação de roupa suja e resíduos.

Palavras-chave: Bioaerossóis, Ambiente hospitalar, Identificação bacteriana, Sequenciação.

## ABSTRACT

Indoor Air Quality (IAQ) is markedly of high importance in hospital environment due to aerosolized bacterial dissemination which potentiates nosocomial infections. Studies on this field are rare in Portugal and nonexistent in Madeira.

The objectives of this study are to accurately identify the airborne bacterial flora in Dr. João de Almada Hospital (HJA) using molecular techniques, to determine their origin, dissemination and specificities, and to globally assess the IAQ.

The air from 15 locations within the HJA and the outdoor was sampled in April 2009. Temperature, relative humidity and CO<sub>2</sub> and NO<sub>2</sub> concentrations were measured and airborne bacteria and fungi were enumerated. Biochemical tests and molecular techniques were employed to characterize and identify bacterial samples, and bacterial communities were compared.

Indoor airborne bacterial biodiversity is mostly comprised by *Staphylococcus* (68%) and the most frequent species are *S. cohnii urealyticus*, *S. haemolyticus*, *S. capitis* or *S. caprae* and *Micrococcus luteus*. The majority of the detected species are common in hospitals and in the human commensal flora. The detected *Staphylococcus spp.* are considered opportunistic pathogens associated to nosocomial infections.

The IAQ is acceptable in most places and an excess of airborne microorganisms was recorded in 17% of the samples. The fungi excess was associated with African dust events (clouds of desert dust) and bacteria excess was correlated with human activity and was potentiated by poor ventilation and the presence or manipulation of contaminated materials. The outdoor air is of good quality for indoor ventilation, except during African dust events. The airborne bacterial communities have higher similarity between similar type of places and the occupants are the air's main contamination source.

The proposed corrective measures are the ventilation increase in places with high human activity and careful manipulation of dirty clothes and residues.

Keywords: Bioaerossol, Hospital environment, Bacterial identification, Sequencing.

## AGRADECIMENTOS

O presente estudo tornou-se possível graças à colaboração de várias pessoas e entidades, sem as quais não seria possível realizar com sucesso este trabalho. Passo a enunciar:

Um agradecimento especial à Professora Doutora Mahnaz Khadem pela orientação científica desta tese, pelas sugestões e apoio no decorrer deste trabalho e principalmente por me ter inculcido o gosto pela área da genética.

Um agradecimento muito especial à Professora Doutora Irene Câmara por ser a minha fonte de inspiração na realização do mestrado e particularmente nesta tese, numa área de tanto interesse e importância para a saúde pública. Agradeço imenso a força e apoio a todos os níveis no decurso deste trabalho. Este trabalho só foi possível devido à sua cooperação ao facultar os aparelhos de monitorização do ar, consumíveis e apoio burocrático.

Agradeço ao CITMA - Centro de Ciência e Tecnologia da Madeira pela Bolsa de Mestrado concedida para a realização do Mestrado.

Agradeço ao Centro de Estudos da Macaronésia da Universidade da Madeira por facultar a utilização do Laboratório de Biotecnologia para a realização dos trabalhos laboratoriais desta tese.

Agradeço ao Conselho de Administração da SESARAM – Serviço de Saúde da Região Autónoma da Madeira pela disponibilização do acesso ao Hospital Dr. João de Almada para a realização das amostragens do ar e utilização dos dados nesta tese de mestrado.

Agradeço à direcção do Hospital Dr. João de Almada (HJA), especialmente à Directora Dr.ª Isabel Freitas e Enfermeiro chefe Dr. Franco pela disponibilidade e amabilidade com que me receberam para a elaboração deste trabalho, bem como aos funcionários que colaboraram na realização do mesmo.

Agradeço aos docentes do Centro de Competências de Ciências da Vida pelos conhecimentos transmitidos e por me incultirem o gosto pela Biologia, com relevância particular aos docentes que ensinaram as análises estatísticas utilizadas nesta tese.

Agradeço à Dr.ª Cristiana França pelas sugestões e ajuda na pesquisa bibliográfica.

Agradeço à Dr.ª Margarida Fernandes pelas sugestões e ajuda nos testes bioquímicos.

Em último e não menos importante lugar, agradeço aos colegas, família e amigos que sempre me apoiaram no decorrer do mestrado.

## ÍNDICE GERAL

Índice de Tabelas.....	x
Índice de Figuras .....	xii
Lista de abreviaturas e acrónimos .....	xiii
1 - Nota introdutória .....	1
1.1 – Objectivos do trabalho .....	2
1.1.1 - Objectivo geral .....	2
1.1.2 - Objectivos Específicos .....	2
2 – Revisão bibliográfica.....	3
2.1 - Aspectos gerais sobre a qualidade do ar em ambiente hospitalar .....	3
2.1.1 - Qualidade do ar interior.....	3
2.1.2 - O Ambiente hospitalar .....	3
2.1.2.1 - Os bioaerossóis como poluentes do ar interior.....	3
2.1.2.2 - Particularidades dos bioaerossóis bacterianos.....	4
2.1.2.2.1 - Definição e origem .....	4
2.1.2.2.2 – Mecanismos de defesa às condições ambientais.....	4
2.1.2.2.3 - Factores que influenciam os bioaerossóis .....	5
2.1.2.2.4 - Implicação dos bioaerossóis nas infecções nosocomiais.....	5
2.1.2.2.5 – Microorganismos representados no ambiente hospitalar.....	6
2.1.3 – Legislação relacionada com a qualidade do ar interior.....	9
2.2 - A monitorização ambiental aliada à vigilância epidemiológica .....	12
2.2.1 - Metodologias de colheita microbiológica do ar interior.....	13
2.2.2 – Metodologias clássicas de identificação de bactérias.....	15
2.2.3 - Metodologias moleculares de identificação de bactérias .....	18
2.2.3.1 - A sequenciação do gene 16S rRNA .....	21
2.2.3.2 – Identificação por sequenciação do gene 16S rRNA.....	24
2.2.3.3 - Vantagens da sequenciação do gene 16S rRNA.....	27
2.2.3.4 - Desvantagens da sequenciação do gene 16S rRNA .....	29
3 – Materiais e métodos .....	32
3.1 – Caracterização do local de estudo .....	32
3.1 - Planeamento das amostragens.....	33
3.2 – Realização das amostragens.....	35
3.2.1 - Material utilizado nas amostragens.....	35
3.2.1 – Procedimentos nas amostragens .....	35
3.3 - Análise laboratorial .....	36

3.3.1 - Processamento das placas de petri.....	36
3.3.2 - Testes bioquímicos para identificação das bactérias.....	37
3.3.2.1 - Teste de Gram .....	37
3.3.2.2 - Teste da oxidase.....	37
3.3.2.3 - Teste da catalase.....	37
3.3.2.5 - Interpretação dos resultados dos testes bioquímicos .....	38
3.3.3 – Testes genéticos para identificação das bactérias .....	38
3.3.3.1 - Conservação das amostras até processamento.....	38
3.3.3.2 - Isolamento das colónias.....	38
3.3.3.3 – Preparação do DNA .....	38
3.3.3.4 - Amplificação por PCR do gene 16S do rRNA .....	39
3.3.3.5 - Digestão com enzimas de restrição .....	39
3.3.3.6 - Análise dos padrões de RFLP.....	40
3.3.3.7 – Sequenciação do gene 16S rRNA.....	40
3.3.3.8 – Manipulação das sequências de DNA .....	41
3.3.3.9 – Identificação das amostras com base na sequência genética.....	42
3.3.3.10- Determinação da origem provável das bactérias .....	44
3.4 - Análise estatística.....	45
4 – Resultados .....	46
4.1 – Flora bacteriana detectada no ar interior do HJA .....	46
4.1.1 – Identificação das bactérias.....	46
4.1.2 – Origem provável das bactérias.....	48
4.1.3 – Quantificação das bactérias .....	48
4.2 – Outros indicadores da qualidade do ar interior .....	49
4.2.1 – Quantificação dos fungos .....	49
4.2.2 – Parâmetros físico-químicos .....	50
4.2.3 – Análise global da qualidade do ar interior .....	51
4.3 – Dispersão da flora bacteriana no ar interior do HJA .....	53
4.4 – Comparação entre o ar interior e exterior do HJA.....	59
4.4.1 – Comparação qualitativa de bactérias.....	59
4.4.2 – Comparação quantitativa de bactérias .....	60
4.4.3 – Comparação quantitativa de fungos .....	61
4.4.4 – Efeito da bruma nos bioaerossóis .....	62
4.5 – Influência dos parâmetros físico-químicos e características dos locais na concentração de bioaerossóis.....	63
4.5.1 – Correlação com parâmetros físico-químicos.....	63
4.5.2 – Correlação com características do local .....	64

4.5.2.1 – Grau de movimentação de pessoas no local.....	64
4.5.2.2 – Número de pessoas no local .....	65
4.5.2.3 – Ventilação prévia do local .....	65
4.5.2.4 – Limpeza dos quartos .....	66
4.6 – Amostras sequenciadas.....	67
5 – Discussão .....	71
5.1 – Flora bacteriana detectada no ar interior do HJA.....	71
5.2 – Qualidade do ar interior do HJA.....	75
5.2.1 – Bactérias .....	75
5.2.2 – Fungos .....	78
5.2.3 – Parâmetros físico-químicos.....	81
5.2.4 – Globalidade da QAI.....	82
5.3 – Dispersão da flora bacteriana no ar interior do HJA .....	82
5.4 – Comparação entre o ar interior e exterior do HJA.....	85
5.5 – Influência dos parâmetros físico-químicos e características dos locais na concentração de bioaerossóis.....	90
5.6 – Amostras sequenciadas.....	92
6 – Conclusões.....	113
7 – Perspectivas futuras .....	118
Apêndices .....	120
Referências bibliográficas .....	194

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de géneros bacterianos que comumente colonizam o corpo humano..	8
Tabela 2 – Espécies do género <i>Staphylococcus</i> colonizadoras do corpo humano e respectivo grau de colonização e de promoção de patologia humana..	9
Tabela 3 – Valores máximos de referência para contaminantes físicos, químicos e biológicos no ar interior de edifícios, constantes na legislação portuguesa (Decreto-Lei nº 79/2006).	10
Tabela 4 – Condições de referência para o ar interior de edifícios, constantes na legislação portuguesa (Decreto-Lei nº 79/2006).	10
Tabela 5 – Lista de efeitos e consequências na saúde humana dos poluentes do ar interior....	11
Tabela 6 – Plano de amostragens do ar realizadas no HJA.	34
Tabela 7 – Identificação das bactérias processadas para identificação respeitantes ao ar interior do HJA, discriminadas por identificação por testes bioquímicos e técnicas moleculares.	47
Tabela 8 – Identificação das bactérias do ar interior do HJA por tipo de Gram e forma celular.	47
Tabela 9 – Origem provável das bactérias detectadas no ar interior do HJA.	48
Tabela 10 – Estatística descritiva da concentração de bactérias totais no ar interior do HJA....	48
Tabela 11 - Concentração média de bactérias totais (UFC/m <sup>3</sup> ) por local amostrado no interior do HJA e agrupadas por tipo de local.....	49
Tabela 12 – Estatística descritiva da quantificação de fungos totais no ar interior do HJA. ....	49
Tabela 13- Concentração média de fungos totais (UFC/m <sup>3</sup> ) por local amostrado no interior do HJA e por tipo de local.....	50
Tabela 14 – Estatística descritiva das medições dos parâmetros físico-químicos do indoor do HJA.....	50
Tabela 15 – Valores médios dos parâmetros físico-químicos medidos nos locais do interior do HJA e respectivo número de medições.....	51
Tabela 16 - Resumo dos resultados da análise da QAI do HJA e sua conformidade com a legislação aplicável (Decretos-Lei nº 78, 79 e 80/2006 e Nota técnica NT-SCE-02).	52
Tabela 17 – Comparação entre o número de colónias de bactérias detectadas no ar interior e exterior do HJA identificadas por técnicas moleculares. ....	59
Tabela 18 – Comparação entre as OTU de bactérias detectadas no ar interior e exterior do HJA.	60
Tabela 19 – Comparação entre o número de colónias de bactérias detectadas no ar interior e exterior do HJA identificadas por testes bioquímicos.....	60
Tabela 20 – Comparação entre o número de colónias de bactérias detectadas no ar interior e exterior do HJA identificadas por teste de Gram.....	60
Tabela 21 – Estatística descritiva da quantificação de bactérias no ar interior e exterior do HJA.	60
Tabela 22 – Estatística descritiva da quantificação de fungos no ar interior e exterior do HJA.	61
Tabela 23 - Estatística descritiva da quantificação de bactérias e fungos no ar interior e exterior do HJA em dias com bruma e dias normais. ....	62
Tabela 24 – Correlação de Pearson entre a concentração de bactérias totais no ar interior do HJA e as variáveis físico-químicas. ....	63
Tabela 25 – Correlação de Spearman entre a concentração de fungos totais no ar interior do HJA e as variáveis físico-químicas. ....	64
Tabela 26 – Concentrações médias de microorganismos no ar interior do HJA discriminados por grau de movimentação de pessoas no local amostrado. ....	64

Tabela 27 – Concentrações médias de microorganismos no ar interior do HJA discriminados por número de pessoas no local. ....	65
Tabela 28 – Concentrações médias de microorganismos no ar interior do HJA discriminados por tipo de ventilação prévia do local.....	66
Tabela 29 – Concentrações médias de microorganismos no ar interior do HJA discriminados por quartos com limpeza feita e por fazer.....	66
Tabela 30 – Informação geral acerca das amostras bacterianas sequenciadas. ....	67
Tabela 31 – Resultados da identificação das amostras sequenciadas pela base de dados <i>Bio Informatic Bacteria Identification</i> (BIBI).....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Organização estrutural dos genes do RNA ribossomal em bactérias.....	21
Figura 2 – Esquema do gene 16S rRNA e indicação das zonas variáveis e conservadas.....	23
Figura 3 – Localização do Hospital Dr. João de Almada na cidade do Funchal .....	32
Figura 4 – Vista aérea do Hospital Dr. João de Almada e área circundante. ....	32
Figura 5 – Placa de petri com meio de cultura TSA para crescimento de bactérias, após incubação e contagem. ....	36
Figura 6 – Dendograma com os locais amostrados no HJA agrupados por grau de similaridade na flora bacteriana. ....	53
Figura 7 - Gráfico <i>Multi Dimensional Scaling</i> (MDS) com base no cálculo de índice de similaridade entre os locais amostrados no HJA.....	54
Figura 8 – Diagrama do piso 0 do HJA com indicação do número de OTU partilhadas entre locais.....	55
Figura 9 - Gráfico <i>Multi Dimensional Scaling</i> (MDS) com base no cálculo de similaridade de <i>Bray Curtis</i> entre os locais amostrados no piso 0 do HJA. ....	55
Figura 10 – Diagrama do piso 1 do HJA com indicação do número de OTU partilhadas entre locais.....	56
Figura 11 - Gráfico <i>Multi Dimensional Scaling</i> (MDS) com base no cálculo de similaridade de <i>Bray Curtis</i> entre os locais amostrados no piso 1 do HJA. ....	56
Figura 12 – Diagrama do piso 2 do HJA com indicação do número de OTU partilhadas entre locais.....	57
Figura 13 - Gráfico <i>Multi Dimensional Scaling</i> (MDS) com base no cálculo de similaridade de <i>Bray Curtis</i> entre os locais amostrados no piso 2 do HJA. ....	57
Figura 14 – Diagrama do piso 3 do HJA com indicação do número de OTU partilhadas entre locais.....	58
Figura 15 - Gráfico <i>Multi Dimensional Scaling</i> (MDS) com base no cálculo de similaridade de <i>Bray Curtis</i> entre os locais amostrados no piso 3 do HJA. ....	58
Figura 16 – Árvore filogenética com amostras deste trabalho e bactérias de estirpes tipo mais próximas filogeneticamente com base na sequência do gene 16S rRNA.....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

**°C** – Graus Célsius

**16S rRNA** – Gene do DNA bacteriano que codifica a subunidade 16S do ribossoma celular

**ATTC** – *American Type Culture Collection*

**API** – *Analytical Profile Index*

**BIBI** – *Bio Informatic Bacteria Identification*

**BLAST** – *Basic Local Alignment Search Tool*

**CCUG** – *Culture Collection, University of Göteborg, Sweden*

**DNA** – *Deoxyribonucleic Acid*, ácido desoxirribonucleico

**dNTPs** – didesoxirribonucleótidos

**EDTA** - *Ethylenediamine tetraacetic acid*, ácido etilendiamino tetra-acético

**EMBL** – *European Molecular Biology Laboratory*

**g.l.** – Graus de liberdade

**HJA** – Hospital Dr. João de Almada

**IN** – Infecções Nosocomiais

**m<sup>3</sup>** – Metro cúbico

**MDS** – *Multi Dimensional Scaling*

**NCBI** - *National Center for Biotechnology Information*

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**OTU** – *Operational Taxonomic Units*, unidades taxonómicas operacionais

**p** – Nível de significância

**pb** – Pares de bases

**PCR** – *Polimerase Chain Reaction*, reacção de polimerização em cadeia

**PFGE** – *Pulsed Field Gel Electrophoresis*, electroforese de campo pulsado

**PPM** – Partes por milhão

**QAI** - Qualidade do Ar Interior

**RAM** – Região Autónoma da Madeira

**RDP** – *Ribosomal Database Project*

**RFLP** - *Restriction Fragment Length Polymorphism*

**RSECE** – Regulamento dos Sistemas Energéticos e de Climatização dos Edifícios

**SDC** - Gelose Sabouraud Glucose Cloranfenicol

**Taq** – Enzima DNA polimerase extraída da bactéria *Thermus aquaticus*

**TSA** - Gelose Tripcase Soja Agar

**UCI** – Unidade de Cuidados Intensivos

**UFC** – Unidades Formadoras de Colónias

**UV** – Ultra Violeta

O presente trabalho foi realizado no âmbito da Tese de Mestrado correspondente ao 2º ano curricular do curso de Mestrado em Biodiversidade e Conservação da Universidade da Madeira. O estudo enquadra-se no âmbito do Mestrado ao se focar essencialmente na área da Biodiversidade, nomeadamente na diversidade da flora bacteriana do ar.

A escolha deste tema teve como propósito aliar o meu gosto e experiência pessoal prévia na área da Genética a uma área da Biologia que tenha um impacto benéfico na comunidade onde a Universidade se insere. Por também ter ligações à área da Aerobiologia, decidi enveredar por um trabalho que engloba ambas as áreas e que traga uma mais-valia para a população. Também foi preponderante na escolha do tema a constatação da inexistência deste tipo de estudos na Região Autónoma da Madeira (RAM) e a escassez de trabalhos desta índole ao nível nacional.

Assim, surgiu o tema deste trabalho que pretende dar a conhecer pela primeira vez a constituição da flora bacteriana do ar na RAM, com a relevância adicional de ser realizado num Hospital, o Dr. João de Almada (HJA) no Funchal. Este trabalho indicará a Qualidade do Ar Interior (QAI) a que estão expostos os utentes do HJA, potenciando a correcção de eventuais problemas pelo conhecimento dos mesmos, o que resultará num benefício para a Saúde Pública.

Este trabalho foi possível pela parceria com a Prof. Dr.<sup>a</sup> Irene Câmara do Centro de Competências de Ciências da Vida da Universidade da Madeira que facultou os equipamentos de amostragem do ar e respectivos consumíveis, tendo sido realizada a amostragem e testes bioquímicos em colaboração com o projecto da sua autoria denominado “Detecção de bioaerossóis em ambiente hospitalar” desenvolvido no Centro de Estudos da Macaronésia.

É importante salientar que este estudo foi realizado com objectivos puramente académicos, não sendo passível do mesmo ser equiparado a uma auditoria da QAI prevista nos termos da Lei Portuguesa.

As comparações de dados obtidos com os valores legais em vigor, nomeadamente Decretos-Lei nº 78, 79 e 80 de 4 de Abril de 2006 e Nota técnica NT-SCE-02 (ADENE, 2009), têm apenas carácter informativo e não vinculativo. Este trabalho não se baseou na aplicação plena de todos os métodos e cálculos previstos numa auditoria da QAI no âmbito do Regulamento dos Sistemas Energéticos e de Climatização dos Edifícios (RSECE).

## 1.1 – OBJECTIVOS DO TRABALHO

### 1.1.1 - OBJECTIVO GERAL

Determinar a biodiversidade bacteriana do ar interior de um hospital da RAM com recurso a técnicas inovadoras no panorama nacional, contribuir para o conhecimento da QAI do local, identificando potenciais riscos, permitindo assim a aplicação de medidas correctivas com benefício para a Saúde Pública.

### 1.1.2 - OBJECTIVOS ESPECÍFICOS

- Aplicação de técnicas moleculares como metodologia de elevada precisão na identificação de flora bacteriana aerossolizada do Hospital Dr. João de Almada.
- Determinar os níveis de contaminação bacteriana e fúngica do ar interior do hospital recorrendo ao método de captação de bioaerossóis em placa de petri com meio nutriente selectivo.
- Determinar os parâmetros da QAI, comparando-os com valores de referência para identificação de potenciais riscos.
- Determinar a origem e o padrão de dispersão de bactérias no ar interior do hospital.
- Determinar a influência do ar exterior no nível de contaminação do ar interior por microorganismos.
- Determinar a influência de parâmetros ambientais e características de cada local na concentração de microorganismos aerossolizados no ar interior.

## 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 - ASPECTOS GERAIS SOBRE A QUALIDADE DO AR EM AMBIENTE HOSPITALAR

#### 2.1.1 - QUALIDADE DO AR INTERIOR

A atmosfera interior representa uma unidade ecológica com impacto na saúde pública. O ar interior, à semelhança do ar exterior, apresenta, para além dos poluentes químicos, um complexo leque de microorganismos, endotoxinas, micotoxinas e compostos orgânicos voláteis potencialmente adversos à saúde (Tringe *et al*, 2008; Aydogdu *et al*, 2009).

Os poluentes biológicos, os quais incluem bactérias, fungos e vírus, representam um papel importante na definição de qualidade do ar interior (QAI). Contudo, a QAI constitui um conceito complexo que também integra factores físicos (temperatura ambiente, humidade), químicos (contaminantes ou poluentes) e mecânicos (ventilação) do ar interior. A conjugação destes factores irá condicionar as condições de conforto e de salubridade de todo e qualquer ocupante dum ambiente fechado (Jeffus, 2004; Eklaise *et al*, 2008; Chan *et al*, 2009).

#### 2.1.2 - O AMBIENTE HOSPITALAR

O ambiente hospitalar é considerado um ambiente especial, especificamente destinado à prestação de cuidados de saúde (Sobotová *et al*, 2006). Os hospitais e outras unidades de saúde são ambientes complexos que requerem ventilação para o conforto dos pacientes e controlo de emissões perigosas à saúde. Para além disso, a qualidade microbiológica do ambiente hospitalar é de particular importância uma vez que os pacientes podem servir como fonte de microorganismos patogénicos aos profissionais e auxiliares de saúde, visitantes e demais pacientes (Qudiesat *et al*, 2009).

Este tipo de ambiente pode colocar o paciente num risco acrescido relativamente ao ambiente exterior, dado que os espaços fechados confinam os aerossóis e permite-lhes o desenvolvimento para níveis de infecção (Eklaise *et al*, 2008).

##### 2.1.2.1 - OS BIOAEROSSÓIS COMO POLUENTES DO AR INTERIOR.

Os bioaerossóis frequentemente encontrados no ar interior estão potencialmente aliados a um incremento da probabilidade de desenvolvimento e transmissão de patologias infecciosas, cujas complicações podem levar, em casos mais extremos, a um aumento da morbimortalidade (Escombe *et al*, 2007). Neste sentido, a Organização Mundial de Saúde (OMS) contabilizou a contribuição de uma variedade de factores de risco para doenças e determinou

que a poluição do ar interno é o 8º factor de risco mais importante, sendo responsável por 2,7% do conjunto de casos de doenças no mundo (WHO, 2010).

Segundo o inquérito de prevalência de infecção para a R.A.M. de 2009 (Serviço Regional de Saúde, 2009), 8,2% dos indivíduos hospitalizados desenvolvem complicações infecciosas, as quais podem dever-se, entre outros factores, à insalubridade microbiológica do ar interior.

A exposição do organismo aos bioaerossóis propicia o desenvolvimento de efeitos tóxicos devido à natureza e complexidade da entidade, às variações na resposta humana perante a microflora aerolizada, bem como ao seu diâmetro aerodinâmico (Srikanth *et al*, 2008)

---

## 2.1.2.2 - PARTICULARIDADES DOS BIOAEROSSÓIS BACTERIANOS

### 2.1.2.2.1 - DEFINIÇÃO E ORIGEM

---

Os bioaerossóis constituem partículas biológicas aerolizadas viáveis e não-viáveis presentes na atmosfera, com uma origem natural ou antropogénica, contribuindo em cerca de 5 a 34% da poluição do ambiente interior (Srikanth *et al*, 2008; Aydogdu *et al*, 2009). Os bioaerossóis produzidos rotineiramente em hospitais podem ter origem em diversos processos, nomeadamente através da respiração, tosse, espirros, entubação, ventilação não-invasiva, aplicação de medicação por nebulização e cirurgias (Fang *et al*, 2008). Neste contexto, a fonte mais importante de agentes patogénicos atmosféricos no interior do hospital é o paciente infectado. A transmissão atmosférica ocorre quando os microorganismos patogénicos são transferidos de um indivíduo infectado, para um indivíduo susceptível por via aérea.

O mecanismo predominante que permite a presença de microorganismos no ambiente interior é a produção de aerossóis sobretudo através do espirro ou da tosse, e a sua subsequente perda de água o qual permite-lhes reduzir de tamanho, incrementando a capacidade de permanência no ar (Fang *et al*, 2009; Qudiesat *et al*, 2009). Muitos dos organismos transportados através do fluxo de ar são comensais e habitam ordinariamente a superfície da pele, podendo ser transportados para as áreas circundantes, potenciando o fenómeno de contaminação cruzada (Clark e Calcina-Goff, 2009).

### 2.1.2.2.2 – MECANISMOS DE DEFESA ÀS CONDIÇÕES AMBIENTAIS

---

Sob condições favoráveis, as bactérias presentes na atmosfera são capazes de crescer e propagar numa variedade de materiais de construção e de superfícies, causando poluição interior. Muitas bactérias têm desenvolvido mecanismos de defesa que lhes permite sobreviver no estado aerolizado. Alguns géneros bacterianos, como *Bacillus* e *Clostridium*, formam endosporos, constituindo formas dormentes da célula. Os esporos bacterianos podem permanecer viáveis durante anos e são resistentes a *stresses* ambientais como o calor, o frio e

a radiação UV. As formas vegetativas também desenvolvem mecanismos de defesa, algumas espécies reduzem a sua taxa metabólica e o seu tamanho sob condições de limitação de nutrientes (Tang, 2009).

Vários estudos têm sido desenvolvidos sobre a sobrevivência de bactérias aerolizadas. Neste âmbito, as bactérias apresentam diferentes tipos de revestimentos: Gram positivas (+) revestidas por uma camada externa de peptidoglicano e as Gram negativas (-) revestidas por uma camada externa de lipopolissacarídeos. Estudos do ar interior demonstraram que as bactérias Gram positivas (+) são as que predominantes em ambientes interiores, apesar das Gram negativas (-) estarem igualmente presentes (Górny e Dutkiewicz, 2002). As baixas concentrações destas últimas pode ser atribuída à sua susceptibilidade ao *stress* ambiental devido ao reduzido conteúdo de peptidoglicano, conduzindo à destruição e/ou morte celular (Sudharsanam *et al*, 2008).

#### 2.1.2.2.3 - FACTORES QUE INFLUENCIAM OS BIOAEROSSÓIS

O transporte e deposição final dos bioaerossóis são afectados pelas suas propriedades físicas e por parâmetros do ambiente onde ocorrem. As características físicas correspondem ao tamanho, densidade e forma das gotículas; os factores ambientais incluem a magnitude das correntes de ar, humidade relativa e a temperatura as quais determinam a capacidade para ser tornar num bioaerossol (Srikanth *et al*, 2008; Mohr, 2002).

#### 2.1.2.2.4 - IMPLICAÇÃO DOS BIOAEROSSÓIS NAS INFECÇÕES NOSOCOMIAIS

Segundo a Organização Mundial de Saúde, as infecções nosocomiais (IN) são definidas como infecções adquiridas no ambiente hospitalar por um paciente admitido por outras razões de saúde (Piteira, 2007).

Por serem doenças transmissíveis, as infecções hospitalares apresentam uma cadeia epidemiológica que se traduz na produção de um agente infeccioso, de uma fonte ou causa, e a concentração de um número suficiente de organismos passível de provocar infecção num hospedeiro secundário (Tang, 2009). Pode ocorrer um variado número de infecções contraídas por pacientes hospitalizados devido à exposição a microorganismos quando estes estão dispersos no ar. Na sua maioria representam bioaerossóis não patogénicos, causando doença somente em indivíduos imunocomprometidos. O sistema imunológico de alguns pacientes pode estar debilitado devido a doença prolongada ou a tratamentos intensivos, pelo que são susceptíveis de adquirir IN (Eklaide *et al*, 2008; Hellgren *et al*, 2009).

As bactérias aeróbias predominam na notificação das infecções hospitalares. Geralmente estes agentes fazem parte da microbiota humana normal. Por outro lado, os vírus e os fungos

têm uma participação importante, contudo não tão descrita na literatura (Fridkin e Jarvis, 1996; Chan *et al*, 2009).

As IN mais frequentemente encontradas envolvem o sistema urinário, seguido em frequência pelas infecções da pele e feridas, pneumonias adquiridas em hospitais e infecções da corrente sanguínea (Ali *et al*, 2007). As IN transmitidas pela via aérea são as principais causas de morbi-mortalidade no Mundo, sendo a tuberculose responsável, *per si*, por 1,8 milhões de mortes por ano (Escombe *et al*, 2007).

Nos países industrializados, as IN ocorrem em 2 a 12% dos pacientes hospitalizados, elevando-se as taxas para 21% nas Unidades de Cuidados Intensivos (UCI). Nos países em desenvolvimento, as taxas de IN são de 3-18% nos pacientes hospitalizados, sendo superior a 54% nas UCI (Ding *et al*, 2009).

#### 2.1.2.2.5 – MICROORGANISMOS REPRESENTADOS NO AMBIENTE HOSPITALAR

Em países desenvolvidos, os organismos mais frequentemente associados a IN são os membros da flora habitual dos humanos, especialmente da pele, tracto respiratório superior e gastrointestinal, e os organismos saprófitos do ambiente hospitalar. Os mais comuns são os *Staphylococcus* coagulase negativos, *S. aureus*, *Enterococcus spp.*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia spp.*, e *Candida spp.*. Em países em desenvolvimento, infecções causadas por *Mycobacterium tuberculosis* e *Salmonella* ainda são comuns, tendo origem em comida contaminada, funcionários e visitantes (Brachman e Abrutyn, 2009).

Um estudo que incidiu sobre a detecção de bactérias e fungos no ar em hospitais determinou que os géneros predominantes de bactérias aerolizadas são *Staphylococcus* (50%), *Micrococcus* (15-20%), *Corynebacterium* (5-20%) e *Bacillus* (5-15%), enquanto os fungos predominantes são *Cladosporium* (30%), *Penicillium* (20-25%), *Aspergillus* (15-20%) e *Alternaria* (10-20%) (Kim *et al*, 2010). Outro estudo que versou a flora bacteriana do ar interior de edifícios em geral também detectou os géneros bacterianos *Lactococcus*, *Paracoccus* e *Moraxella*, para além dos anteriormente referidos (Tringe *et al* 2008).

Em Portugal, um estudo efectuado num hospital distrital no Nordeste do país revelou o predomínio de *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus hominis* e *S. cohnii cohnii* no ar interior do hospital, tendo sido também encontradas bactérias das espécies *Staphylococcus caprae*, *S. auricularis*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. lentus*, *Kocuria rosea*, *K. varians*, *K. kristenae*, *Dermacoccus nishinomiyaensis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Gemella*

*morbilorum*, *Aerococcus viridans*, *Erysipelothrix rhusiopathie*, *Alloiococcus otitis* (Santos, 2008).

Na Região Autónoma da Madeira, a Comissão de Controlo de Infecção do Serviço Regional de Saúde determinou que, no ano de 2009, os microorganismos isolados de pacientes e relacionados com infecções nosocomiais eram das espécies *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Morganella sp.* e *Klebsiella oxytoca*, enquanto os relacionados com infecções na comunidade eram das espécies *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Proteus mirabilis*, *Neisseria meningitidis*, *Serratia marcescens*, *Morganella sp.*, *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* e outros anaeróbios (Serviço Regional de Saúde, 2009).

Pode-se afirmar que de uma forma geral, e de acordo com estudos do ar interior conduzidos na Europa, que os cocos Gram positivos (+), nomeadamente as espécies de *Micrococcus* e *Staphylococcus*, são as bactérias que mais ocorrem nos ambientes interiores, apesar das Gram negativas (-) estarem igualmente presentes (Górny e Dutkiewicz, 2002; Rintala *et al*, 2008).

Tendo em linha de conta que a população de pacientes do HJA pertence maioritariamente a uma faixa etária com idades elevadas, e que nestas pessoas são comuns elevadas taxas de incontinência urinária e fecal (Markland *et al*, 2008) e infecções urinárias (Foxman, 2002; Gupta, 2005), as bactérias colonizadoras do tracto gastrointestinal e gênito-urinário poderão contribuir significativamente para a composição da flora bacteriana aerossolizada do hospital, ao serem frequentemente manipulados materiais contaminados com fezes e urina.

Estas bactérias, a par das habitualmente libertadas para o ar pelo ser humano, como as colonizadoras da pele humana e o tracto respiratório superior (Clark e Calcina-Goff, 2009; Fang *et al*, 2008), deverão constituir a uma porção significativa da diversidade biológica bacteriana expectável no ar interior do HJA, sendo os géneros bacterianos mais comuns listados em seguida.

Tabela 1 – Lista de gêneros bacterianos que comumente colonizam o corpo humano. Adaptado de Murray *et al* (2005).

Gênero bacteriano	Pele	Tracto respiratório superior	Tracto gastrointestinal	Tracto gênito-urinário
<i>Acinetobacter</i>	Presente	Presente	Presente	
<i>Actinobacillus</i>		Presente		
<i>Actinomyces</i>		Presente	Presente	Presente
<i>Aerococcus</i>	Presente			
<i>Bacillus</i>	Presente			
<i>Bacteroides</i>			Presente	Presente
<i>Bifidobacterium</i>			Presente	Presente
<i>Campylobacter</i>			Presente	
<i>Cardiobacterium</i>		Presente		
<i>Clostridium</i>	Presente		Presente	Presente
<i>Corynebacterium</i>	Presente	Presente	Presente	Presente
<i>Eikenella</i>		Presente		
<i>Enterococcus</i>			Presente	Presente
<i>Eubacterium</i>		Presente	Presente	Presente
Família Enterobacteriaceae		Presente	Presente	Presente
<i>Fusobacterium</i>		Presente	Presente	Presente
<i>Gardnerella</i>				Presente
<i>Haemophilus</i>		Presente	Presente	Presente
<i>Helicobacter</i>			Presente	
<i>Kingella</i>		Presente		
<i>Lactobacillus</i>			Presente	Presente
<i>Micrococcus</i>	Presente			
<i>Mobiluncus</i>			Presente	Presente
<i>Moraxella</i>		Presente		
<i>Mycoplasma</i>		Presente		Presente
<i>Neisseria</i>		Presente		
<i>Peptostreptococcus</i>	Presente	Presente	Presente	Presente
<i>Porphyromonas</i>		Presente	Presente	Presente
<i>Prevotella</i>		Presente	Presente	Presente
<i>Propionibacterium</i>	Presente	Presente	Presente	Presente
<i>Pseudomonas</i>			Presente	
<i>Staphylococcus</i>	Presente	Presente	Presente	Presente
<i>Stomatococcus</i>		Presente		
<i>Streptococcus</i>	Presente	Presente	Presente	Presente
<i>Treponema</i>		Presente		Presente
<i>Ureaplasma</i>				Presente
<i>Veillonella</i>		Presente	Presente	

Para além dos gêneros mencionados também deverão ser encontradas outros com origem ambiental, mas com menor representatividade (Täubel *et al*, 2009).

Entre os géneros bacterianos habitualmente detectados no ar interior hospitalar e que colonizam o ser humano, um dos mais prevalentes é o *Staphylococcus* (Murray *et al*, 2005; Kim *et al*, 2010). Tendo em conta que as espécies deste género têm diferentes características, são listadas na Tabela 2 as espécies associadas ao ser humano e sua respectiva prevalência e capacidade de promover doença.

Tabela 2 – Espécies do género *Staphylococcus* colonizadoras do corpo humano e respectivo grau de colonização e de promoção de patologia humana. Adaptado de Murray *et al* (2005).

Espécie de <i>Staphylococcus</i>	Colonização humana	Doença humana
<i>S. aureus</i>	Comum	Comum
<i>S. epidermidis</i>	Comum	Comum
<i>S. saprophyticus</i>	Comum	Comum
<i>S. haemolyticus</i>	Comum	Comum
<i>S. lugdunensis</i>	Comum	Comum
<i>S. capitis</i>	Comum	Pouco comum
<i>S. saccharolyticus</i>	Comum	Rara
<i>S. warneri</i>	Comum	Rara
<i>S. hominis</i>	Comum	Rara
<i>S. auricularis</i>	Comum	Rara
<i>S. cohnii</i>	Comum	Rara
<i>S. xylosus</i>	Pouco comum	Rara
<i>S. simulans</i>	Pouco comum	Rara
<i>S. caprae</i>	Pouco comum	Rara
<i>S. pasteurii</i>	Pouco comum	Rara
<i>S. schleiferi</i>	Rara	Rara

### 2.1.3 – LEGISLAÇÃO RELACIONADA COM A QUALIDADE DO AR INTERIOR

Numerosos guias e normas têm sido estabelecidas para proteger os indivíduos de exposição excessiva aos poluentes do ar e garantir uma QAI óptima (Tang *et al*, 2009). Até à data ainda não foram estabelecidas normas específicas para a qualidade do ar nos hospitais na maioria dos países, incluindo Portugal (Nunes *et al*, 2005; Łukaszuk, 2007). Tal deve-se à complexidade da composição microbiológica presente no ar, variações da resposta humana à exposição, e dificuldade na colheita de microorganismos que podem provocar efeitos adversos na saúde (Sudharsanam *et al*, 2008).

Em Portugal foi implementada legislação aplicável a edifícios em geral, pela transposição da Directiva nº 2002/91/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, relativa ao desempenho energético dos edifícios no qual se inclui a Qualidade do Ar Interior (QAI), tendo sido publicados os Decretos-Lei nº 78, 79 e 80 em 4 de Abril de 2006. O Decreto-Lei nº 78/2006

aprova o Sistema Nacional de Certificação Energética e da Qualidade do Ar Interior nos Edifícios (SCE), o qual em conjunto com o Regulamento das Características de Comportamento Térmico dos Edifícios (RCCTE) do Decreto-Lei nº 80/2006 e o Regulamento dos Sistemas Energéticos de Climatização em Edifícios (RSECE) do Decreto-Lei nº 79/2006 definem os requisitos dos edifícios bem como as regras e métodos para a aplicação destes regulamentos às edificações (ADENE, 2008). O Decreto-Lei nº 79/2006 estabelece os valores máximos de referência para os contaminantes do ar interior de edifícios, os quais são listados em seguida.

Tabela 3 – Valores máximos de referência para contaminantes físicos, químicos e biológicos no ar interior de edifícios, constantes na legislação portuguesa (Decreto-Lei nº 79/2006).

Parâmetros	Concentração máxima de referência
Partículas Suspensas no Ar (PM10)	0,15 mg/ m <sup>3</sup>
Dióxido de Carbono (CO <sub>2</sub> )	1800 mg/ m <sup>3</sup>
Monóxido de Carbono (CO)	12,5 mg/ m <sup>3</sup>
Ozono (O <sub>3</sub> )	0,2 mg/ m <sup>3</sup>
Formaldeído	0,1 mg/ m <sup>3</sup>
Compostos Orgânicos Voláteis	0,6 mg/ m <sup>3</sup>
Microorganismos – Bactérias totais	500 UFC/ m <sup>3</sup>
Microorganismos – Fungos totais	500 UFC/ m <sup>3</sup>
<i>Legionella</i> <sup>(1)</sup>	100 UFC/l
Radão <sup>(2)</sup>	400 Bq/m <sup>3</sup>

<sup>(1)</sup> – Aplicável apenas à água de tanques das torres de arrefecimento, depósitos de água quente e tabuleiros de condensação; <sup>(2)</sup> – Aplicável apenas em edifícios construídos em zonas graníticas.

O Decreto-Lei 79/2006 também define as condições interiores de referência, para manter “condições ambientes de conforto” para os ocupantes, nomeadamente em termos de parâmetros físicos do ar. De notar que os valores de temperatura e humidade do ar indicados são apenas recomendações, não sendo parâmetros de conformidade obrigatória por Lei.

Tabela 4 – Condições de referência para o ar interior de edifícios, constantes na legislação portuguesa (Decreto-Lei nº 79/2006).

Parâmetros	Valor recomendado	Aplicação
Temperatura - Verão	25°C	Recomendada
Temperatura - Inverno	20°C	Recomendada
Humidade relativa	50% (apenas no Verão)	Recomendada
Velocidade do ar	<0,2m/s	Obrigatória
Taxa de renovação de ar	0,6 renovações/hora	Obrigatória

A legislação determina a periodicidade das auditorias da QAI de 2 em 2 anos no caso de edifícios ou locais que funcionem como hospitais, clínicas e similares, centros de idosos, lares e equiparados, estabelecimentos de ensino, desportivos e centros de lazer, creches, infantários ou instituições para permanência de crianças (Decreto-Lei nº 79/2006).

A Portaria n.º 461/2007, de 5 de Junho, definiu a calendarização da aplicação do Sistema de Certificação Energética e da Qualidade do Ar Interior nos Edifícios (SCE), sendo determinada a aplicação plena do sistema de certificação a todos os edifícios das diferentes tipologias, dimensões e fins a partir de 1 de Janeiro de 2009.

O Decreto Legislativo Regional n.º 1/2008/M, de 11 de Janeiro de 2008, adaptou à Região Autónoma da Madeira o Sistema Nacional de Certificação Energética e da Qualidade do Ar Interior nos Edifícios (SCE), o Regulamento dos Sistemas Energéticos de Climatização em Edifícios (RSECE) e o Regulamento das Características de Comportamento Térmico dos Edifícios (RCCTE), constantes nos Decretos-Lei n.º 78, 79 e 80/2006.

A legislação relativa à QAI, nomeadamente o Decreto-Lei n.º 79/2006, estabelece os valores máximos de referência para os contaminantes do ar interior de edifícios tendo em conta os efeitos e consequências para a saúde humana que o excesso de poluentes origina.

Tabela 5 – Lista de efeitos e consequências na saúde humana dos poluentes do ar interior. Adaptado de ADENE (2008).

Poluentes/Parâmetro	Efeitos/ consequências na saúde humana
<b>Partículas suspensas no ar (PM10)</b>	Irritação da pele e mucosas, doenças profissionais (metais).
<b>Dióxido de carbono</b>	Níveis superiores a 1000 ppm podem causar a dores de cabeça, irritação de olhos e garganta, fadiga, etc.
<b>Monóxido de carbono</b>	Forma a carboxihemoglobina que impede a captação de oxigénio, podendo levar à morte.
<b>Ozono</b>	Acima de 0,12 ppm, pode provocar irritação de olhos, reacções alérgicas, dores de cabeça, secura de boca e garganta, pressão no peito e tosses.
<b>Formaldeído</b>	É carcinogénico nos animais. Nos seres humanos, produz irritação nos olhos, nariz, garganta e vias respiratórias, dores de cabeça, enjoos e fadiga.
<b>Compostos orgânicos voláteis</b>	Olhos vermelhos, secura das mucosas do nariz e garganta, dores de cabeça, fadiga.
<b>Radão</b>	Quando depositado nos pulmões pode gerar cancro.
<b>Bactérias</b>	Febres, dores de cabeça, fadiga e dores musculares, efeitos irritantes nos olhos, nariz, garganta e pele.
<b>Fungos</b>	Febres, dores de cabeça, fadiga e dores musculares (a maior parte destes sintomas desaparece entre 10 e 20 horas depois da exposição), efeitos irritantes nos olhos, nariz, garganta e pele.
<b>Legionella</b>	Infecção pulmonar (“doença do legionário”), febres altas.

No âmbito hospitalar e englobando os bioaerossóis, com enfoque particular nas doenças transmissíveis, foi elaborado o Decreto-Lei nº 81/2009, de 21 de Agosto. Este cria o sistema nacional de informação de vigilância epidemiológica, denominado SINAVE, e pretende a implementação de medidas de prevenção, alerta, controlo e resposta relativamente a doenças transmissíveis, nomeadamente as infecto-contagiosas e a outros riscos para a saúde pública.

Entre os dados essenciais para o tratamento de informação de saúde pública estão incluídas as condições que determinam a propagação da doença, o que implicitamente significa que em

muitos casos devam ser monitorizados os bioaerossóis hospitalares, pois a via de transmissão aérea é conhecida para muitos patogéneos.

Em outros países existe também legislação referente à regulação da QAI, nomeadamente no Brasil onde a Agência de Vigilância Sanitária elaborou a resolução RE nº 9, que estabelece padrões de referência para a qualidade do ar interior, em ambientes climatizados artificialmente, de uso público e colectivo, determinando os valores máximos recomendados para os parâmetros da QAI: contaminação microbiológica, dióxido de carbono, partículas em suspensão, temperatura, humidade, velocidade, taxa de renovação e grau de pureza do ar (ANVISA, 2003b). A mesma entidade elaborou também a proposta de indicadores da QAI em serviços de saúde, criando 4 níveis de QAI em ambiente hospitalar. Os valores máximos de referência para contaminantes biológicos no ar são de 750 UFC/m<sup>3</sup> para o nível 0 (ambientes de uso público), 500 UFC/m<sup>3</sup> para o nível 1, 200 UFC/m<sup>3</sup> para o nível 2 e 50 UFC/m<sup>3</sup> para o nível 3 (salas de cirurgia) (ANVISA, 2003a). O valor máximo de referência legislado para contaminantes biológicos no ar no bloco operatório de hospitais é em França de 5 UFC/m<sup>3</sup>, no Reino Unido é 35 UFC/m<sup>3</sup> e na Suíça é de 25 UFC/m<sup>3</sup> (Santos, 2008).

## 2.2 - A MONITORIZAÇÃO AMBIENTAL ALIADA À VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA

Apesar da importância da avaliação da contaminação ambiental, não está ainda definido um padrão para a avaliação da qualidade microbiológica dos hospitais. Existem diversas recomendações, embora esteja por estabelecer o método padrão de análise do ar e a relação entre os níveis microbianos do ambiente (Ortiz *et al*, 2009).

Vários estudos visam estabelecer relações importantes que permitam elucidar questões como a origem, a fonte, ou a quantidade de poluentes num ambiente interior, ou encontrar indicadores que permitam accionar medidas preventivas de contenção ou erradicação de contaminantes do ar (Nunes, 2005).

A monitorização de bioaerossóis em ambientes hospitalares fornece informação relevante para o desenvolvimento da investigação epidemiológica das doenças infecciosas e para as investigações baseadas no controlo e dispersão aérea dos microorganismos patogénicos. Permite ainda o desenvolvimento de programas de prevenção e controlo de infecções hospitalares (Narui *et al*, 2009, Srikanth *et al*, 2008), a determinação das condições ambientais existentes, bem como a manutenção e gestão adequada do sistema de climatização (Piteira, 2007).

É um facto que as IN resultam num prolongamento do período de internamento, no incremento da utilização de agentes anti-microbianos, bem como no aumento de custos

médicos. Uma eficaz estratégia de controlo de infecções hospitalares, incluindo boa higiene, monitorização microbiológica e controlo nosocomial, pode reduzir significativamente o risco de IN, pelo que a vigilância das IN é uma parte essencial do programa de controlo de infecções (Geyik *et al*, 2008; Lee *et al*, 2009).

Vários estudos têm pesquisado a distribuição das estirpes com perfil genético similar oriundas de amostras de ar de diferentes ambientes hospitalares, relacionando-as com as isoladas de pacientes, de modo a avaliar a importância do ar como via de disseminação de patogénicos nosocomiais (Nunes, 2005).

A protecção da saúde pública está dependente da capacidade de colheita eficiente de amostras de bioaerossóis e sua exacta identificação e quantificação (Dungan e Leytem, 2009).

### 2.2.1 - METODOLOGIAS DE COLHEITA MICROBIOLÓGICA DO AR INTERIOR

Os métodos utilizados para a detecção de microorganismos no ar em ambientes interiores incluem: a sedimentação (ou método gravitacional), a filtração, a precipitação electrostática, a impactação centrífuga, a impactação em meio líquido (impingimento), a impactação em meio sólido (lâmina de microscopia), a impactação em meio semi-sólido (agar) e a amostragem de materiais e superfícies (Nunes *et al*, 2005; Kramer *et al*, 2006; Srikanth *et al*, 2008).

O método de impactação de partículas em meio semi-sólido, nomeadamente agar nutriente contido numa placa de petri, é utilizado nas análises baseadas em cultura de microorganismos (Stetzenbach *et al*, 2004). É dos métodos mais comuns (Dungan e Leytem, 2009), sendo o indicado para a quantificação de microorganismos no ar pela legislação de vários países, incluindo Portugal (Decreto-Lei n.º 79/2006), tendo sido utilizado no trabalho desta tese.

O método de impactação de partículas em meio sólido, geralmente lâmina de microscopia coberta com material adesivo, é utilizado para análise por microscopia e permite a detecção de microorganismos viáveis e não viáveis, sendo geralmente limitado à quantificação e identificação até ao género de grãos de pólen e de esporos de fungos (Dungan e Leytem, 2009; Stetzenbach *et al*, 2004).

O método de impactação em meio líquido, ou impingimento, consiste na colheita de partículas do ar para um líquido. Este método permite a diluição ou concentração da amostra para maximizar a precisão da quantificação, sendo as amostras passíveis de serem analisadas por vários métodos analíticos como a cultura, microscopia, imunoensaio, citometria de fluxo, bioquímica e métodos moleculares (Dungan e Leytem, 2009; Stetzenbach *et al*, 2004). Este método de colheita permite a detecção de microorganismos viáveis e não viáveis se a análise posterior for baseada com métodos independentes de cultura (Dungan e Leytem, 2009).

O método de filtração consiste na colheita de partículas num filtro onde passa o ar amostrado. Uma vez que este método induz dissecação das células bacterianas, geralmente é utilizado na amostragem de pó para análise microscópica de esporos de fungos e pólen, ou para análise molecular de microorganismos (Stetzenbach *et al*, 2004).

O método gravitacional consiste na exposição de um meio de cultura ao ar durante um período de tempo, não amostrando activamente o ar. Este método é pouco representativo dos bioaerossóis devido às partículas assentarem a diferentes taxas conforme as suas propriedades físicas (Stetzenbach *et al*, 2004), sendo difícil a calibração e análise de desempenho (Dungan e Leytem, 2009).

A amostragem de materiais e superfícies geralmente é utilizada como complemento à amostragem do ar, servindo para detecção de focos de contaminação e determinação da eficácia das medidas de remediação e limpeza (Stetzenbach *et al*, 2004). Permite, em certa medida, uma aferição dos bioaerossóis quantificando a deposição dos mesmos nas superfícies.

Durante décadas a amostragem de bioaerossóis tem sido realizada com métodos de colheita tradicionais que utilizam impactação forçada do ar e análise em meios de cultura ou observação microscópica directa (Stetzenbach *et al*, 2004). A amostragem de microorganismos usando impactação forçada de ar permite determinar a concentração de organismos por volume de ar, mas os vários métodos de colheita e análise influenciam os resultados e dificultam a comparação de dados (Stetzenbach *et al*, 2004). Foi constatado que os dispositivos de colheita convencionais introduzem um stress significativo na amostra, podendo reduzir substancialmente a viabilidade de um largo espectro de microorganismos aerolizados (Dungan e Leytem, 2009; Peccia e Hernandez, 2006). Outra desvantagem significativa é o facto que várias bactérias podem passar pelo mesmo furo do amostrador e cair no mesmo local no agar, sendo posteriormente contabilizadas erradamente como a mesma colónia (Dungan e Leytem, 2009). A análise molecular demonstrou que a diversidade taxonómica das comunidades de bactérias aerolizadas é superior à detectada pelos métodos baseados em cultura (Fierer *et al*, 2008; Dungan e Leytem, 2009). É também conhecido que a utilização de métodos baseados em cultura subestima a quantificação de bioaerossóis, pois apenas os microorganismos viáveis e cultiváveis são detectados (Stetzenbach *et al*, 2004), sendo estimado que a fracção cultivável represente apenas 10<sup>-4</sup>% a 10% da população bacteriana em amostras ambientais (Parkes e Taylor, 1985).

Os principais métodos para amostragem de bioaerossóis para estudos baseados em técnicas moleculares consistem na impactação em meio líquido (impingimento) e filtração (Dungan e Leytem, 2009; Peccia e Hernandez, 2006).

## 2.2.2 – METODOLOGIAS CLÁSSICAS DE IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS

A identificação definitiva e exacta das bactérias é um dos pilares fundadores dos campos de estudo da microbiologia e das doenças infecciosas (Janda e Abbott, 2002).

As metodologias clássicas de identificação de bactérias baseiam-se na comparação das características morfológicas e fenotípicas do isolado a ser identificado com as descritas para as espécies conhecidas (Clarridge, 2004).

O primeiro sistema credível de classificação sistemática das bactérias teve início no final do século XIX, separando as bactérias com base na morfologia, tamanho e mobilidade (Janda e Abbott, 2002).

O aparecimento dos meios de cultura em agar no final do século XIX e início do XX permitiu o isolamento e propagação de culturas puras de bactérias, levando a grandes avanços na investigação das propriedades bioquímicas das espécies bacterianas (Janda e Abbott, 2002; Brachman e Abrutyn, 2009). No entanto, o número relativamente baixo de testes bioquímicos e fenotípicos disponíveis na época, levou a alguma confusão e imprecisões na identificação das bactérias (Janda e Abbott, 2002).

Na primeira metade do século XX a identificação e classificação das bactérias continuou a evoluir, aparecendo cada vez mais novos testes bioquímicos, incluindo os baseados nas propriedades fisiológicas das bactérias (Janda e Abbott, 2002).

Com o aumento de testes disponíveis, aumentou a complexidade da identificação e caracterização correcta das espécies existentes, tornando-se necessário o recurso à taxonomia numérica. Esta ferramenta, recorrendo a grandes matrizes de dados permitiu inferir as relações filogenéticas entre as novas espécies e as previamente conhecidas, com base nas inúmeras características bioquímicas e morfológicas testadas (Janda e Abbott, 2002).

No final da década de 1960 verificou-se novo avanço importante na área da microbiologia, com os sistemas de identificação manuais miniaturizados a serem introduzidos nos laboratórios clínicos. Estes sistemas consistiam numa miniaturização, pronta a ser utilizada, de vários testes bioquímicos sequenciais nos quais era inoculada uma porção da amostra seguida de incubação. Tal traduziu-se numa redução de custos, de tempo de preparação e de espaço de armazenamento, vindo também a reduzir o espaço necessário na incubação e os tempos de espera até à obtenção de resultados (Janda e Abbott, 2002). Os primeiros sistemas de identificação tinham ainda uma fraca precisão mas com o tempo sofreram melhoramentos significativos, sendo os predecessores dos actuais testes API, que seguindo o mesmo princípio permitem a identificação de bactérias com um elevado grau de precisão, sendo considerados como um padrão de referência na identificação bacteriana na actualidade (O'Hara *et al*, 1992).

Os testes API estão disponíveis em vários modelos consoante o tipo de organismo cuja identificação se pretende e consistem numa tira plástica com um número variável de poços com reagentes químicos nos quais são inoculadas aliquotas da amostra bacteriana. A amostra é incubada e posteriormente analisada a variação de cor de cada poço. A cada cor corresponde a um resultado específico o qual, uma vez convertido num código numérico de acordo com o manual, permite a identificação da amostra por comparação com valores padrão para espécies conhecidas.

No final da década de 1970 surgiu através da *MicroScan* o primeiro teste combinado de identificação e determinação de perfil de susceptibilidade, agilizando o trabalho laboratorial de diagnóstico clínico. Mais tarde, a mesma empresa apresentou o *AS-3/touchScan*, o primeiro sistema automático de identificação microbiana e de teste de susceptibilidade, o qual foi largamente aceite pelos laboratórios clínicos (Janda e Abbott, 2002). Outros sistemas automáticos como o *Vitek AutoMicrobic* surgiram posteriormente, reduzindo o tempo de identificação bacteriana dos habituais 1 ou mais dias para até apenas 2 horas no caso de bactérias de rápido crescimento (Stager e Davis, 1992).

Actualmente existem muitos kits manuais e sistemas automáticos de identificação bacteriana e teste de susceptibilidade a antibióticos, sendo que estes últimos produzem resultados em questão de horas, como por exemplo o *BD Phoenix Automated Microbiology System (BD Diagnostic Systems)*, o *Vitek 2 (bioMérieux)*, e *MicroScan WalkAway System (Siemens)*, entre outros (Mittman *et al*, 2009; O'Hara, 2005).

São reconhecidos os benefícios clínicos e financeiros possibilitados pela rápida identificação de bactérias e sua susceptibilidade a antibióticos, possibilitando um mais rápido diagnóstico e início da aplicação de medicamentos, menor taxa de mortalidade e menor tempo de internamento resultando em menores custos para o sistema de saúde (Barenfanger *et al*, 1999; Doern *et al*, 1994). A utilização de sistemas automáticos é mais cara que os métodos manuais, mas permite uma significativamente mais rápida obtenção de identificação bacteriana (média de 9,6 horas pelo método automático e 25,9 horas pelo método manual), obtendo-se uma menor taxa de mortalidade dos pacientes, menor número de testes laboratoriais e de diagnóstico, menor duração da entubação do paciente, menor duração do internamento nos cuidados intensivos e intermédios e ainda mais rápida mudança na terapia antimicrobiana, resultando numa grande melhoria no tratamento e respectivo resultado nos pacientes hospitalizados com infecções (Doern *et al*, 1994).

A identificação de bactérias por métodos clássicos pode incluir a análise do crescimento, morfologia e propriedades bioquímicas, serológicas, funcionais e fisiológicas (Brachman e Abrutyn, 2009).

A análise do crescimento utiliza os diferentes requisitos nutricionais para diferenciação das bactérias, sendo determinada a presença/ausência de crescimento e até a forma como cresce a bactéria em meios de cultura específicos (Brachman e Abrutyn, 2009). A composição química dos meios de cultura regula o desenvolvimento da bactéria, sendo conhecidos quais os grupos bacterianos que induzem cada resultado nesses meios.

A análise da morfologia bacteriana incide na diferenciação das bactérias com base na forma, cor, textura e por vezes cheiro das colónias, sendo utilizada a coloração diferencial, como por exemplo a de Gram, para ao microscópio serem analisadas características como o tamanho, forma celular e tipo de aglomeração celular (Brachman e Abrutyn, 2009).

A análise das propriedades bioquímicas das bactérias subordina-se ao uso de testes bioquímicos para diferenciar organismos com base na sua actividade metabólica. É reconhecido que o poder discriminatório da análise depende do número de testes realizados (quantos mais testes, maior é o poder) e que podem ocorrer alterações na actividade metabólica do organismo induzidas pelas condições de crescimento (como a concentração de nutrientes e pH do meio nutriente e a temperatura de incubação) podendo originar resultados atípicos, tornando por vezes pouco fiável este tipo de análise. Em países desenvolvidos os testes geralmente aplicados são resultantes de kits e sistemas automáticos, o que permitiu um acréscimo de rapidez e fiabilidade nesta metodologia (Brachman e Abrutyn, 2009).

A análise das propriedades serológicas das bactérias permite a sua identificação em serogrupos, examinando a resposta serológica específica dos anticorpos do hospedeiro na presença dos antigénios da bactéria invasora. Na identificação serológica, os antigénios que induzem a resposta dos anticorpos poderão ser as proteínas e polissacarídeos bacterianos. Os testes aplicados na identificação dos serogrupos poderão ser o teste de aglutinação antigénio específico – anticorpo, teste ELISA, teste de aglutinação com partículas de látex, teste *Western Blot*, ou uma modificação de qualquer um deles. Uma limitação deste tipo de análise é que várias estirpes da mesma espécie podem possuir antigénios com reacção cruzada originando falsos positivos, sendo este um método caro e laborioso geralmente confiando aos laboratórios de referência (Brachman e Abrutyn, 2009).

A análise das propriedades funcionais e fisiológicas assenta na determinação da resposta bacteriana a manipulações específicas como susceptibilidade a agentes antibióticos (antibiogramas), lise ou susceptibilidade a bacteriófagos, padrões de associação a cultura de tecidos, toxicidade, sobrevivência sob stress *in vivo* ou *in vitro* e expressão metabólica enzimática (Brachman e Abrutyn, 2009).

Actualmente a identificação clássica de bactérias, quando não são utilizados kits comerciais ou sistemas automáticos, baseia-se na comparação das características do isolado a ser

identificado com as constantes em manuais de referência como o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* e o *Manual of Clinical Microbiology* ou nas compilações de resultados para estirpes bem caracterizadas como as presentes no *Centers for Disease Control and Prevention* ou no *American Type Culture Collection* (ATCC) que publicam tabelas sumarizando as características de cada espécie de bactérias (Clarridge, 2004; Krieg e Holt, 1984;). Inúmeras vezes acontece as características do isolado não coincidirem com as das espécies já descritas, tendo de ser feito um julgamento acerca da identificação mais provável, e apesar de existirem esquemas e programas para ajudar na decisão, as identificações podem variar entre laboratórios (Clarridge, 2004).

Os métodos clássicos, também denominados de convencionais, de tipagem bacteriana são considerados métodos fenotípicos, os quais são baseados na detecção de fenótipos ou características expressadas pelo organismo estudado. Por outro lado, os métodos moleculares de tipagem bacteriana, abordados no próximo tópico, são considerados métodos genotípicos, por assentarem na análise dos ácidos nucleicos do organismo (Brachman e Abrutyn, 2009).

### 2.2.3 - METODOLOGIAS MOLECULARES DE IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS

Os bioaerossóis têm sido tradicionalmente monitorizados com recurso à microscopia óptica ou métodos baseados em cultura em meios nutrientes, contudo estes métodos são laboriosos, demorados, subjectivos e com baixa especificidade e sensibilidade (Stetzenbach *et al*, 2004). Tendo em conta estas vicissitudes, é importante a implementação de métodos moleculares nas monitorizações da QAI, as quais permitirão um aumento de sensibilidade e especificidade a par com um decréscimo do tempo de análise (Stetzenbach *et al*, 2004).

A identificação de bactérias por metodologias moleculares (ou genotipagem) é baseada nas diferenças das sequências de ácidos nucleicos. Contrariamente às inúmeras formas de caracterização fenotípica realizadas na identificação clássica, a caracterização por genotipagem pode ser agrupada em três tipos principais de processos analíticos: a hibridação, a electroforese e a sequenciação (Brachman e Abrutyn, 2009).

Novas técnicas e aplicações estão sendo desenvolvidas para a análise de agentes infecciosos, como as bactérias, com a vantagem de maior especificidade, sensibilidade e segurança, sendo possível a análise de amostras inactivadas e não isoladas (Murray *et al*, 2005).

A biologia molecular deu os primeiros passos no seu contributo para a taxonomia e identificação bacteriana na década de 1960, ao serem feitos estudos da proporção de conteúdo de Guanina e Citosina no DNA bacteriano, ajudando assim a distinguir grupos taxonómicos não relacionados (Rosselló-Mora e Amann, 2001).

O passo seguinte foi a utilização da hibridação de DNA marcado com o DNA bacteriano como forma de identificação de espécies bacterianas. Este marco firmou o contributo da genética nas áreas da sistemática e filogenia, tendo sido criada a definição quantitativa de espécie. Esta considerava a mesma espécie quando ocorria uma hibridação superior a 70% com uma diferença de temperatura de fusão do DNA inferior ou igual a 5°C entre o DNA marcado e do DNA da amostra (Wayne *et al*, 1987). No entanto, a técnica de hibridação do DNA é cara, difícil, complexa e trabalhosa, sendo geralmente restrita a poucos centros de pesquisa mundiais, pelo que actualmente poucos laboratórios a utilizam (Fournier *et al*, 2003; Janda e Abbott, 2002). As técnicas de hibridação mais comuns e utilizadas na identificação bacteriana são a *Dot Blot*, a qual não requer electroforese pois a sonda está num filtro, e as baseadas em electroforese *Southern Blot* (hibridação DNA-DNA) e *Northern Blot* (hibridação RNA-DNA) (Murray *et al*, 2005).

Outra técnica de hibridação mas mais vocacionada para a análise de comunidades bacterianas e outras áreas como a expressão genica e detecção de mutações, é a de *Microarrays*, em que as sondas de DNA estão fixas numa superfície sólida, podendo estas serem complementares a genes individuais (*cDNA microarrays*) ou a oligonucleótidos (*oligonucleotide microarrays*) (Lucchini *et al*, 2001). Esta técnica foi já demonstrada na identificação bacteriana, tendo sido utilizada na identificação de espécies de *Mycobacterium* (Troesch *et al*, 1999), e num estudo com o uso de *microarrays* baseados nos genes do RNA ribossomal, cujos resultados são comparáveis favoravelmente aos da análise de sequências para a detecção de presença de grupos filogenéticos (Wilson *et al*, 2002).

A PCR foi inicialmente demonstrada como meio para detectar bactérias e vírus nas amostras de ar em 1994 (Srikanth *et al*, 2008). A utilização de primers de PCR específicos para uma espécie de bactéria pretendida permite a detecção desta numa amostra ambiental, sem haver lugar ao cultivo e isolamento das bactérias (Dungan e Leytem, 2009; Peccia e Hernandez, 2006). A PCR produz milhões de cópias de uma região do DNA em poucas horas, permitindo a aplicação de várias técnicas moleculares posteriormente (Murray *et al*, 2005). O método mais comum de análise do DNA após amplificação por PCR é a electroforese em gel de agarose ou poliacrilamida (Dungan e Leytem, 2009), mas este pode ser sujeito a processamento adicional como *fingerprinting* genético, *microarrays* e análise de biblioteca de clones (Dungan e Leytem, 2009). As análises baseadas em PCR têm um enorme potencial para descrição da fracção biológica dos aerossóis, expandindo a diversidade de microorganismos e material biológico que pode ser detectado, identificado e quantificado (Peccia e Hernandez, 2006).

Existem variantes da PCR, como a *Real Time* PCR (RT-PCR) que permite a quantificação rápida de DNA nas amostras e até identificação específica utilizando sondas, medindo a

fluorescência da solução proporcionada por reagentes específicos durante a realização da PCR (Murray *et al*, 2005). Esta técnica tem sido utilizada na identificação e quantificação de determinadas espécies bacterianas presentes em vários ambientes, incluindo o ar (Dungan e Leytem, 2009).

A conversão de RNA bacteriano em DNA complementar com a enzima transcriptase reversa também permite a detecção de bactérias por PCR mas com a vantagem de ser um bom indicador de viabilidade do organismo, pois o RNA tem uma meia-vida muito curta (Bej *et al*, 1991).

A análise da separação electroforética de DNA digerido por enzimas de restrição é denominada de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), servindo para distinguir grupos taxonómicos de bactérias, inclusive até à estirpe (Murray *et al*, 2005), sendo a variante aplicada ao DNA ribossomal bacteriano amplificado por PCR denominada de *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* (ARDRA) (Dungan e Leytem, 2009). Cada enzima de restrição reconhece uma determinada sequência de DNA e corta-a nesse local, ocorrendo em genomas diferentes locais de corte diferentes, o que implica um padrão de bandas distinto na electroforese. O padrão de RFLP pode ser obtido em gel de agarose ou poliacrilamida com electroforese convencional para fragmentos inferiores a 20.000 pares de bases enquanto para fragmentos maiores, como genomas bacterianos completos, tem de ser aplicada uma técnica electroforética denominada *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE)(Murray *et al*, 2005).

A técnica RFLP é considerada um método de *fingerprinting* genético e existem variantes como a *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* (T-RFLP) que utiliza *primers* fluorescentes na PCR, sendo depois o DNA amplificado digerido com a enzima de restrição e determinados os tamanhos dos fragmentos terminais marcados num sequenciador (Dungan e Leytem, 2009).

A técnica de RFLP também tem sido utilizada na detecção de dispersão de estirpes de bactérias entre pacientes em hospitais (Crocomo, 2005; Ferreira, 2005; Murray *et al*, 2005; Nunes, 2005) e no agrupamento em *Operational Taxonomic Units* (OTU) de amostras ambientais bacterianas, permitindo agrupá-las por similaridade genética (Maron *et al*, 2005; Polymenakou *et al*, 2008), reduzindo o número de sequenciações necessárias para identificação das espécies existentes (Polymenakou *et al*, 2008).

Outro método de *fingerprinting* genético é a *Ribosomal Intergenic Spacer Analysis* (RISA), que explora a variabilidade do comprimento da região genómica do espaço entre os genes ribossomais 16S e 23S (Ranjard *et al*, 2001), sendo esta metodologia mais vocacionada para a análise de comunidades bacterianas ambientais e ainda pouco utilizado na identificação e estudo filogenético (Dungan e Leytem, 2009).

Por fim, o terceiro tipo principal de técnica utilizada na identificação bacteriana, a técnica de sequenciação, é abordado no próximo tópico.

A utilização de técnicas moleculares em alternativa aos métodos bioquímicos tornou-se particularmente útil para identificações rotineiras, especialmente de bactérias inusuais, fastidiosas ou de crescimento lento, bem como para aquelas dificilmente diferenciadas pelos métodos convencionais traduzindo-se numa sensibilidade acrescida sobre os outros métodos (Mignard e Flandrois, 2006).

Actualmente os dois principais e fiáveis métodos moleculares de quantificação de bactérias do ar são a PCR quantitativa e a PCR competitiva (Stetzenbach *et al*, 2004), enquanto o método molecular de identificação mais comum é a sequenciação do gene 16S rRNA (Clarridge, 2004; Rantakokko-Jalava *et al*, 2000; Wilson, 1995). Os métodos moleculares mais comuns nos estudos populacionais de bactérias incluem o *fingerprinting* genético, análise de biblioteca de clones, DNA *microarrays* e PCR quantitativa (Peccia e Hernandez, 2006).

As técnicas moleculares de identificação bacteriana têm a vantagem de permitirem-nos estudar todas, ou quase todas, as bactérias presentes num dado volume de ar, com ou sem combinação de técnicas de cultura, tornando possível detectar a identidade, distribuição e abundância de microorganismos em ambientes complexos e diversos (Albuquerque *et al*, 2008; Dungan e Leytem, 2009; Tringe e Hugenholtz, 2008).

### 2.2.3.1 - A SEQUENCIAÇÃO DO GENE 16S RRNA

O mundo da taxonomia molecular foi revolucionado na década de 1980 com a análise de sequências de cronómetros moleculares como o rRNA (Rosselló-Mora e Amann, 2001; Woese *et al*, 1985). Woese e colegas demonstraram que a relação filogenética entre bactérias poderia ser determinada pela comparação de uma zona estável do DNA, como os genes codificadores do rRNA (Woese *et al*, 1985). Entre as regiões genómicas passíveis de utilização estavam os genes codificadores do RNA ribossomal pertencentes à subunidade 5S, à 16S (também chamada de pequena subunidade ribossomal), à 23S e o espaço entre estes últimos genes (Woese *et al*, 1985; Woese, 1987).

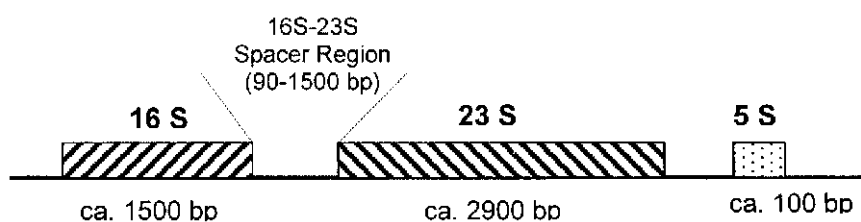


Figura 1 – Organização estrutural dos genes do RNA ribossomal em bactérias (Sachse e Frey, 2003)

Em meados da década de 1990, a sequenciação da pequena subunidade ribossomal 16S rRNA já era considerada uma ferramenta padrão para os taxonomistas na área da microbiologia, não apenas para aferir relações filogenéticas mas também para identificação bacteriana (Cai *et al*, 2003; Kolbert e Persing, 1999; Mignard e Flandrois, 2006; Rosselló-Mora e Amann, 2001; Weisburg *et al*, 1991;), continuando hoje em dia a ser a região genómica mais utilizada na taxonomia bacteriana (Clarridge, 2004; Wilson, 1995).

O gene 16S rRNA tem sido utilizado na detecção de um vasto espectro de bactérias (Yang *et al*, 2008), especialmente nas mais problemáticas e fenotipicamente difíceis de identificar (Xu *et al*, 2004).

O gene 16S rRNA ocupa um lugar especial no estudo da ecologia e evolução microbiana (Tringe e Hugenholtz, 2008). Este gene ocorre em todas as bactérias podendo ser comparado não só entre grupos bacterianos mas também com o gene 16S rRNA das arqueobactérias e o gene 18S rRNA dos eucariotas (Pace, 1997; Palys *et al*, 1997; Weisburg *et al*, 1991; Woese *et al*, 1985; Woese, 1987).

Este gene acumula mutações a uma taxa muito lenta e constante ao longo do tempo, podendo ser usado como “relógio molecular” (Woese, 1987; Xu *et al*, 2007). Crê-se que a baixa taxa de mutação deste gene tem origem na grande importância da codificação de um componente crítico da função celular, uma das subunidades do ribossoma, existindo poucos outros genes tão conservados como este, servindo assim para determinar distância evolutiva e relação filogenética entre organismos (Kimura, 1980; Pace, 1997; Thorne *et al*, 1998).

A taxa de mutação absoluta do gene 16S rRNA ainda não foi determinada devido a dificuldades como o facto de haver diferentes taxas em diferentes organismos, a taxa de mutação ser variável ao longo da evolução e haver taxas diferentes ao longo do gene (Ueda *et al*, 1999; Tortoli, 2003)

O gene 16S rRNA contém cerca de 1550 pares de bases e é composto por regiões conservadas e variáveis, sendo que estas últimas apresentam assinaturas únicas para qualquer bactéria, e informação útil sobre a relação entre as mesmas (Cai *et al*, 2003; Clarridge, 2004; Song *et al*, 2003; Xu *et al*, 2007). Geralmente são usados primers universais complementares às regiões conservadas no início do gene e na região dos 540 pb, ou alternativamente no fim do gene nos 1550 pb, para a amplificação por PCR do gene, sendo as zonas variáveis utilizadas na taxonomia comparativa (Clarridge, 2004; Stetzenbach *et al*, 2004). A sequenciação dos primeiros 500 pb, que inclui as zonas variáveis V1, V2 e V3 pode ser utilizada na identificação bacteriana, resultando em identificações mais precisas que a região final do gene, que inclui as zonas variáveis V7, V8 e V9, e precisão similar à sequenciação completa do gene para identificação até ao género, mas inferior na identificação até à espécie (Cai *et al*, 2003).

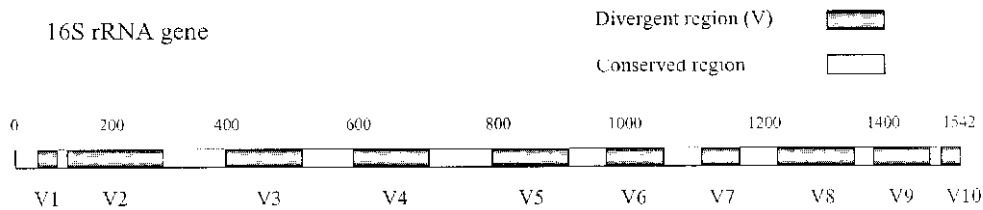


Figura 2 – Esquema do gene 16S rRNA e indicação das zonas variáveis e conservadas (Cai *et al*, 2003)

As regiões genómicas em redor do gene 16S rRNA (Figura 1) também têm sido usadas por alguns autores para o estudo filogenético de bactérias, servindo para distinguir espécies impossíveis de distinguir pelo gene 16S rRNA, como no caso de *Mycobacterium* utilizando o espaço entre o gene 16S e 23S rRNA (Roth *et al*, 1998) e *Streptococcus* usando o gene 23S rRNA (Rantakokko-Jalava *et al*, 2000). No entanto, a análise do gene 16S rRNA é considerada muito mais útil para a análise filogenética que a região entre o gene 16S e 23S rRNA (Song *et al*, 2004).

O gene 16S rRNA é considerado mais fiável que os genes codificadores de proteínas na obtenção de árvores filogenéticas para análises de relações de taxonomia e filogenia distantes em termos evolutivos (Krieg e Holt, 1984; Gupta e Maiden, 2001). No entanto, para a detecção epidemiológica de estirpes bacterianas virulentas, a análise do gene 16S rRNA geralmente não é adequada por não ter suficiente variação intra-específica e a região não codificar factores de virulência (Clarridge, 2004). Se o objectivo de um trabalho é a identificação de um organismo desconhecido sem haver conhecimento prévio do mesmo, a sequenciação do gene 16S rRNA é uma excelente e extensivamente usada ferramenta (Clarridge, 2004; Mignard e Flandrois, 2006).

O gene 16S rRNA também pode ser designado de 16S rDNA e a terminologia tem sido usada de ambas as formas na literatura, sendo política corrente da *American Society for Microbiology* a utilização do termo 16S rRNA como a forma correcta (Clarridge, 2004).

A recente automatização da sequenciação do gene 16S rRNA, com instrumentos como o *ABI Prism 377 DNA Sequencer* da *Applied Biosystems*, originou uma rápida obtenção de sequências, permitindo análises comparativas das sequências com as depositadas em bases de dados de microorganismos (Jenks, 1998).

Hoje em dia, as bactérias cuja identificação não é possível pelos métodos comerciais convencionais geralmente são sujeitas a sequenciação do gene 16S rRNA para poderem ser identificadas definitivamente (Woo *et al*, 2001). Isto acontece sobretudo nas estirpes que apresentam um perfil bioquímico raro, as quais têm uma pequena probabilidade de identificação aceitável de acordo com sistemas comerciais, e nos taxa raramente associados a doenças humanas infecciosas (Janda e Abbott, 2007).

A sequenciação do gene 16S rRNA passou a ser hoje em dia o *gold standard*, ou padrão de referência, para a definição de espécies e gêneros bacterianos, substituindo a hibridação DNA-DNA nesse papel de relevo, constituindo uma parte essencial da descrição de novos organismos (Harmsen e Karch, 2004; Fournier *et al*, 2003) e sendo por vezes a única forma possível de detectar, identificar e descrever bactérias não cultiváveis (Fredricks e Relman, 1996; Relman *et al*, 1992).

A sequenciação do gene 16S rRNA tradicionalmente teve um papel limitado na identificação de microorganismos nos laboratórios de microbiologia clínica, sobretudo devido aos elevados custos, requerimentos de grandes conhecimentos técnicos, falta de software comparativo de sequências de fácil utilização e bases de dados válidas. Contudo, os melhoramentos nas técnicas de sequenciação, nas bases de dados com grande aumento do número de sequências disponíveis e nos kits e *software* mais fáceis de utilizar fizeram desta tecnologia uma alternativa competitiva às técnicas tradicionais de identificação microbiana para alguns grupos de organismos, como as *Mycobacteria* e outras bactérias de crescimento lento e difíceis de identificar (Clarridge, 2004).

#### 2.2.3.2 – IDENTIFICAÇÃO POR SEQUENCIAÇÃO DO GENE 16S RRNA

A comparação da sequência do gene 16S rRNA do isolado bacteriano com as depositadas em bases de dados permite a identificação deste com base na similaridade ou homologia da sequência do gene 16S rRNA (Clarridge, 2004).

Não existem critérios definidos e consensuais que definam o que constitui uma espécie com base na similaridade da sequência de DNA do gene 16S rRNA (Fox *et al*, 1992; Janda e Abbott, 2002; Krieg e Holt, 1984).

É geralmente aceite que um isolado bacteriano cuja sequência de DNA do gene 16S rRNA tenha similaridade inferior a 97% com o vizinho filogenético mais próximo seja considerado um novo taxon (Janda e Abbott, 2002). No entanto, mesmo quando a taxa de similaridade supera os 97%, o isolado pode não pertencer à mesma espécie (Stackebrandt e Goebel, 1994).

Uma homologia na sequência do gene 16S rRNA igual ou superior a 99% deverá indicar a pertença à mesma espécie (Bosshard *et al*, 2003; Drancourt *et al*, 2000), enquanto uma similaridade entre 95% e 99% (Bosshard *et al*, 2003), ou 97% a 99% (Drancourt *et al*, 2000), indicará a pertença ao mesmo género. Outros autores definem que para pertencer à mesma espécie, a similaridade entre sequências tem de ser superior a 99,5% (Woo *et al*, 2001), enquanto outros indicam o máximo de 5 a 15 pb de diferença entre sequências completas do gene (Fox *et al*, 1992), existindo ainda vários outros limites criados por outros autores (Clarridge, 2004).

O isolado bacteriano deverá ser considerado como não identificável por sequenciação do gene 16S rRNA se apresentar uma homologia idêntica a 2 ou mais sequências de espécies diferentes (Cai *et al*, 2003) ou se apresentar uma homologia inferior a 97% (Drancourt *et al*, 2000).

Não é possível definir o valor de similaridade que delimita o gênero ou a espécie porque diferentes valores são obtidos analisando diferentes bases de dados, usando diferentes métodos de cálculo ou considerando apenas 500 pb ou o total de 1500 pb do gene 16S rRNA (Clarridge, 2004), sendo provável também que um único valor não seja apropriado para todos os gêneros bacterianos (Fournier *et al*, 2003; Harmsen e Karch, 2004; Thorne *et al*, 1998).

Um levantamento realizado por Clarridge (2004) determinou a dissimilaridade genética média entre espécies dentro do gênero, calculada para 80 gêneros, tendo esta variado entre 0,5% a 17,3%, indicando assim que utilizando os critérios estipulados por vários autores, certas espécies distintas deveriam ser consideradas como uma só, enquanto outras deveriam pertencer a gêneros distintos.

É também importante considerar a necessidade de sequenciar apenas os primeiros 500 pb ou os cerca de 1500 pb do gene todo. Por vezes é necessário sequenciar o gene todo para distinguir certos taxa e estirpes, ou para a descrição de um novo taxon, mas na maioria dos casos de isolados bacterianos clínicos, os primeiros 500 pb disponibilizam suficiente diferenciação para a identificação. A árvore filogenética realizada para bactérias com a sequência de 500 pb e 1500 pb não difere muito, sendo a sequenciação de apenas 500pb mais fácil e barata (Cai *et al*, 2003; Clarridge, 2004). No caso de isolados bacterianos não clínicos, é considerado que a sequenciação completa do gene resulta em identificações mais precisas que apenas a sequenciação dos primeiros 500 pb (Cai *et al*, 2003).

As bases de dados com sequências do gene 16S rRNA que são melhor conhecidas e disponíveis na internet são o *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), a *Ribosomal Database Project* (RDP-II ou RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>), a *Ribosomal Database Project European Molecular Biology Laboratory* (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>), a *Smart Gene IDNS* (<http://www.smartgene.ch>), e a *Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms* (RIDOM) (<http://www.ridom.com/>) (Clarridge, 2004).

A ferramenta *Bio Informatic Bacteria Identification* da Universidade de Lyon em França (<http://umr5558-sud-str1.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi>) disponibiliza a identificação de bactérias de forma simples e automática a partir das sequências de DNA do isolado a ser identificado, usando por base parte das sequências disponíveis no *GenBank*. Estas sequências são filtradas para entrarem nesta base de dados e são disponibilizadas em conjuntos agrupados por gene sequenciado, estirpes tipo apenas ou todas as estirpes, e por

nomenclatura válida e confirmada apenas ou todas, incluindo as incertas. A BIBI combina ferramentas de pesquisa de similaridade de sequências com programas de filogenia, devolvendo aquando da sua utilização uma tabela com a identificação taxonómica, ou várias identificações possíveis, da amostra e árvore filogenética com as sequências mais próximas à da amostra, disponibilizando também o acesso ao alinhamento das sequências (Devulder *et al*, 2003).

Existe também a base de dados *MicroSeq 500 bacterial database* da *Applied Biosystems*, a qual utiliza os primeiros 500 pb da sequência do gene 16S rRNA (Fontana *et al*, 2005), e que tem de ser adquirida para uso, a qual na sua versão 1.4.2 contém sequências de 1434 espécies ou subespécies de 235 géneros bacterianos (Clarridge, 2004).

O *GenBank*, a maior base de dados de sequências nucleotídicas tinha em 2004 mais de 20 milhões de sequências depositadas, das quais mais de 90 mil referentes ao gene 16S rRNA (Clarridge, 2004), registando actualmente um total de mais de 108 milhões de sequências das quais mais de 2 milhões relativas ao gene 16S rRNA em bactérias. Esta base de dados não é verificada ou revista (*peer reviewed*), aceitando qualquer nome e sequência que sejam depositados, o que implica a existência de erros (Clarridge, 2004). Outras falhas como ambiguidades abundantes, *gaps* nas sequências e erros nas sequências foram já reportadas, bem como homologia entre estirpes da mesma espécie a atingir valores de 85%, pelo que é aconselhável utilizar apenas as estirpes tipo para restringir o uso de sequências com possíveis erros de identificação taxonómica (Song *et al*, 2003).

A base de dados RDP-II, com a sua funcionalidade *Classifier*, permite a rápida e precisa classificação de bactérias em grupos taxonómicos até ao género de acordo com o *Bergey's Taxonomic Outline of the Prokaryotes* e com cálculos de confiança para cada grupo (Wang *et al*, 2007). Esta base de dados incorpora sequências seleccionadas a partir do *GenBank*, contra as quais a pesquisa de similaridade é efectuada (Song *et al*, 2003; Wang *et al*, 2007), registando um total de mais de 300 mil sequências em 2007 e um incremento mensal de cerca de 5000 sequências (Wang *et al*, 2007).

Independentemente da base de dados seleccionada, para uma boa identificação de um isolado bacteriano com base na sequência do gene 16S rRNA são necessárias sequências correctas nas bases de dados, nomes correctos associados a essas sequências e uma correcta sequência do isolado a ser identificado (Clarridge, 2004).

---

### 2.2.3.3 - VANTAGENS DA SEQUENCIAÇÃO DO GENE 16S RRNA

Todos os sistemas usados para identificar bactérias, quer sejam fenotípicos ou genotípicos, têm limitações, não existindo nenhuma metodologia única que forneça resultados 100% precisos (Janda e Abbott, 2002).

A sequenciação do gene 16S rRNA é actualmente o padrão de referência para a identificação e descrição de novas espécies e géneros bacterianos, sendo muito comum e recomendada a sua publicação como parte da descrição de novas espécies (Clarridge, 2004; Stackebrandt *et al*, 2002).

Tem havido um grande incremento da descrição de novas taxa bacterianos devido à disponibilidade da técnica e conhecimento necessários para a sequenciação dos genes ribossomais, aliado à facilidade com que se conseguem sequenciar genes (Janda e Abbott, 2002; Tortoli, 2003; Tringe e Hugenholtz, 2008), levando à possibilidade de descoberta de novos patogéneos (Clarridge, 2004).

A clonagem e sequenciação do gene 16S rRNA de amostras ambientais permite detectar uma maior diversidade microbiana que a detectadas por métodos baseados em cultura (Pace, 1997).

A sequenciação permite uma identificação bacteriana que é mais robusta, reproduzível e exacta que a obtida por testes fenotípicos, cujos resultados são mais subjectivos (Cai *et al*, 2003; Clarridge, 2004; Song *et al*, 2003). Trabalhos de sequenciação de bactérias difíceis, ou mesmo impossíveis, de identificar por testes fenotípicos permitiram concluir que cerca de 90% desses isolados podem ser identificados (Cai *et al*, 2003; Drancourt *et al*, 2000; Song *et al*, 2003) e que apenas cerca de 55% das identificações fenotípicas estavam correctas até ao género (Cai *et al*, 2003; Song *et al*, 2003).

A sequenciação permite uma identificação mais precisa de bactérias pobremente descritas, raramente isoladas ou pertencentes a estirpes aberrantes, comparativamente à identificação por testes fenotípicos, reduzindo os provavelmente frequentes erros de identificação por esta última metodologia (Clarridge, 2004).

Espécies de bactérias difíceis de distinguir fenotipicamente podem sê-lo facilmente recorrendo à sequenciação, como por exemplo *Nocardia asteroides* ATCC 19247 e *N. farcinica* ATCC 3318 com 13 pb de diferença (Bosshard *et al*, 2003; Cai *et al*, 2003; Clarridge, 2004; Roth *et al*, 2003).

A sequenciação quando combinada com técnicas independentes de cultura bacteriana tem a vantagem de permitir a detecção e identificação de bactérias não viáveis (Dungan e Leytem, 2009; Polymenakou *et al*, 2008; Tringe e Hugenholtz, 2008).

A sequenciação do gene 16S rRNA é por vezes a única forma possível de detectar bactérias não cultiváveis (Fredricks e Relman, 1996; Relman *et al*, 1992), facilitando também a identificação de bactérias com requisitos de crescimento inusuais (Rantakokko-Jalava *et al*, 2000).

As bactérias difíceis de identificar fenotípicamente, por serem inertes ou não reactivas aos testes bioquímicos ou aos sistemas comerciais de identificação, por haver falta de testes bioquímicos específicos, por apresentarem reactividade bioquímica inusual ou mesmo falta de existência da mesma nas bases de dados, poderão ser identificadas por sequenciação do gene 16S rRNA (Cai *et al*, 2003).

A sequenciação do gene 16S rRNA permite corrigir erros taxonómicos ao distinguir facilmente bactérias cuja posição filogenética não foi bem aplicada por ter sido realizada com base apenas em testes fenotípicos (Clarridge, 2004; Tortoli, 2003), nomeadamente:

- 1) Estirpes duma mesma espécie que podem ser geneticamente diferentes para serem consideradas espécies ou mesmo géneros diferentes. Exemplo: *Enterobacter (Pantoea) agglomerans* (bg1) e *Enterobacter (Pantoea) agglomerans* (bg2) com 27 pb de diferença (Clarridge, 2004).
- 2) Espécies dum mesmo género que são tão diferentes geneticamente que não podem pertencer ao mesmo género. Exemplo: *Clostridium tetani* ATCC 19406 e *Clostridium innocuum* ATCC 14501 com cerca de 104 pb de diferença (Clarridge, 2004).
- 3) Espécies mal identificadas podem ser rectificadas. Exemplo: *Mycobacterium duvalii* e "*M. valentiae*" com sequência igual (Clarridge, 2004).
- 4) Bactérias geneticamente semelhantes demais para serem consideradas pertencentes a géneros diferentes. Exemplo: *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 e *Leclercia (Enterobacter) adecarboxylata* ATCC 23216 com 1 a 2 pb de diferença (Clarridge, 2004).
- 5) Subespécies distintas demais para pertencerem à mesma espécie. Exemplo: *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e subsp. *equisimilis* com 14 pb de diferença (Clarridge, 2004).

A sequenciação do gene 16S rRNA pode ser obtida em rapidamente, num período que dura entre algumas horas a cerca de 2 dias de trabalho utilizando apenas uma porção de uma colónia ou directamente do espécimen recolhido (Cook *et al*, 2003; Peccia e Hernandez, 2006; Tang *et al*, 1998).

O custo da sequenciação do gene 16S rRNA pode ser inferior ao de identificação por métodos convencionais bioquímicos, pelo menos no caso de bactérias do género *Mycobacterium* que são difíceis de identificar (Cook *et al*, 2003).

A sequenciação permite o estudo e identificação de bactérias proveniente de amostras ambientais, como as provenientes de lamas e águas residuais, sem haver necessariamente o isolamento e cultivo individual das mesmas, sendo possível determinar a composição bacteriana desse ambiente (Horn e Wagner, 2001; Pace, 1997; Schmalenberger *et al*, 2001).

Se a bactéria a identificar for proveniente de amostra clínica de um paciente sujeito a tratamento com antibióticos, o efeito deste poderá inibir o crescimento da bactéria em meios de cultura para identificação fenotípica, sendo apenas possível a sua detecção e identificação por métodos moleculares como a sequenciação do gene 16S rRNA (Goldenberger *et al*, 1997; Jalava *et al*, 1995; Rantakokko-Jalava *et al*, 2000).

A sequenciação pode ser usada na confirmação de detecções positivas em instrumentos automáticos de detecção de crescimento bacteriano em culturas quando o crescimento não é aparente, permitindo distinguir os verdadeiros dos falsos positivos (Qian *et al*, 2001).

Se a identificação do agente causador da infecção de um paciente for realizada por sequenciação, a rapidez da obtenção de resultados e a sua superior exactidão permitem redireccionar o tratamento antimicrobiano, resultando no aperfeiçoamento do tratamento clínico de pacientes, com conseqüente redução de efeitos e custos, quer para o paciente, quer para o sistema de saúde (Järvinen *et al*, 2009; Tang *et al*, 1998).

Por fim, a implementação de um programa de controlo de infecções que inclua a tipagem molecular está associada a uma redução de 11% de IN (Curtis, 2008).

#### 2.2.3.4 - DESVANTAGENS DA SEQUENCIAÇÃO DO GENE 16S RRNA

Os custos associados à sequenciação para identificação de amostras clínicas de rotina são considerados como o maior obstáculo à sua implementação nos laboratórios de microbiologia (Boudewijns *et al*, 2006), pois são mais caros que a maioria dos métodos tradicionais (Clarridge, 2004; Song *et al*, 2003). Adicionalmente, o custo de acesso a bases de dados comerciais para identificação é outro factor (Boudewijns *et al*, 2006).

Outra desvantagem relaciona-se com o uso de bases de dados públicas, como o *GenBank*, cujas sequências depositadas não são revistas (*peer reviewed*), podendo qualquer utilizador depositar sequências de má qualidade com erros e ambiguidades, incompletas e com identificação insuficiente (Boudewijns *et al*, 2006).

Apesar de as sequências serem dados objectivos, a interpretação das mesmas para estabelecer a identificação não o é, pois não existem critérios universalmente aceites para a identificação de isolados bacterianos com base na sequência do gene 16S rRNA (Boudewijns *et al*, 2006; Janda e Abbott, 2002).

Os limites de similaridade para a identificação de isolados como pertencentes a um determinado taxon poderão originar falsas identificações, pois existem casos reportados de violação desses limites entre espécies, existindo espécies reconhecidamente distintas que segundo os limites recomendados deveriam ser consideradas a mesma espécie (Janda e Abbott, 2002).

A variação da sequência de DNA entre espécies ou gêneros é menos evidente na sequenciação do gene 16S rRNA, pois o gene é altamente conservado, do que com outros métodos moleculares como a hibridação (Janda e Abbott, 2002).

Existe polimorfismo intracelular devido à existência de várias cópias do gene que poderão ter diferente sequência genética, o que origina dificuldades na interpretação da sequenciação, criando ambiguidades na sequência obtida (Ninet *et al*, 1996).

O facto da sequenciação do gene 16S rRNA ter se tornado o padrão de referência para a identificação taxonómica de bactérias, existindo previamente categorias taxonómicas atribuídas com base nos testes fenotípicos, originou vários tipos de incongruências que podem levar a erros na identificação (Clarridge, 2004), nomeadamente:

- 1) Existência de genótipos iguais com fenótipos diferentes – diferentes espécies próximas podem exibir uma muito baixa ou mesmo nula diferença entre a sequência do gene 16S rRNA, apesar de fenotipicamente estarem identificadas e confirmadas como espécies distintas, estando a sua similaridade dentro do patamar considerado para serem a mesma espécie. Exemplo: *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 27294, *M. bovis* ATCC 19210 e *M. africanum* ATCC25420 com sequência igual (Clarridge, 2004).
- 2) Existência de genótipos similares mas fenótipos distintos – isolados de espécies ou até gêneros diferentes podem apresentar uma homologia genética muito elevada, a qual levaria a considerá-las a mesma espécie, apesar de serem historicamente e clinicamente distintos. Exemplo: *E. coli* ATCC 11775 e *Shigella dysenteriae* ATCC 13313 com 3 pb de diferença (Clarridge, 2004).

As sequências antigas depositadas no *GenBank* têm baixa precisão, sendo habitual encontrar bases ambíguas (Clayton *et al*, 1995), o que poderá originar elevadas taxas de homologia entre sequências que levam a uma incorrecta identificação.

Os sistemas comerciais baseados em testes bioquímicos têm servido bem os laboratórios de microbiologia na identificação rotineira de agentes infecciosos de importância médica, sendo possível a realização de elevado número de testes simultaneamente e sendo rápidos e precisos na identificação de espécies comuns e a um baixo custo comparativamente às técnicas moleculares (Janda e Abbott, 2002).

Este tipo de análise, quando aplicado a amostras processadas independentemente de métodos de cultura, é incapaz de distinguir entre os microorganismos viáveis e não viáveis. Enquanto os microorganismos patogénicos não viáveis não apresentam um risco de doença infecciosa, a presença do seu DNA na amostra irá sempre produzir um resultado positivo, tornando impossível determinar se o resultado positivo representa um potencial perigo de doença. Uma detecção positiva dos organismos alvos significa que uma amostra contém células viáveis, inviáveis ou ambas (Dungan e Leytem, 2009).

### 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 – CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE ESTUDO

O Hospital Dr. João de Almada fica localizado na Rampa da Quinta do Leme, Freguesia do Monte, Concelho do Funchal, Ilha da Madeira, Portugal. O edifício está implantado a Norte da cidade do Funchal, a uma altitude aproximada de 350 metros acima do nível do mar.

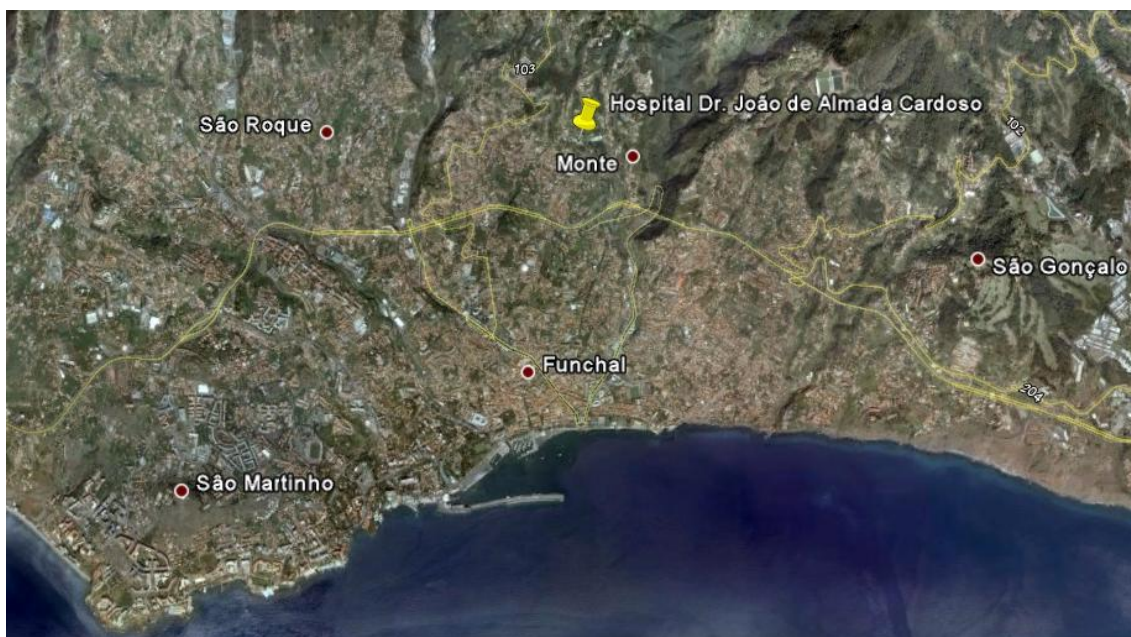


Figura 3 – Localização do Hospital Dr. João de Almada na cidade do Funchal. Adaptado de *Google Earth*.

A área circundante ao edifício caracteriza-se por ser constituída maioritariamente por habitações particulares e pela ocorrência de vegetação de porte arbustivo e arbóreo.



Figura 4 – Vista aérea do Hospital Dr. João de Almada e área circundante. Adaptado de *Google Earth*.

O edifício do HJA tem aproximadamente 120 metros de comprimento por 20 metros de largura, tendo a zona central com cerca de 35 metros de largura. Apresenta 4 pisos, onde no piso 0 concentram-se as salas ocupacionais de tempos livres, lavandaria e gabinetes médicos, no piso 1 encontram-se localizados alguns quartos, a entrada principal de visitantes, cozinha, bar e serviços administrativos, enquanto nos pisos 2 e 3 existem maioritariamente apenas quartos dos pacientes.

Os locais amostrados não apresentavam sistemas de climatização do ar, pelo que a ventilação existente era apenas a resultante do efeito natural do vento e diferenças de pressão do ar.

### 3.1 - PLANEAMENTO DAS AMOSTRAGENS

Os locais de amostragem no edifício do HJA foram seleccionados de acordo com os seguintes critérios:

- serem representativos de cada piso;
- cuja localização permita aferir um potencial padrão de dispersão de bactérias no ar interior;
- apresentarem presença temporária ou permanente de pessoas;
- que a sua QAI tenha uma influência relevante nos utentes.

Desta forma definiu-se a realização de amostragens em 15 locais distintos do interior do HJA, resultando em 3 ou 4 locais em cada um dos 4 pisos do edifício. As colheitas foram realizadas em 5 dias distintos entre 23-04-2009 e 04-06-2009, resultando num total de 36 amostragens do ar interior e 5 do ar exterior, descritas na Tabela 6.

Em cada dia de colheita foram amostrados todos os locais programados para um piso, tendo sido realizados 2 replicados, correspondentes ao período da manhã e da tarde, e uma amostragem do ar exterior.

Aquando da primeira amostragem, no piso 3, foi testada a realização de 4 replicados por local por repetição do programa de amostragem do primeiro dia de colheita desse piso, mas a inexistência de diferença significativa entre as médias da quantificação de bactérias no ar interior entre os dias de amostragem (teste T-student;  $T=-0,015$ ; g.l.=10;  $p=0,989$ ) levou à decisão de realizar apenas 2 replicados nos restantes locais de amostragem, uma vez que não ocorre variação temporal significativa da concentração de bactérias no ar interior do HJA.

Tabela 6 – Plano de amostragens do ar realizadas no HJA.

<b>Número da amostra</b>	<b>Data de amostragem</b>	<b>Período do dia</b>	<b>Piso no edifício</b>	<b>Local amostrado</b>
1	23-04-2009	Manhã	3	Quarto Toutinegra
2	23-04-2009	Manhã	3	Quarto Pardal da Terra
3	23-04-2009	Manhã	3	Corredor Piso 3
4	23-04-2009	Tarde	3	Quarto Toutinegra
5	23-04-2009	Tarde	3	Quarto Pardal da Terra
6	23-04-2009	Tarde	3	Corredor Piso 3
7	23-04-2009	Tarde	3	Terraço Exterior
8	28-04-2009	Manhã	3	Quarto Toutinegra
9	28-04-2009	Manhã	3	Quarto Pardal da Terra
10	28-04-2009	Manhã	3	Corredor Piso 3
11	28-04-2009	Tarde	3	Quarto Toutinegra
12	28-04-2009	Tarde	3	Quarto Pardal da Terra
13	28-04-2009	Tarde	3	Corredor Piso 3
14	28-04-2009	Tarde	3	Terraço Exterior
15	07-05-2009	Manhã	2	Quarto Til
16	07-05-2009	Manhã	2	Corredor Piso 2
17	07-05-2009	Manhã	2	Sala estar (modificada para quarto)
18	07-05-2009	Manhã	2	Quarto Papoila
19	07-05-2009	Tarde	2	Quarto Til
20	07-05-2009	Tarde	2	Corredor Piso 2
21	07-05-2009	Tarde	2	Sala estar (modificada para quarto)
22	07-05-2009	Tarde	2	Quarto Papoila
23	07-05-2009	Tarde	2	Exterior - Átrio entrada
24	21-05-2009	Manhã	0	Lavandaria
25	21-05-2009	Manhã	0	Sala convívio (sem nome)
26	21-05-2009	Manhã	0	Sala fisioterapia (sem nome)
27	21-05-2009	Manhã	0	Corredor Piso 0
28	21-05-2009	Tarde	0	Lavandaria
29	21-05-2009	Tarde	0	Sala convívio (sem nome)
30	21-05-2009	Tarde	0	Sala fisioterapia (sem nome)
31	21-05-2009	Tarde	0	Corredor Piso 0
32	21-05-2009	Tarde	0	Exterior - Átrio entrada
33	04-06-2009	Manhã	1	Corredor Piso 1
34	04-06-2009	Manhã	1	Cozinha
35	04-06-2009	Manhã	1	Bar pessoal
36	04-06-2009	Manhã	1	Quarto Castanholas
37	04-06-2009	Tarde	1	Corredor Piso 1
38	04-06-2009	Tarde	1	Cozinha
39	04-06-2009	Tarde	1	Bar pessoal
40	04-06-2009	Tarde	1	Quarto Castanholas
41	04-06-2009	Tarde	1	Exterior - Átrio entrada

### 3.2 – REALIZAÇÃO DAS AMOSTRAGENS

#### 3.2.1 - MATERIAL UTILIZADO NAS AMOSTRAGENS

Na determinação dos parâmetros físico-químicos do ar, nomeadamente temperatura, humidade relativa e concentração de CO<sub>2</sub> e de NO<sub>2</sub>, foi utilizado um monitor de qualidade do ar *Gas Data Paq*, que detecta todos estes parâmetros em simultâneo, ou como alternativa um termohigrómetro *Hanna Instruments* e um detector de NO<sub>2</sub> *Crowcon*.

Na amostragem microbiológica do ar foi utilizado um amostrador portátil *Burkard Manufacturing Co. Ltd*. O aparelho aspira o ar para placas de petri de 90mm de diâmetro a uma taxa de 20 litros por minuto, definindo-se um período de 8 minutos em cada amostragem, perfazendo 0,16 m<sup>3</sup> de ar por amostra.

Foram utilizados no *Burkard* dois tipos de meios de cultura pré-preparados em placa de petri para a detecção de bactérias e fungos:

Gelose Tripcase Soja Agar (TSA) da marca *Biomérieux* – meio de cultura destinado à detecção de bactérias totais do ar, indicado ao desenvolvimento de bactérias sem exigências específicas.

Gelose Sabouraud Glucose Cloranfenicol (SDC) da marca *Biomérieux* – meio de cultura destinado à detecção de fungos totais do ar, o qual permite o desenvolvimento de todo o tipo de fungos.

Foi utilizado algodão embebido em etanol a 70% para a esterilização do aparelho *Burkard* entre cada amostragem do ar.

#### 3.2.1 – PROCEDIMENTOS NAS AMOSTRAGENS

Em cada local amostrado foram realizados os seguintes passos:

- 1) Medição dos parâmetros físicos e químicos do ar com o aparelho *Gas Data PAQ*, ou em alternativa com os aparelhos *Hanna* e *Crowcon*.
- 2) Amostragem do ar com aparelho *Burkard* utilizando placas de petri com meio nutriente em agar específico para bactérias (TSA)
- 3) Amostragem do ar com o aparelho *Burkard* utilizando placas de petri com meio nutriente em agar específico para fungos (SDC)
- 4) Anotação das características da amostragem do ar e do local amostrado, quando aplicável, tais como: número de pessoas no local, grau de movimentação de pessoas no local (Escala 0 a 5, sendo 0 = *nulo*, 1 = *muito baixo*, 2 = *baixo*, 3 = *médio*, 4 = *elevado* e 5 = *muito elevado*), número de camas no quarto, existência de ventilação prévia do local

(janelas abertas ou fechadas antes da amostragem) e limpeza prévia do quarto (camas feitas ou por fazer no momento da amostragem).

As amostragens de ar foram feitas ao nível das vias respiratórias tendo o aparelho *Burkard* sido colocado a um metro de altura, e próximo das camas dos pacientes quando aplicável. Realizou-se a amostragem nos quartos de pacientes com as janelas e portas fechadas enquanto nos restantes tipos de locais não foi modificado o estado da ventilação natural.

Os aparelhos de monitorização dos parâmetros físico-químicos do ar foram colocados a cerca de 50 cm de distância do amostrador de ar e a leitura dos valores determinados no início da colheita de cada amostra de ar. O transporte das placas de petri utilizadas nas amostragens foi realizado numa mala térmica refrigerada.

Nas amostragens de ar exterior o aparelho foi colocado na vizinhança da entrada do edifício (dias de amostragens dos pisos 0 a 2) ou na varanda (dia de amostragem do piso 3).

### 3.3 - ANÁLISE LABORATORIAL

#### 3.3.1 - PROCESSAMENTO DAS PLACAS DE PETRI

As placas de petri foram incubadas por um período de 4 dias, sendo as placas com meio nutriente específico para bactérias (TSA) mantidas numa incubadora microbiológica a 37°C e as placas com meio nutriente específico para fungos (SDC) numa incubadora a 25°C.

Findo o período de incubação, foram contabilizadas as colónias presentes em cada placa. Seguindo o princípio de que cada organismo viável presente no ar tem a capacidade de formar uma colónia, as contagens são expressas em unidades formadoras de colónias (UFC).

Uma vez que a durante a amostragem foram colhidos 0,16 m<sup>3</sup> de ar para cada placa, as contagens obtidas foram convertidas para valores em UFC/m<sup>3</sup> de ar.

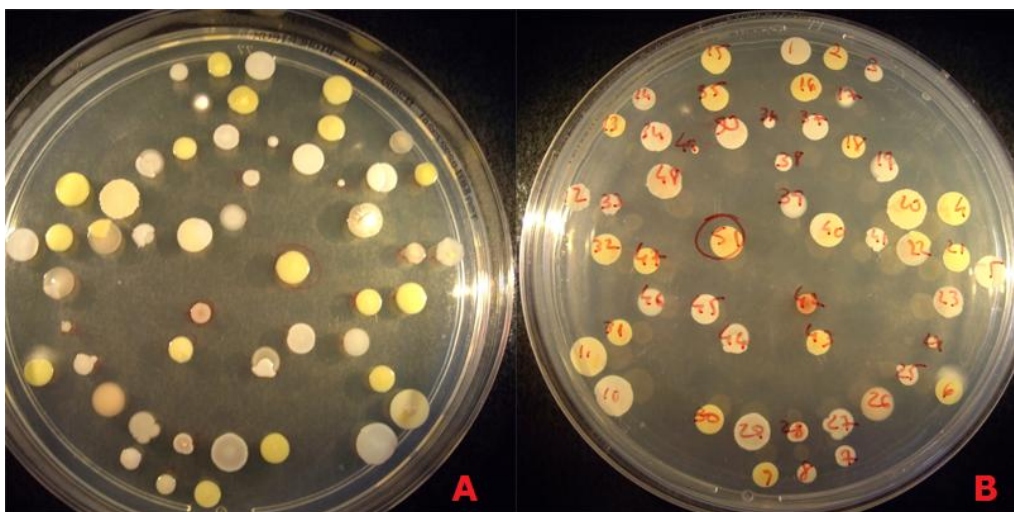


Figura 5 – Placa de petri com meio de cultura TSA para crescimento de bactérias, após incubação e contagem. A – vista superior; B – vista inferior.

A partir de cada placa com bactérias amostradas no ar interior foram seleccionadas 10 colónias para identificação, e no caso de placas do ar exterior cerca de 6 colónias. As colónias foram seleccionadas como sendo morfológicamente distintas, sempre que possível, com vista à detecção da maior diversidade bacteriana possível.

Ao todo foram seleccionadas para identificação 360 colónias bacterianas do ar interior e 32 do ar exterior.

Do total de 2491 colónias de bactérias contadas na totalidade das 41 placas de petri com bactérias, correspondentes à amostragem total de 6,62m<sup>3</sup> de ar, o total de 392 colónias seleccionadas para identificação resulta numa representatividade de 15,7% da totalidade das colónias.

### 3.3.2 - TESTES BIOQUÍMICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS

#### 3.3.2.1 - TESTE DE GRAM

Foi aplicada a coloração de Gram segundo Collee (1993) a uma porção de cada colónia seleccionada e posteriormente foi observada ao microscópio óptico *Leitz* a 400x. As bactérias Gram (+) apresentam uma coloração roxa enquanto as Gram (-) adquirem coloração vermelha. Foi registada ainda a forma celular e o tipo de aglomeração celular.

#### 3.3.2.2 - TESTE DA OXIDASE

Foi utilizado o kit comercial *Microbiology Bactident Oxidase* da marca *Merck* segundo as instruções do fabricante. Foi aplicada uma porção da colónia na zona reactiva da tira de papel do teste e findo 1 minuto observou-se a reactividade. Se a bactéria possuir a enzima citocromo-oxidase, a zona reactiva da tira de papel do teste muda de cor para púrpura, sendo considerada uma bactéria oxidase positiva. Se a bactéria não possuir a referida enzima, não ocorrerá alteração de cor, sendo então considerada oxidase negativa.

#### 3.3.2.3 - TESTE DA CATALASE

Neste teste foi utilizado o reagente *Microbiology Bactident Catalase* da *Merck*. Foi adicionada uma gota de reagente do teste da catalase sobre uma porção da colónia numa lâmina de microscopia e observada a reactividade. A formação de bolhas e libertação de gás corresponde a uma reacção característica de bactérias catalase positivas enquanto a ausência de reacção indica que a bactéria é catalase negativa.

### 3.3.2.5 - INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DOS TESTES BIOQUÍMICOS

Os resultados dos testes bioquímicos foram interpretados de acordo com Barrow e Feltham (1993), sendo assim possível a identificação das bactérias como sendo pertencentes ou não ao género *Staphylococcus*, com base nos resultados dos testes efectuados.

O género *Staphylococcus* tem como características principais a sua forma celular de cocos com aglomeração predominantemente do tipo estafilococos, crescimento aeróbio e o facto de ser Gram positivo, catalase positivo e oxidase negativo (Barrow e Feltham, 1993). Todas as amostras processadas cujos resultados coincidissem com os esperados foram consideradas como sendo pertencentes a esse género.

## 3.3.3 – TESTES GENÉTICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS

### 3.3.3.1 - CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS ATÉ PROCESSAMENTO

As placas de petri com as colónias bacterianas foram mantidas num congelador a -20°C até o seu processamento.

### 3.3.3.2 - ISOLAMENTO DAS COLÓNIAS

A porção remanescente de cada colónia seleccionada para identificação foi recolhida do agar da placa de petri com um bisturi esterilizado à chama e colocada num tubo eppendorf esterilizado contendo 100 µl de água ultra pura *MilliQ* (B. Braun).

De entre as 392 colónias seleccionadas previamente para identificação, foram processadas 317 nos testes genéticos. A redução deveu-se à equalização do esforço de amostragem por local, nomeadamente reduzindo de 4 para 2 os replicados das amostragens do piso 3, e a exclusão de amostras nas quais houve provável contaminação aquando do isolamento da colónia.

### 3.3.3.3 – PREPARAÇÃO DO DNA

A preparação do DNA para PCR, consistiu na lise celular das bactérias induzida por elevada temperatura. Tal resultou numa suspensão bacteriana com DNA disponível em solução, que foi directamente utilizada como DNA molde nas PCR subsequentes.

Os tubos *eppendorf* contendo as colónias bacterianas foram incubados num banho-maria durante 10 minutos a 98°C (Pepper e Gerba, 2004). Após incubação, as amostras foram congeladas a -20°C até serem processadas.

### 3.3.3.4 - AMPLIFICAÇÃO POR PCR DO GENE 16S DO RRNA

Para a amplificação do gene 16S do rRNA preparou-se num tubo eppendorf esterilizado a seguinte solução:

- 17,3 µl de água ultra pura *MilliQ* (B. Braun)
- 2,5 µl de solução tampão de reacção 10X completa (Bioron)
- 2 µl de dNTPs a 2,5mM cada nucleótido (Bioron)
- 0,5 µl de *primer* 27F
- 0,5 µl de *primer* 1492R
- 0,2 µl de enzima Taq DNA polimerase a 5unidades/µl (Bioron)
- 2 µl de DNA template

Os *primers* utilizados na PCR são os *primers* universais para o gene 16S do rRNA em bactérias, nomeadamente o 27F (5'-AGRGTTCGATCMTGGCTCAG-3') e o 1492R (5'-GGYTACCTGTTACGACTT-3') (Polymenakou *et al*, 2008).

As condições de amplificação foram de um passo inicial de desnaturação por 3 minutos a 94°C, seguidos de 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C e 3 minutos a 72°C, com um passo final de extensão por 7 minutos a 72°C (Polymenakou *et al*, 2008).

O sucesso da PCR foi testado realizando uma electroforese das amostras em gel de agarose a 1% durante 25 minutos a 110V e posterior revelação com brometo de etídio e visualização à luz ultravioleta. O sucesso da PCR foi confirmado pela presença de uma banda de DNA com o tamanho aproximado de 1,5Kb correspondente à amplificação do gene pretendido.

Foi obtida a amplificação do gene pretendido num total de 215 das 324 amostras. As 109 amostras nas quais não foi conseguida a amplificação foram sujeitas a um mínimo de 2 tentativas de amplificação.

### 3.3.3.5 - DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

O gene amplificado em cada amostra foi alvo de corte com recurso a 2 enzimas de restrição em separado, nomeadamente a *HhaI* (5'-GCG<sup>^</sup>C-3') e a *HaeIII* (BsuRI) (5'-GG<sup>^</sup>CC-3') (Polymenakou *et al*, 2008).

A digestão enzimática foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (Fermentas).

A reacção consistiu na preparação da seguinte solução:

- 5 µl de solução com gene 16s rRNA amplificado por PCR
- 9 µl de água ultra pura *MilliQ* (B. Braun)
- 1 µl de solução tampão adequada à enzima (Fermentas)
- 0,5 µl de enzima de restrição *HaeIII* ou *HhaI* (Fermentas)

No caso da enzima *HaeIII* foi utilizada a solução tampão *R* (Fermentas), e no caso da *HhaI* foi utilizada a solução tampão *Tango* (Fermentas).

Esta solução foi incubada num banho-maria a 37°C durante 6 horas.

Após incubação as enzimas foram inactivadas da seguinte forma:

*HaeIII* – incubação a 80°C durante 20 minutos

*HhaI* – adição de 0,62µl de EDTA 0,5M pH8 a cada amostra

Após processamento as amostras foram mantidas a -20°C.

#### 3.3.3.6 - ANÁLISE DOS PADRÕES DE RFLP

Os produtos da digestão enzimática foram submetidos a electroforese em gel de poli(acrilamida T9C5 durante 3 horas a 180V e revelados a nitrato de prata segundo Budowle *et al* (1991). Os padrões de bandas obtidos (RFLP) para cada amostra e enzima foram determinados visualmente, sendo atribuídas designações distintas a cada padrão de bandas único (Figuras 4 e 5 nos Apêndices). Foram assim agrupadas as amostras em grupos com similaridade genética, os denominados *Operational Taxonomic Units* (OTU). O nome de cada OTU foi dado pela junção da designação do padrão de bandas de RFLP para a enzima *HhaI* e o padrão para a *HaeIII* (*HhaI-HaeIII*).

Foram determinados os padrões de bandas em 207 amostras digeridas com a enzima *HhaI* e 211 amostras digeridas com a *HaeIII*, sendo possível apurar o padrão de RFLP para ambas as enzimas em 192 amostras. Foram determinados 47 padrões distintos resultantes da digestão com a *HhaI* e 56 padrões distintos com a *HaeIII*. No total das 192 amostras com ambos os padrões apurados, foram detectados 96 padrões combinados distintos, resultando num apuramento de 96 OTU.

#### 3.3.3.7 – SEQUENCIAÇÃO DO GENE 16S RRNA

Uma vez agrupadas as amostras em OTU, foram seleccionadas para sequenciação as amostras das OTU mais frequentes e de entre as OTU menos frequentes preferencialmente aquelas que foram identificadas pelos testes bioquímicos como não sendo pertencentes ao género *Staphylococcus*.

Cada amostra seleccionada para sequenciação foi sujeita a nova PCR de amplificação do gene 16S rRNA com um volume de 50 µl. Após confirmação do sucesso da amplificação através de electroforese em gel de agarose, as amostras foram purificadas com o kit de purificação *MinElute PCR Purification Kit* (Quiagen) de acordo com as instruções do fabricante e eluídas em 20µl de água ultra pura *MilliQ* (B. Braun). Após a purificação, as amostras foram sujeitas a

nova electroforese em gel de agarose para determinar o sucesso da purificação e concentração relativa de DNA na solução.

As amostras purificadas foram sujeitas a PCR de reamplificação com recurso ao *primer* de amplificação 27F, e num caso também com o 1492R, e kit comercial para sequenciação de DNA *Big Dye Terminator* versão 3.1 da *Applied Biosystems* de acordo com manual do fabricante.

A solução preparada para a PCR foi a seguinte:

2 µl de *Big Dye*

1,5 µl de *primer* 27F (ou 1492R)

2 a 3,5 µl de DNA purificado

água ultra pura *MilliQ* (B. Braun) até perfazer volume total de 10µl

Após esta PCR, as amostras foram sujeitas a purificação e precipitação de acordo com o manual do fabricante do kit, sendo posteriormente enviadas para leitura da sequência genética por electroforese capilar num sequenciador automático nas instalações da StabVida.

Foram seleccionadas 24 amostras para sequenciação, todas sequenciadas com o *primer* 27F correspondente à porção inicial do gene. Apenas para a OTU mais frequente foi utilizado igualmente o *primer* 1492R, permitindo assim obter a sequência completa do gene nessa amostra.

#### 3.3.3.8 – MANIPULAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE DNA

Os electroferogramas foram visualizados no software *Ridom TraceEdit* 1.1.0, sendo eliminadas as extremidades da sequência nas quais a leitura gráfica era de má qualidade. Procedeu-se à verificação da qualidade da leitura das bases e eventual correcção de detecção nucleotídica necessária.

De seguida foi realizada uma pesquisa de sequências homólogas às das amostras utilizando a funcionalidade *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) disponibilizada pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) no site <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Benson *et al*, 2008).

A sequência da amostra e a sequência da base de dados com a maior taxa de homologia à respectiva amostra foi alinhada no software *BioEdit* 7.0.5.3 e todos os nucleótidos diferentes entre as 2 sequências foram alvo de confirmação por visualização do electroferograma.

### 3.3.3.9 – IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS COM BASE NA SEQUÊNCIA GENÉTICA

As sequências das amostras foram sujeitas a pesquisa na base de dados *Bio Informatics Bacteria Identification light edition (leBIBI ou BIBI)*, disponível em <http://umr5558-sud-str1.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi> (Devulder *et al*, 2003).

Nesta base de dados, o parâmetro seleccionado foi a pesquisa no grupo de dados *Bacteria\_TS\_SSU-rDNA-16S\_stringent*, referente a sequências da subunidade 16S do rRNA de bactérias de estirpes tipo e com identificação concordante com a nomenclatura.

A interpretação da identificação automática disponibilizada foi a seguinte:

No caso da base de dados indicar apenas uma identificação possível, era tida em consideração a taxa de homologia máxima entre a amostra e as sequências da base de dados. Se o valor fosse superior a 99% de homologia, era considerada a identificação como correcta. Se o valor fosse inferior a 99%, era considerada a árvore filogenética apresentada pela base de dados e considerada a distância filogenética entre a amostra e as sequências mais próximas para confirmar se existe ou não uma clara demarcação entre a identificação automática do BIBI e outras possíveis. Caso a distância entre a amostra e sequências de taxa diferentes fosse similar, era considerada a identificação apenas até ao taxon em comum, normalmente sendo identificada até ao género.

No caso da base de dados indicar várias identificações possíveis, era tida em consideração a taxa de homologia máxima entre a amostra e as sequências da base de dados. A sequência única com maior taxa de homologia à amostra, desde que superior a 99%, era considerada como a identificação correcta, enquanto se a taxa de homologia fosse inferior a 99%, era considerada a identificação apenas até ao taxon em comum para as várias identificações propostas pela base de dados. No caso de várias sequências da base de dados partilharem a mesma taxa de homologia máxima com a amostra, era considerada a identificação taxonómica dessas amostras também apenas até ao taxon em comum, uma vez que não haveria distinção genética suficiente para diferenciar a inclusão da amostra em algum dos vários taxa possíveis.

No caso da base de dados não indicar nenhuma identificação possível, era tida em consideração a taxa de homologia máxima entre a amostra e as sequências da base de dados e a árvore filogenética. A identificação da amostra era dada pelo taxon em comum entre todas as sequências próximas da amostra, normalmente sendo identificada até ao género. Estes casos ocorreram apenas com sequenciações de má qualidade e cuja leitura foi duvidosa.

A taxa de homologia superior a 99% entre as amostras e sequências da base de dados para a identificação confirmada da amostra até ao nível de espécie foi considerada de acordo com os critérios de Drancourt *et al* (2000).

A título comparativo e para efeitos de discussão da identificação obtida para cada amostra, foram feitas pesquisas das sequências das amostras em outras 2 bases de dados também utilizadas para a identificação de bactérias, o *GenBank* e o *Ribosomal Database Project*.

A pesquisa no **GenBank** foi realizada utilizando a funcionalidade *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) disponibilizada pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) no site <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Benson *et al*, 2008).

Os parâmetros de pesquisa seleccionados foram: Tipo de BLAST escolhido foi *nucleotide blast*, a base de dados para pesquisa foi *nucleotide collection (nr/nt)*, foi seleccionada a exclusão de *Uncultured / environmental sample sequences* e de *Models (XM/XP)*, e finalmente seleccionada o programa *Highly similar sequences (megablast)* com os parâmetros originais.

Os resultados da pesquisa no *GenBank* foram interpretados segundo os critérios de Drancourt *et al* (2000). Para tal, as amostras foram identificadas pelo grupo taxonómico da sequência ou sequências com homologia máxima. As amostras puderam ser identificadas com certeza até à espécie da sequência da base de dados com a homologia máxima quando a homologia entre sequências fosse superior ou igual a 99%, e até ao género quando a homologia fosse superior ou igual a 97% e inferior a 99%. No caso da homologia máxima entre a amostra ocorrer com várias sequências, era considerada a identificação apenas até ao taxon em comum das amostras com os mesmos valores de homologia, ou em alternativa quando os taxa fossem muito distintos, até ao taxon com maior número de ocorrências com homologia máxima. No caso da homologia máxima ser inferior a 97%, o que ocorreu apenas com sequenciações de má qualidade, a identificação deverá ser considerada falhada, sendo no entanto registada a identificação apenas a título informativo, segundo os critérios descritos anteriormente, sem considerar a valor da homologia.

A pesquisa no **Ribosomal Database Project** foi realizada utilizando a funcionalidade *Classifier* disponibilizada pela *Ribosomal Database Project* (RDP) no site <http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp> (Wang *et al*, 2007). Os resultados obtidos são uma identificação directa, sem haver necessidade de interpretação de dados.

No software MEGA 4.0.2 (Tamura *et al*, 2007) foi gerada a árvore filogenética presente na Figura 16 para a apresentação resumida da relação filogenética entre as amostras e espécies conhecidas. As sequências das amostras e as sequências das estirpes tipo de espécies próximas das amostras constantes na base de dados BIBI, no grupo de dados *Bacteria\_TS\_SSU-rDNA-16S\_stringent* foram usadas como os dados a analisar. Foi realizado o agrupamento pelo método de *Neighbor-Joining* (Saitou e Nei, 1987) com base no número de diferenças nucleotídicas entre as sequências e eliminação completa das posições nucleotídicas sem dados

(gaps) entre as sequências e realizado o teste de *Bootstrap* de filogenia com 1000 replicados. Foram considerados 325 nucleótidos de todas as sequências na análise filogenética.

### 3.3.3.10- DETERMINAÇÃO DA ORIGEM PROVÁVEL DAS BACTÉRIAS

Foi feita a pesquisa das sequências das amostras na base de dados *European Molecular Biology Laboratory* do *European Bioinformatics Institute* (EMBL-EBI ou EMBL) nos registos relativos a amostras ambientais (Stoesser et al, 2002).

A pesquisa no EMBL foi realizada utilizando a funcionalidade *Fasta - Nucleotide Similarity Search* disponibilizada no site <http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolform.ebi?tool=fasta&context=nucleotide>, sendo seleccionada a base de dados *EMBL-Bank*, *EMBL Environmental*, *All EMBL Environmental* e o programa *FASTA* para pesquisa de sequências similares. As sequências com a similaridade máxima às sequências das amostras deste trabalho foram registadas, bem como as taxas de homologia e respectiva fonte de recolha das mesmas.

Complementarmente foram pesquisadas informações sobre a ecologia das espécies amostradas e confirmação da nomenclatura aplicada, incluindo sinonímias, na base de dados da *Culture Collection* da Universidade de Göteborg na Suécia (CCUG), disponível no site <http://www.ccug.se/>.

Foram também registadas as fontes de recolha das bactérias com maior homologia às sequências das amostras deste trabalho, disponíveis na base de dados BIBI consultadas aquando da identificação das amostras.

Foi igualmente comparada a detecção das espécies deste trabalho com as do trabalho de Täubel *et al* (2009), um trabalho que também versou a detecção de bactérias no ambiente interior de edifícios e sua relação com a presença humana.

Da análise dos 4 resultados anteriores para cada amostra sequenciada neste trabalho resultou um veredicto para a origem provável da bactéria detectada. Se a maioria dos resultados apontassem para uma origem na flora bacteriana associada ao ser humano, a origem era considerada humana, se houvesse uma possibilidade semelhante de ter origem ambiental ou humana, era designada em primeiro lugar a fonte mais provável, enquanto se os resultados indicassem essencialmente origem na flora bacteriana ambiental, essa seria a origem considerada para a amostra.

### 3.4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Recorreu-se ao software Microsoft Excel 2007 foi utilizado para registar os dados originais e para a análise exploratória, nomeadamente ao gerar tabelas com médias, contagens e proporções das variáveis.

O programa SPSS 14.0 foi utilizado na análise exploratória e na análise confirmatória, sendo nele realizadas as tabelas com a estatística descritiva de variáveis, os testes estatísticos de comparação de médias, testes de normalidade e igualdade de variâncias, e cálculos de correlações.

O programa Primer 6.1.10 foi utilizado na análise das comunidades bacterianas dos locais amostrados, sendo nele calculados os índices de similaridade e gerados dendogramas e gráficos *Multi Dimensional Scaling* (MDS) com base em matrizes de similaridade, bem como calculadas estimativas de diversidade biológica.

O programa MEGA 4.0.2 (Tamura *et al*, 2007) foi utilizado na elaboração de árvores filogenéticas com base nas sequências de DNA.

## 4 – RESULTADOS

### 4.1 – FLORA BACTERIANA DETECTADA NO AR INTERIOR DO HJA

#### 4.1.1 – IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS

De entre a totalidade das 2399 colónias de bactérias contadas nas 36 placas de petri respeitantes às amostragens do ar interior do HJA em 15 locais distintos, foram seleccionadas 360 colónias para identificação. Todas as 360 colónias foram sujeitas a testes bioquímicos que permitiram identificá-las como sendo pertencentes ou não ao género *Staphylococcus sp.*, sendo os resultados apresentados na Tabela 7. Das 360 colónias, 300 foram seleccionadas para identificação com técnicas moleculares, das quais, em 201 amostras foi conseguida a amplificação do gene 16S rRNA e em 182 amostras foi possível determinar o padrão de RFLP para ambas as enzimas de restrição utilizadas. Estas 182 amostras foram agrupadas em 91 OTU distintas, com entre 1 a 37 amostras por OTU, com base na similaridade de padrão de RFLP. Das 91 OTU detectadas, foram identificadas 21 por sequenciação de 1 amostra da OTU, correspondendo a um total de 105 amostras identificadas com recurso a técnicas moleculares.

As identificações obtidas pelos testes bioquímicos e pelas técnicas moleculares para as 360 amostras seleccionadas para identificação são apresentadas em seguida. Os dados detalhados estão disponíveis nos Apêndices nas Tabelas 1, 3 e 4.

Tabela 7 – Identificação das bactérias processadas para identificação respeitantes ao ar interior do HJA, discriminadas por identificação por testes bioquímicos e técnicas moleculares.

Identificação (Bioquímica)	Contagem	%	Identificação (Molecular)	Contagem	%
<i>Staphylococcus sp.</i>	244	68%	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	43	12%
			<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	17	5%
			<i>Staphylococcus capitis</i> ou <i>S. caprae</i>	11	3%
			<i>Staphylococcus kloosii</i>	2	1%
			Não identificado	171	48%
Outros géneros	116	32%	<i>Micrococcus luteus</i>	5	1%
			<i>Bacillus granadensis</i>	3	1%
			<i>Moraxella osloensis</i> ou <i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	3	1%
			<i>Kocuria palustris</i>	3	1%
			<i>Kocuria rhizophila</i>	3	1%
			<i>Paracoccus yeei</i>	3	1%
			<i>Crocino bacterium jejui</i>	2	1%
			<i>Micrococcus sp.</i>	2	1%
			<i>Bacillus simplex</i>	1	0%
			<i>Corynebacterium sp.</i>	1	0%
			<i>Exiguobacterium homiense</i>	1	0%
			<i>Lactococcus lactis lactis</i>	1	0%
			Não identificado	88	24%
			<b>Total Geral</b>	<b>360</b>	<b>100%</b>

O teste bioquímico de Gram permitiu também caracterizar as bactérias processadas de acordo com o tipo de Gram e forma celular, sendo apresentados os resultados na Tabela 8.

Tabela 8 – Identificação das bactérias do ar interior do HJA por tipo de Gram e forma celular.

Tipo de Gram e forma celular	Contagem	%
<b>Gram positivo</b>	<b>317</b>	<b>88%</b>
Cocos	261	73%
Bacilos	41	11%
Cocobacilos	11	3%
Cocos e bacilos	3	1%
Cocos e cocobacilos	1	0%
<b>Gram negativo</b>	<b>43</b>	<b>12%</b>
Cocos	21	6%
Bacilos	18	5%
Bacilos e cocobacilos	2	1%
Cocobacilos	1	0%
Cocos e bacilos	1	0%
<b>Total Geral</b>	<b>360</b>	<b>100%</b>

#### 4.1.2 – ORIGEM PROVÁVEL DAS BACTÉRIAS

A origem provável de cada taxon de bactérias detectadas no ar interior do HJA é apresentada na Tabela 9. Os dados detalhados estão disponíveis nos Apêndices nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 9 – Origem provável das bactérias detectadas no ar interior do HJA.

Identificação das bactérias	Origem provável das bactérias
<i>Bacillus granadensis</i>	Humanos, potencialmente ambiental
<i>Bacillus simplex</i>	Ambiental
<i>Corynebacterium sp.</i>	Humanos
<i>Crocinebacterium jeju</i>	Ambiental
<i>Exiguobacterium homiense</i>	Humanos, potencialmente ambiental
<i>Kocuria palustris</i>	Humanos, potencialmente ambiental
<i>Kocuria rhizophila</i>	Humanos, potencialmente ambiental
<i>Lactococcus lactis lactis</i>	Ambiental, potencialmente de humanos
<i>Micrococcus luteus</i>	Humanos
<i>Micrococcus sp.</i>	Humanos
<i>Moraxella osloensis ou</i>	
<i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	Humanos
<i>Paracoccus yeei</i>	Humanos
<i>Staphylococcus capitis ou S. caprae</i>	Humanos
<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Humanos
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Humanos
<i>Staphylococcus kloosii</i>	Ambiental
<i>Staphylococcus sp.</i>	Humanos

#### 4.1.3 – QUANTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS

São apresentados os dados relativos às 36 amostragens realizadas em 15 locais distintos do interior do HJA, para os quais foram determinadas as concentrações de bactérias totais no ar, cujos valores médio, máximo, mínimo e desvio padrão são apresentados na Tabela 10. Os dados detalhados estão disponíveis nos Apêndices nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 10 – Estatística descritiva da concentração de bactérias totais no ar interior do HJA.

	Número de amostras	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
<b>Concentração de bactérias totais (UFC/m<sup>3</sup>)</b>	36	193,8	625,0	413,2	118,2

As concentrações médias de bactérias totais por local amostrado no interior do HJA são apresentadas em seguida, sendo também apresentados os valores médios por tipo de local.

Tabela 11 - Concentração média de bactérias totais (UFC/m<sup>3</sup>) por local amostrado no interior do HJA e agrupadas por tipo de local. \* - Valor acima de máximo de referência (Decreto-Lei nº 79/2006)

Local do interior do HJA	Número de amostras	Concentração média de bactérias totais (UFC/m <sup>3</sup> )
<b>Alimentar</b>	<b>4</b>	<b>406,9</b>
Bar pessoal	2	395,8
Cozinha	2	418,1
<b>Corredor</b>	<b>10</b>	<b>465,3</b>
Corredor Piso 0	2	387,5
Corredor Piso 1	2	429,5
Corredor Piso 2	2	468,8
Corredor Piso 3	4	520,3*
<b>Lavandaria</b>	<b>2</b>	<b>387,5</b>
Lavandaria	2	387,5
<b>Quarto</b>	<b>16</b>	<b>384,0</b>
Quarto Castanholas	2	365,6
Quarto Papoila	2	437,5
Quarto Pardal da Terra	4	409,4
Quarto Til	2	303,1
Quarto Toutinegra	4	300,0
Sala estar (modificada para quarto)	2	546,9*
<b>Sala</b>	<b>4</b>	<b>418,8</b>
Sala convívio	2	450,0
Sala fisioterapia	2	387,5
<b>Total Geral</b>	<b>36</b>	<b>413,2</b>

## 4.2 – OUTROS INDICADORES DA QUALIDADE DO AR INTERIOR

### 4.2.1 – QUANTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

São apresentados os dados relativos às 36 amostragens realizadas em 15 locais distintos do interior do HJA, para os quais foram determinadas as concentrações de fungos totais no ar, cujos valores médio, máximo, mínimo e desvio padrão são apresentados na Tabela 12. Os dados detalhados estão disponíveis nos Apêndices nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 12 – Estatística descritiva da quantificação de fungos totais no ar interior do HJA.

	Número de amostras	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
<b>Concentração de fungos totais (UFC/m<sup>3</sup>)</b>	36	100,0	575,0	243,8	133,6

As concentrações médias de fungos totais por local amostrado no interior do HJA são apresentadas em seguida, sendo também apresentados os valores médios por tipo de local.

Tabela 13- Concentração média de fungos totais (UFC/m<sup>3</sup>) por local amostrado no interior do HJA e por tipo de local. \* - Valor acima de máximo de referência (Decreto-Lei nº 79/2006)

Local do interior do HJA	Número de amostras	Concentração média de fungos totais (UFC/m <sup>3</sup> )
<b>Alimentar</b>	<b>4</b>	<b>456,8</b>
Bar pessoal	2	412,5
Cozinha	2	501,0*
<b>Corredor</b>	<b>10</b>	<b>256,9</b>
Corredor Piso 0	2	212,5
Corredor Piso 1	2	434,7
Corredor Piso 2	2	259,4
Corredor Piso 3	4	189,1
<b>Lavandaria</b>	<b>2</b>	<b>209,4</b>
Lavandaria	2	209,4
<b>Quarto</b>	<b>16</b>	<b>203,1</b>
Quarto Castanholas	2	350,0
Quarto Papoila	2	175,0
Quarto Pardal da Terra	4	167,2
Quarto Til	2	178,1
Quarto Toutinegra	4	185,9
Sala estar (modificada para quarto)	2	215,6
<b>Sala</b>	<b>4</b>	<b>178,1</b>
Sala convívio	2	175,0
Sala fisioterapia	2	181,3
<b>Total Geral</b>	<b>36</b>	<b>243,8</b>

#### 4.2.2 – PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Os parâmetros físico-químicos, nomeadamente a temperatura, humidade relativa, concentração de CO<sub>2</sub> e de NO<sub>2</sub> foram determinados em 15 locais do interior do HJA (excepto CO<sub>2</sub> medido em apenas 7 locais), sendo apresentados o número de amostragens efectuadas e os valores médios, máximos, mínimos e desvios padrão das variáveis na Tabela 14. Os dados detalhados estão disponíveis nos Apêndices nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 14 – Estatística descritiva das medições dos parâmetros físico-químicos do indoor do HJA

Parâmetro físico-químico	Número de amostras	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
Temperatura (°C)	36	20,6	25,6	23,2	1,3
Humidade relativa (%)	36	42,2	62,3	51,5	4,6
Concentração de CO <sub>2</sub> (ppm)	20	200,0	360,0	276,5	45,8
Concentração de NO <sub>2</sub> (ppm)	36	0,0	0,1	0,003	0,017

As médias dos parâmetros físico-químicos apurados por local amostrado são apresentadas em seguida, sendo também apresentados os valores médios por tipo de local.

Tabela 15 – Valores médios dos parâmetros físico-químicos medidos nos locais do interior do HJA e respectivo número de medições (N).

Local no interior do HJA	Temperatura média (°C)	N	Humidade relativa média (%)	N	Concentração média de NO <sub>2</sub> (ppm)	N	Concentração média de CO <sub>2</sub> (ppm)	N
<b>Alimentar</b>	<b>23,5</b>	<b>4</b>	<b>57,0%</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>320,0</b>	<b>4</b>
Bar pessoal	23,5	2	54,0%	2	0	2	325,0	2
Cozinha	23,4	2	60,0%	2	0	2	315,0	2
<b>Corredor</b>	<b>22,7</b>	<b>10</b>	<b>51,7%</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>261,7</b>	<b>6</b>
Corredor Piso 0	22,8	2	49,2%	2	0	2		
Corredor Piso 1	23,2	2	52,5%	2	0	2	270,0	2
Corredor Piso 2	24,5	2	48,9%	2	0	2		
Corredor Piso 3	21,5	4	54,0%	4	0	4	257,5	4
<b>Lavandaria</b>	<b>21,8</b>	<b>2</b>	<b>54,8%</b>	<b>2</b>	<b>0,05</b>	<b>2</b>		
Lavandaria	21,8	2	54,8%	2	0,05	2		
<b>Quarto</b>	<b>23,6</b>	<b>16</b>	<b>50,4%</b>	<b>16</b>	<b>0</b>	<b>16</b>	<b>268,0</b>	<b>10</b>
Quarto Castanholas	23,9	2	52,0%	2	0	2	250,0	2
Quarto Papoila	24,9	2	49,3%	2	0	2		
Quarto Pardal da Terra	22,2	4	52,8%	4	0	4	292,5	4
Quarto Til	24,5	2	48,4%	2	0	2		
Quarto Toutinegra	23,4	4	50,0%	4	0	4	252,5	4
Sala estar (modificada para quarto)	24,7	2	47,8%	2	0	2		
<b>Sala</b>	<b>23,3</b>	<b>4</b>	<b>47,9%</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>4</b>		
Sala convívio	23,5	2	48,1%	2	0	2		
Sala fisioterapia	23,2	2	47,8%	2	0	2		
<b>Total Geral</b>	<b>23,2</b>	<b>36</b>	<b>51,5%</b>	<b>36</b>	<b>0,003</b>	<b>36</b>	<b>276,5</b>	<b>20</b>

#### 4.2.3 – ANÁLISE GLOBAL DA QUALIDADE DO AR INTERIOR

Na Tabela 16 é apresentado um resumo dos valores obtidos nas amostragens do ar efectuadas no interior do HJA, sendo discriminados os valores mínimos, médios e máximos obtidos por parâmetro medido e comparados com os valores de referência da legislação nacional aplicável, nomeadamente os Decretos-Lei nº 78, 79 e 80/2006 de 4 de Abril e a Nota técnica NT-SCE-02 (ADENE, 2009). Note-se que o método de amostragem e cálculos efectuados não se basearam na aplicação plena da metodologia exigida legalmente para a certificação da QAI, não podendo portanto os resultados serem equiparados aos de uma auditoria da QAI. A legislação mencionada serve de guia respeitante aos valores de referência em vigor em Portugal, para comparação com dados os dados obtidos neste trabalho sob uma perspectiva puramente académica.

Tabela 16 - Resumo dos resultados da análise da QAI do HJA e sua conformidade com a legislação aplicável (Decretos-Lei nº 78, 79 e 80/2006 e Nota técnica NT-SCE-02).

Parâmetro	Mínimo	Média	Máximo	Número de amostras	Valor referência	Número de não conformidades	Porcentagem de não conformidades
Temperatura (°C)	20,6	23,2	25,6	36	20°C a 27°C	0	0%
Humidade relativa (%)	42,2%	51,5%	62,3%	36	40% a 65%	0	0%
Concentração CO <sub>2</sub> (ppm)	200,0	276,5	360,0	20	Máximo = 984 ppm	0	0%
Concentração NO <sub>2</sub> (ppm)	0	0,003	0,1	36	-	-	-
Bactérias totais (UFC/m <sup>3</sup> )	193,8	413,2	625,0	36	Máximo = 500 UFC/m <sup>3</sup>	8	22%
Fungos totais (UFC/m <sup>3</sup> )	100,0	243,8	575,0	36	Máximo = 500 UFC/m <sup>4</sup>	4	11%

A comparação dos valores obtidos com os valores de referência indica que relativamente aos parâmetros físico-químicos houve sempre conformidade com os valores de referência, enquanto no caso dos parâmetros microbiológicos houve um total de 12 amostragens não conformes num total de 72 amostragens realizadas, perfazendo 16,7% das amostragens com excesso de microorganismos no ar. Estes 12 casos de excesso de microorganismos no ar foram detectados em 8 dos 15 locais distintos amostrados no interior do HJA, perfazendo 53,3% dos locais amostrados.

As 8 amostras com concentração de bactérias superior a 500 UFC/m<sup>3</sup> foram detectadas no corredor do piso 1 (1 caso), corredor do piso 2 (1 caso), corredor do piso 3 (3 casos), sala de estar modificada para quarto (1 caso), sala de fisioterapia (1 caso) e na cozinha (1 caso), resultando em 6 locais distintos com excesso de bactérias no ar numa ou mais amostragens. Destes 6 locais, apenas o corredor do piso 3 e sala de estar modificada para quarto (2 em 15 locais, ou 13% dos casos) registaram uma concentração média de bactérias acima das 500 UFC/m<sup>3</sup>.

As 4 amostras com concentração de fungos no ar superior a 500 UFC/m<sup>3</sup> foram detectadas no corredor do piso 1 (1 caso), bar do pessoal (1 caso), quarto Castanholas (1 caso) e na cozinha (1 caso), resultando em 4 locais distintos com excesso de fungos no ar numa determinada amostragem. No entanto, destes 4 locais apenas a cozinha (1 em 15 locais, ou 7% dos casos) teve uma concentração média de fungos acima das 500 UFC/m<sup>3</sup>.

Considerando exclusivamente a concentração média de microorganismos por cada local amostrado (ver Tabela 11 e Tabela 13), apenas 3 dos 15 locais apresentam concentrações superiores a 500 UFC/m<sup>3</sup>, perfazendo 20% dos locais amostrados, sendo eles o corredor do piso 3 e a sala de estar modificada para quarto com excesso de bactérias no ar, e a cozinha com excesso de fungos no ar.

#### 4.3 – DISPERSÃO DA FLORA BACTERIANA NO AR INTERIOR DO HJA

No total das amostras de ar interior do HJA e exterior, 192 amostras foram caracterizadas como pertencentes às 96 OTU distintas detectadas.

Os dados detalhados estão disponíveis nos Apêndices nas Tabelas 1, 4, 5, 6 e 12.

Foi calculada uma matriz com o índice de similaridade de *Bray Curtis* entre os locais amostrados, com base nos dados das OTU, permitindo determinar a similaridade entre locais com base na presença e abundância de OTU por local. Com base nesses dados foi criado o dendograma apresentado na Figura 6 que reflecte a similaridade da flora bacteriana entre locais.

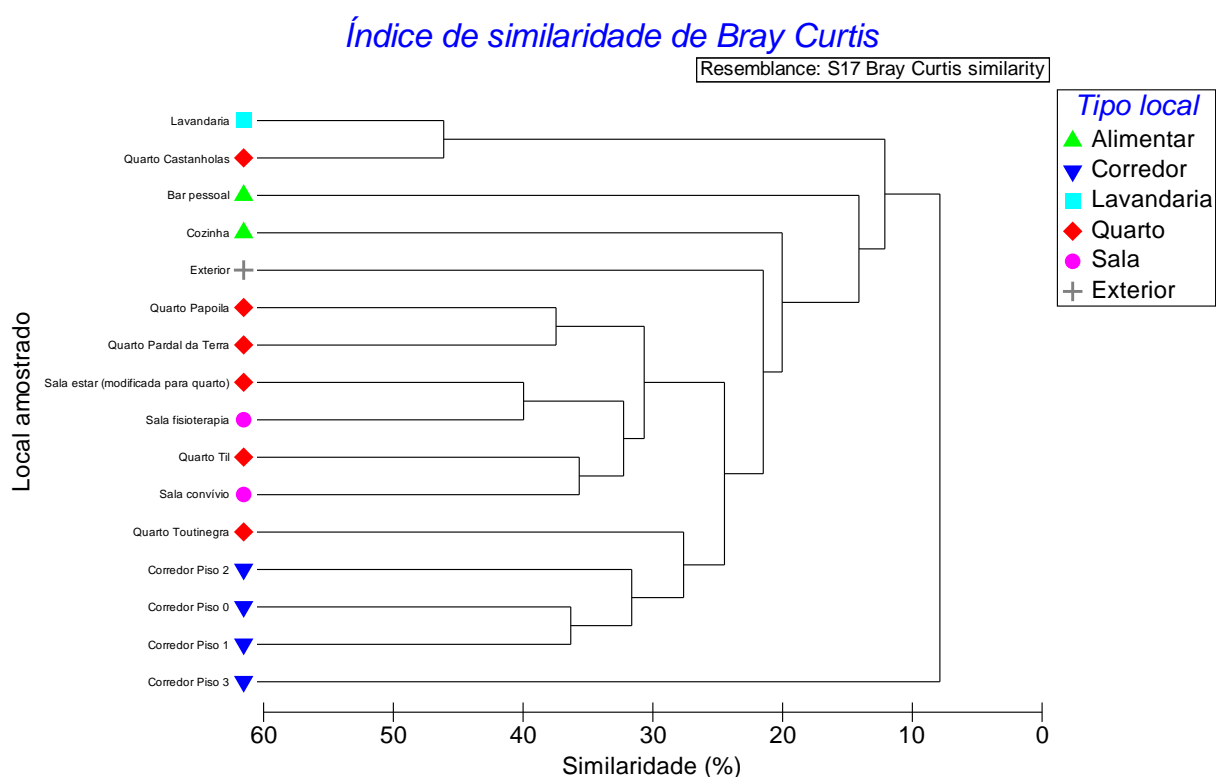


Figura 6 – Dendograma com os locais amostrados no HJA agrupados por grau de similaridade na flora bacteriana, calculado com o índice de similaridade de *Bray Curtis* com base nos dados das OTU.

A matriz de dados mencionada anteriormente também serviu de base para o gráfico *Multi Dimensional Scaling* (MDS) apresentado na Figura 7, sendo evidenciados os grupos de amostras com similaridade superior a 10%, 20% e 40% com base no resultado do dendograma da Figura 6.

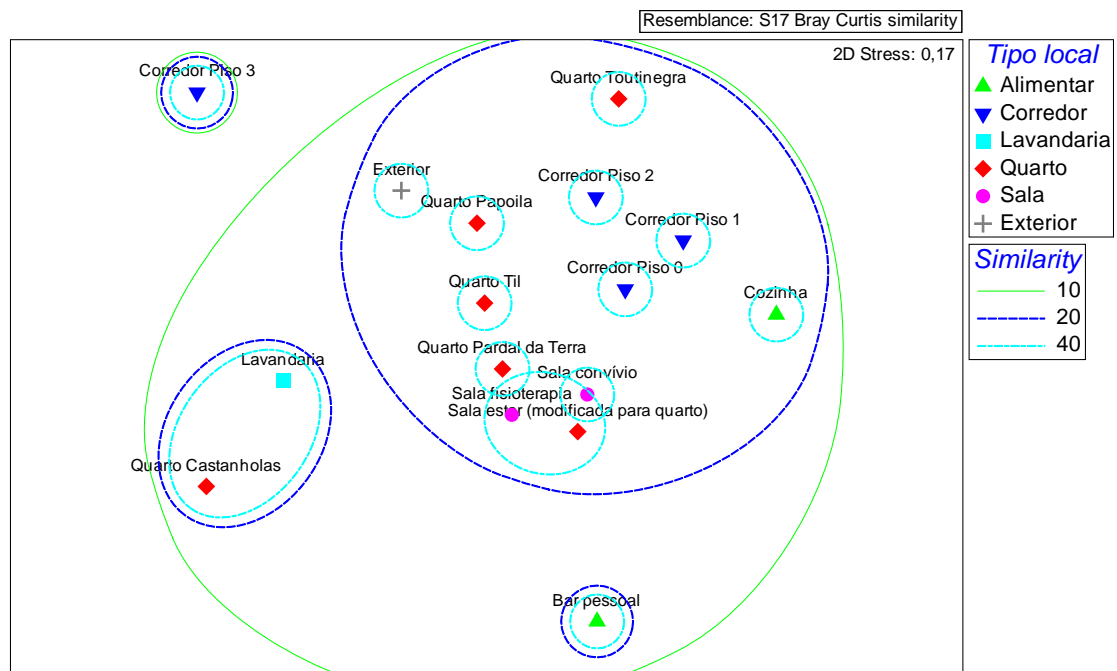


Figura 7 - Gráfico *Multi Dimensional Scaling* (MDS) com base no cálculo de índice de similaridade de *Bray Curtis* entre todos os locais amostrados no HJA, usando os dados das OTU.

Os dados anteriores foram também processados em separado para cada um dos 4 pisos do edifício do HJA, sendo apresentados em seguida para cada piso um esquema básico dos locais amostrados e respectivo gráfico MDS. Os esquemas do edifício do HJA indicam a localização aproximada de cada local amostrado no respectivo piso, o seu respectivo nome e o número de OTU partilhadas entre locais (desde que  $\geq 1$ ). O número de OTU determinados em cada local está indicado nos Apêndices na Tabela 12.

Piso 0 do HJA

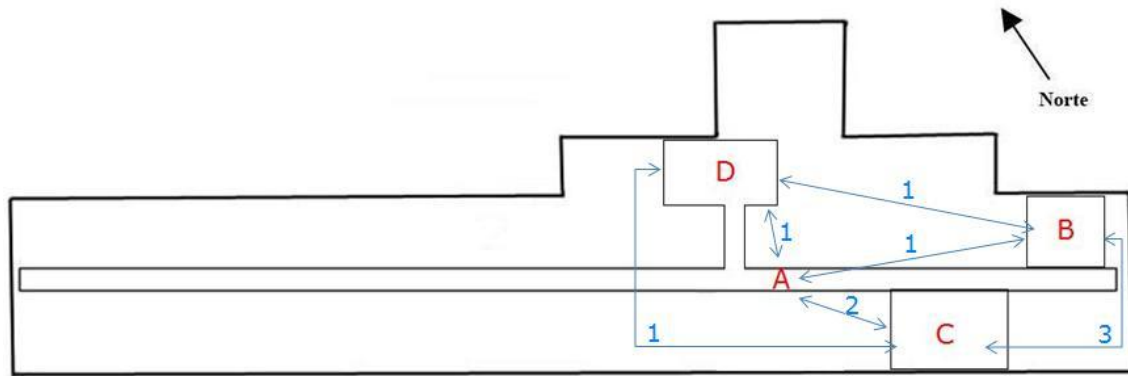


Figura 8 – Diagrama do piso 0 do HJA com indicação do número de OTU partilhadas entre locais. A=Corredor; B=Sala de fisioterapia; C=Sala convívio; D=Lavandaria.

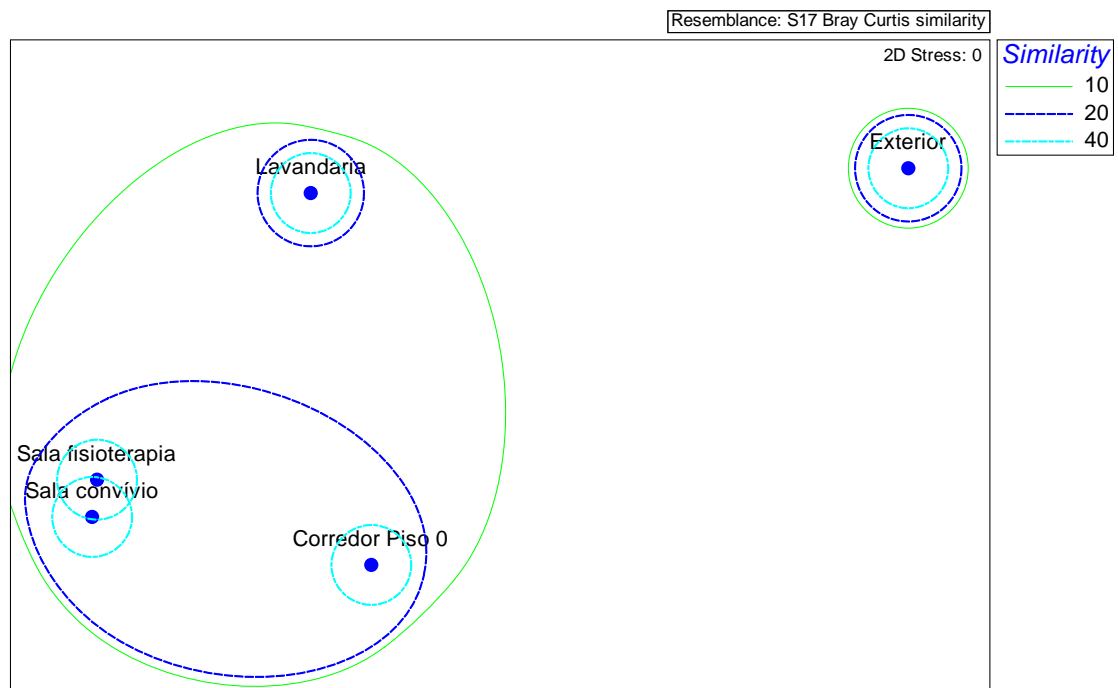


Figura 9 - Gráfico *Multi Dimensional Scaling* (MDS) com base no cálculo de similaridade de *Bray Curtis* entre os locais amostrados no piso 0 do HJA, usando os dados das OTU.

## Piso 1 do HJA

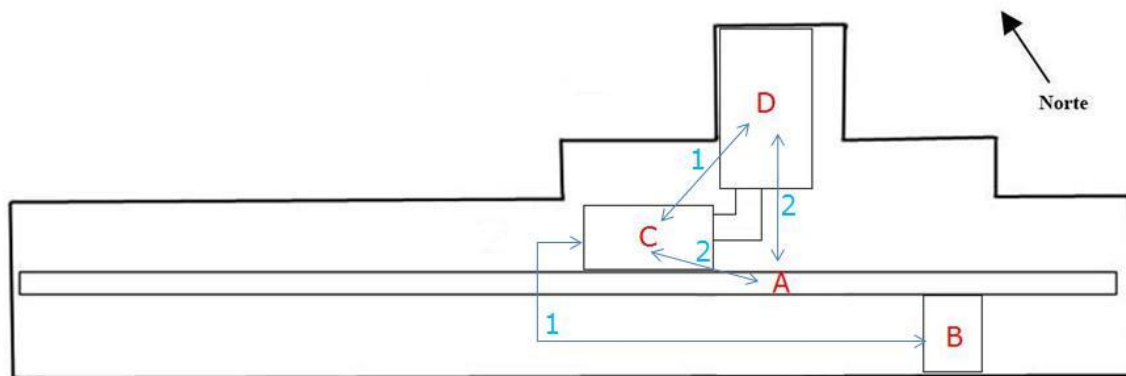


Figura 10 – Diagrama do piso 1 do HJA com indicação do número de OTU partilhadas entre locais. A=Corredor; B=Quarto Castanholas; C=Bar do pessoal; D=Cozinha.

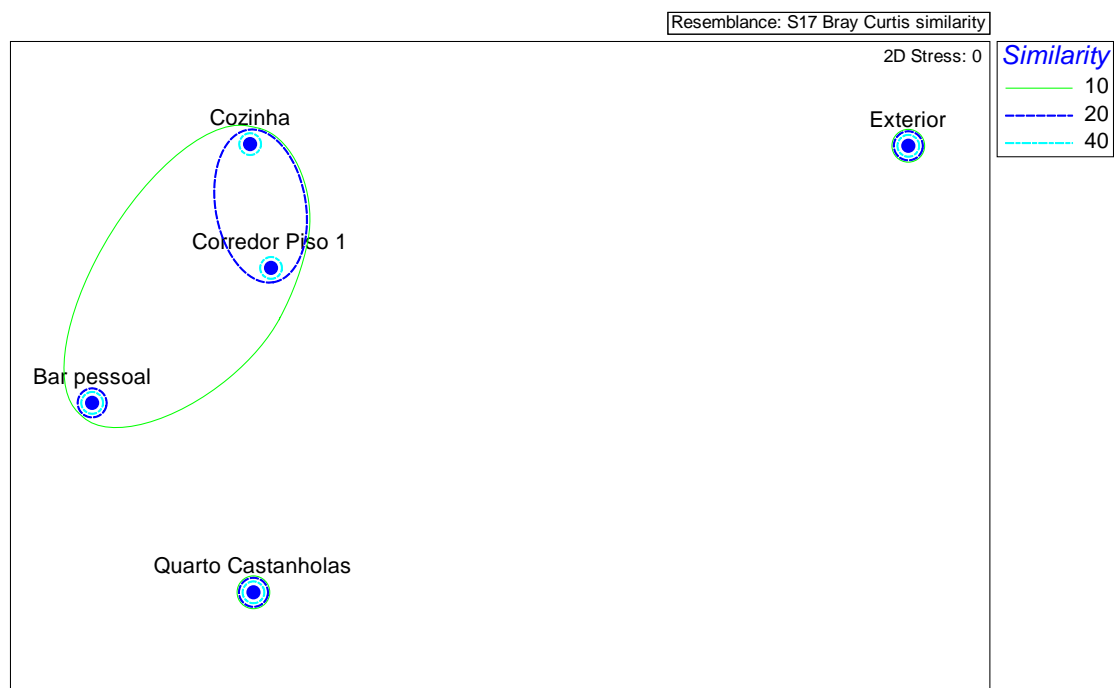


Figura 11 - Gráfico *Multi Dimensional Scaling* (MDS) com base no cálculo de similaridade de *Bray Curtis* entre os locais amostrados no piso 1 do HJA, usando os dados das OTU.

Piso 2 do HJA

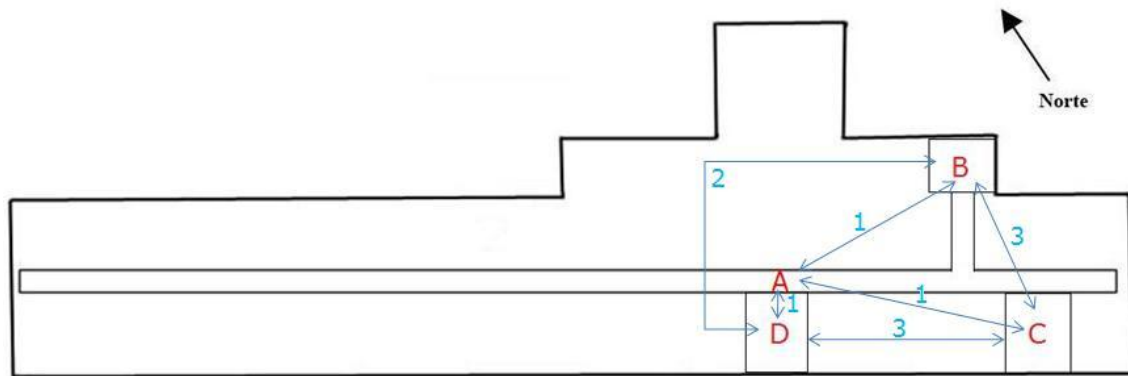


Figura 12 – Diagrama do piso 2 do HJA com indicação do número de OTU partilhadas entre locais. A=Corredor; B=Quarto Papoila; C=Quarto Til; D=Sala de estar modificada para quarto.

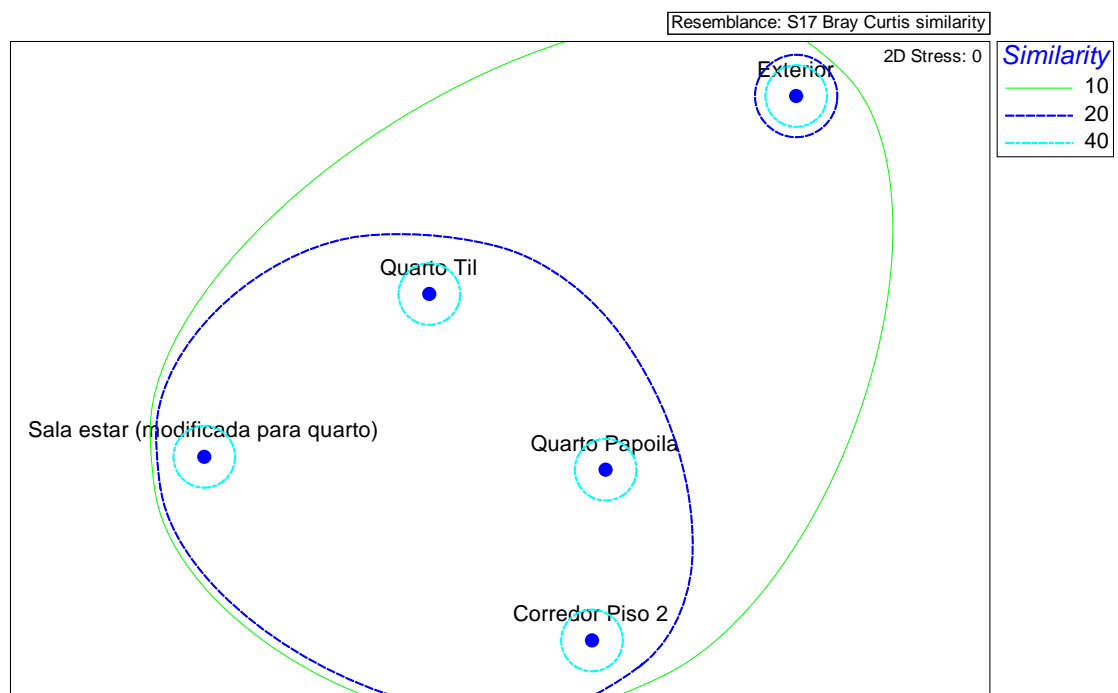


Figura 13 - Gráfico *Multi Dimensional Scaling* (MDS) com base no cálculo de similaridade de *Bray Curtis* entre os locais amostrados no piso 2 do HJA, usando os dados das OTU.

## Piso 3 do HJA

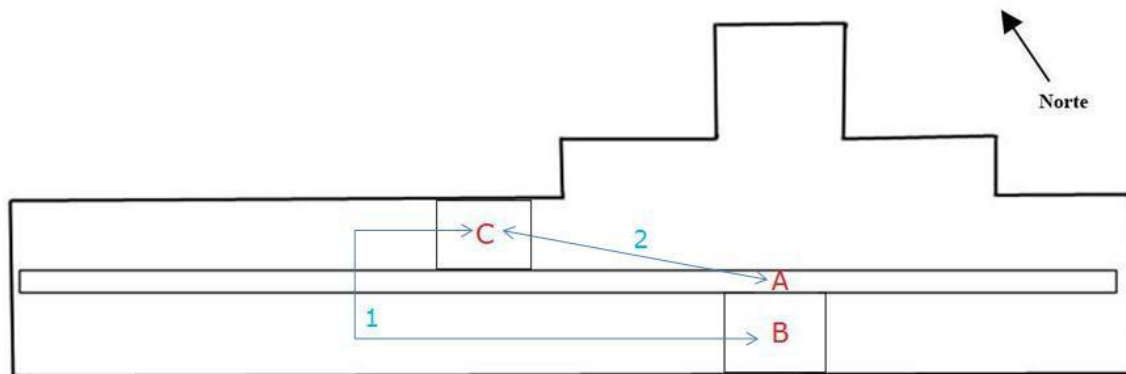


Figura 14 – Diagrama do piso 3 do HJA com indicação do número de OTU partilhadas entre locais. A=Corredor; B=Quarto Toutinegra; C=Quarto Pardal da terra

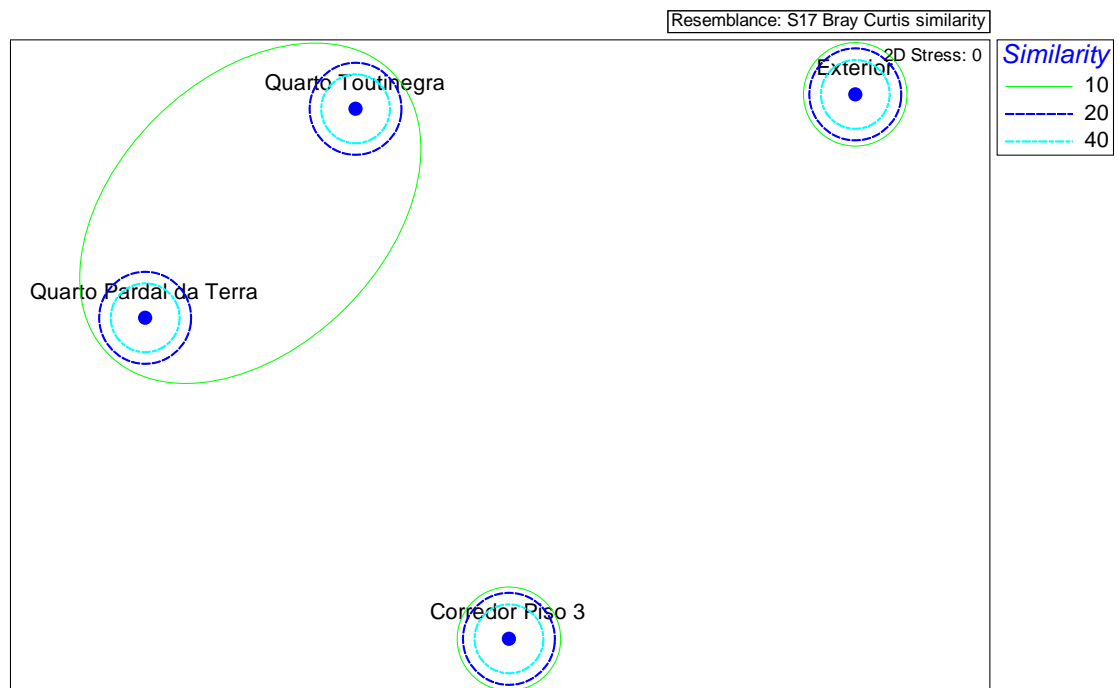


Figura 15 - Gráfico *Multi Dimensional Scaling* (MDS) com base no cálculo de similaridade de *Bray Curtis* entre os locais amostrados no piso 3 do HJA, usando os dados das OTU.

#### 4.4 – COMPARAÇÃO ENTRE O AR INTERIOR E EXTERIOR DO HJA

##### 4.4.1 – COMPARAÇÃO QUALITATIVA DE BACTÉRIAS

São apresentados nas tabelas seguintes os resultados respeitantes à contagem de colónias bacterianas identificadas no ar interior do HJA, no ar exterior e na globalidade dos dados (ar interior e exterior combinados) pelos vários métodos de identificação utilizados. Os dados detalhados estão disponíveis nos Apêndices nas Tabelas 1, 3, 4, 5 e 6.

Tabela 17 – Comparação entre o número de colónias de bactérias detectadas no ar interior e exterior do HJA identificadas por técnicas moleculares.

Identificação	Interior HJA	Exterior HJA	Global
<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	43	2	45
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	17		17
<i>Staphylococcus capitis</i> ou <i>S. caprae</i>	11	1	12
<i>Micrococcus luteus</i>	5	1	6
<i>Staphylococcus sp.</i>	4		4
<i>Moraxella osloensis</i> ou <i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	3		3
<i>Bacillus granadensis</i>	3		3
<i>Kocuria palustris</i>	3		3
<i>Kocuria rhizophila</i>	3		3
<i>Paracoccus yeei</i>	3		3
<i>Staphylococcus kloosii</i>	2		2
<i>Crocino bacterium jejui</i>	2		2
<i>Micrococcus sp.</i>	2		2
<i>Exiguobacterium homiense</i>	1		1
<i>Lactococcus lactis lactis</i>	1		1
<i>Corynebacterium sp.</i>	1		1
<i>Bacillus simplex</i>	1	1	2
<i>Gordonia alkanivorans</i>		1	1
<i>Planococcus sp.</i>		1	1
<i>Staphylococcus hominis hominis</i>		1	1
<b>Total Geral</b>	<b>105</b>	<b>8</b>	<b>113</b>

Foram detectados um total de 20 taxa distintos na globalidade das bactérias processadas para identificação com recurso ao agrupamento em OTU e sequenciação genética, sendo 13 taxa exclusivos do interior do HJA, 3 exclusivos do exterior e 4 taxa partilhados entre o interior e exterior do HJA.

Os dados indicam que relativamente às amostras identificadas, 23% (4 em 17) dos taxa da flora bacteriana do ar interior do HJA também estão presentes no exterior e 57% (60 em 105 colónias) da flora bacteriana do interior, em termos de número de colónias, está também representada no exterior.

Tabela 18 – Comparação entre as OTU de bactérias detectadas no ar interior e exterior do HJA.

Local do HJA	Número de OTU detectadas	Número de colónias pertencentes às OTU
Global	96	192
Interior	91	182
Exterior	9	10
OTU partilhadas entre exterior e interior	4	51 (interior) + 5 (exterior)

Considerando as OTU detectadas, 28% das bactérias do interior (51 de 182 colónias) são geneticamente iguais, de acordo com o padrão de RFLP, às do exterior, o que representa apenas 4% (4 em 96) das OTU detectadas.

Tabela 19 – Comparação entre o número de colónias de bactérias detectadas no ar interior e exterior do HJA identificadas por testes bioquímicos. Não identificado – indica que a bactéria pertence a outro género que não o *Staphylococcus sp.*

Identificação	Interior		Exterior		Global	
	Contagem	%	Contagem	%	Contagem	%
Não identificado	116	32%	16	50%	132	34%
<i>Staphylococcus sp.</i>	244	68%	16	50%	260	66%
<b>Total Geral</b>	<b>360</b>	<b>100%</b>	<b>32</b>	<b>100%</b>	<b>392</b>	<b>100%</b>

Tabela 20 – Comparação entre o número de colónias de bactérias detectadas no ar interior e exterior do HJA identificadas por teste de Gram

Teste Gram	Interior		Exterior		Global	
	Contagem	%	Contagem	%	Contagem	%
Gram positivo	317	88%	22	69%	339	86%
Gram negativo	43	12%	10	31%	53	14%
<b>Total Geral</b>	<b>360</b>	<b>100%</b>	<b>32</b>	<b>100%</b>	<b>392</b>	<b>100%</b>

#### 4.4.2 – COMPARAÇÃO QUANTITATIVA DE BACTÉRIAS

A concentração média de bactérias totais no ar interior do HJA, exterior e na globalidade das amostras são apresentadas na Tabela 21, bem como o respectivo número de amostras, desvio padrão da média e valores máximo e mínimo detectados. Os dados detalhados estão disponíveis nos Apêndices nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 21 – Estatística descritiva da quantificação de bactérias no ar interior e exterior do HJA.

Parâmetro	Interior	Exterior	Global
Número de amostragens	36	5	41
Concentração média de bactérias totais (UFC/m <sup>3</sup> )	413,2	115,0	376,8
Desvio padrão da concentração média de bactérias totais (UFC/m <sup>3</sup> )	118,2	41,8	148,9
Máximo da concentração de bactérias totais (UFC/m <sup>3</sup> )	625,0	181,3	625,0
Mínimo da concentração de bactérias totais (UFC/m <sup>3</sup> )	193,8	81,3	81,3

Foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk à variável concentração de bactérias totais no ar, o qual revelou que a distribuição é normal (Shapiro-Wilk=0,965; *g.l.*=41; *p*=0,228), sendo por esta razão aplicada a estatística paramétrica na análise dos dados.

O teste de Levene para a igualdade das variâncias entre os grupos de amostras do interior e exterior resultou num valor  $F=3,793$  com uma significância =0,059, indicando que as variâncias não são significativamente diferentes. O teste T-student para a igualdade das médias resultou num valor  $t=-5,539$ , graus de liberdade=39 e um nível de significância =0,000. Este teste indica assim que a concentração média de bactérias totais no ar interior do HJA e exterior são significativamente diferentes, em termos estatísticos, sendo predominante uma maior concentração de bactérias no interior comparativamente ao exterior.

#### 4.4.3 – COMPARAÇÃO QUANTITATIVA DE FUNGOS

A concentração média de fungos totais no ar interior do HJA, exterior e na globalidade das amostras são apresentadas na Tabela 22, bem como o respectivo número de amostras, desvio padrão da média e valores máximo e mínimo detectados. Os dados detalhados estão disponíveis nos Apêndices nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 22 – Estatística descritiva da quantificação de fungos no ar interior e exterior do HJA.

Parâmetro	Interior	Exterior	Global
<b>Número de amostragens</b>	36	5	41
<b>Concentração média de fungos totais (UFC/m<sup>3</sup>)</b>	243,8	405,0	263,5
<b>Desvio padrão da concentração média de fungos totais (UFC/m<sup>3</sup>)</b>	133,6	197,6	149,6
<b>Máximo da concentração de fungos totais (UFC/m<sup>3</sup>)</b>	575,0	625,0	625,0
<b>Mínimo da concentração de fungos totais (UFC/m<sup>3</sup>)</b>	100,0	237,5	100,0

Foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk à variável concentração de fungos totais, o qual revelou que a distribuição é não normal (Shapiro-Wilk=0,804, *g.l.*=41, *p*=0,000), sendo assim aplicada a estatística não paramétrica na análise dos dados.

Foi aplicado o teste U de Mann-Whitney para comparar a concentração média de fungos totais no ar interior do HJA e exterior, obtendo-se os resultados de Mann-Whitney  $U=33,000$  e nível de significância=0,023. Este teste indica assim que a concentração média de fungos totais no ar interior do HJA e exterior são significativamente diferentes, em termos estatísticos, sendo predominante uma maior concentração de fungos no exterior comparativamente ao interior do HJA.

## 4.4.4 – EFEITO DA BRUMA NOS BIOAEROSSÓIS

Durante o período de amostragem do ar no HJA ocorreram 2 eventos de bruma, tradicionalmente designado como “tempo de leste”, nos dias 07-05-2009 e 04-06-2009. Estes eventos poderão ter influenciado os dados obtidos uma vez que esta massa de ar proveniente de África transporta muitas partículas, sendo visível à vista desarmada a enorme quantidade de partículas em suspensão, as quais dão uma tonalidade amarela ao ar, podendo ocorrer igualmente transporte de bioaerossóis.

São apresentadas na Tabela 23 as concentrações de bioaerossóis detectadas no ar exterior e interior do HJA, em separado por dias com bruma e por dias normais (sem a ocorrência de bruma).

Tabela 23 - Estatística descritiva da quantificação de bactérias e fungos no ar interior e exterior do HJA em dias com bruma e dias normais (sem bruma).

Tipo de local	Tipo de dia	Número de amostras	Concentração média de bactérias totais (UFC/m <sup>3</sup> )	Desvio padrão da média de bactérias	Concentração média de fungos totais (UFC/m <sup>3</sup> )	Desvio padrão da média de fungos
Interior	Dia com bruma	16	420,7	134,9	315,8	163,6
	Dia normal	20	407,2	106,3	186,3	62,5
Exterior	Dia com bruma	2	109,4	30,9	618,8	8,8
	Dia normal	3	118,8	54,5	262,5	43,3
<b>Total Geral</b>		<b>41</b>	<b>376,8</b>	<b>148,9</b>	<b>263,5</b>	<b>149,6</b>

O teste de Levene para a igualdade das variâncias entre as amostras respeitantes à concentração de bactérias no ar em dias com bruma e dias normais resultou num valor  $F=1,934$  com uma significância  $=0,259$  e num valor  $F=1,087$  com uma significância  $=0,305$  para os dados do exterior e interior respectivamente, indicando que as variâncias não são significativamente diferentes. O teste T-student para a igualdade das médias da concentração de bactérias totais no ar resultou num valor  $t=0,214$ , graus de liberdade=3 e um nível de significância  $=0,844$  e num valor  $t=-0,305$ , graus de liberdade=34 e um nível de significância  $=0,739$  para o ar exterior e interior respectivamente. Este teste indica assim que a concentração média de bactérias totais no ar não difere significativamente entre dias normais e com bruma, tanto relativamente ao ar interior do HJA como ao exterior.

Foi aplicado o teste U de Mann-Whitney para comparar a concentração média de fungos totais no ar entre dias normais e com bruma, tanto no ar interior do HJA como no exterior, obtendo-se os resultados de Mann-Whitney  $U=77,000$  e nível de significância  $=0,008$  e Mann-Whitney  $U=0,000$  e nível de significância  $=0,076$  respectivamente. Este teste indica assim que a concentração média de fungos totais no ar é significativamente diferente no interior do HJA

entre dias normais e com bruma, ocorrendo maior concentração de fungos no ar interior durante eventos de bruma, enquanto no exterior as concentrações não diferem significativamente entre dias normais e com bruma.

#### 4.5 – INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E CARACTERÍSTICAS DOS LOCAIS NA CONCENTRAÇÃO DE BIOAEROSSÓIS

Neste ponto foram analisados os dados referentes apenas ao ar interior do HJA, sendo também, análise por análise, seleccionados os dados dos locais que se consideram adequados à detecção da relação causa efeito. Os dados detalhados estão disponíveis nos Apêndices nas Tabelas 1 e 2.

##### 4.5.1 – CORRELAÇÃO COM PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Uma vez que a variável concentração de bactérias totais e as variáveis temperatura (Shapiro-Wilk=0,969; *g.l.*=23; *p*=0,665), humidade relativa (Shapiro-Wilk=0,956; *g.l.*=23; *p*=0,387) e concentração de CO<sub>2</sub> (Shapiro-Wilk=0,979; *g.l.*=23; *p*=0,896) têm uma distribuição normal enquanto a variável concentração de fungos totais tem uma distribuição não normal.

Foram calculados os coeficientes de correlação de Pearson no caso da concentração de bactérias, e os coeficientes de correlação de Spearman no caso da concentração de fungos.

A variável concentração de NO<sub>2</sub> não foi considerada por ser constante no valor 0 em quase todas as medições, à excepção de uma medição na lavandaria.

Tabela 24 – Correlação de Pearson entre a concentração de bactérias totais no ar interior do HJA e as variáveis físico-químicas. \*-correlação significativa

Parâmetro	Correlação de Pearson com a Concentração de bactérias totais	Significância	Número de amostras
Temperatura	-0,051	0,769	36
Humidade relativa	0,245	0,150	36
Concentração de CO <sub>2</sub>	0,459(*)	0,042	20

Verifica-se que a concentração de bactérias totais no ar interior do HJA está significativamente correlacionada apenas com concentração de CO<sub>2</sub>, sendo a correlação positiva, indicando que com o aumento da concentração de CO<sub>2</sub> no ar verifica-se um aumento da concentração de bactérias no ar.

Tabela 25 – Correlação de Spearman entre a concentração de fungos totais no ar interior do HJA e as variáveis físico-químicas.

Parâmetro	Correlação de Spearman com a Concentração de fungos totais	Significância	Número de amostras
Temperatura	0,311	0,065	36
Humidade relativa	-0,091	0,596	36
Concentração de CO <sub>2</sub>	0,140	0,557	20

Não foram detectadas correlações estatisticamente significativas entre a concentração de fungos no ar e as variáveis físico-químicas.

#### 4.5.2 – CORRELAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS DO LOCAL

##### 4.5.2.1 – GRAU DE MOVIMENTAÇÃO DE PESSOAS NO LOCAL

São apresentadas as concentrações médias de microorganismos no ar detectadas nos locais do interior do HJA tipificados como quartos, corredores e salas, sendo os dados discriminados por grau de movimentação das pessoas no local amostrado.

Tabela 26 – Concentrações médias de microorganismos no ar interior do HJA discriminados por grau de movimentação de pessoas no local amostrado.

Grau de movimentação de pessoas	Número de amostras	Concentração média de bactérias totais (UFC/m <sup>3</sup> )	Concentração média de fungos totais (UFC/m <sup>3</sup> )
0-Nulo	12	338,5	196,4
1-Muito baixo	4	425,0	196,9
2-Baixo	4	372,6	231,4
3-Médio	7	492,9	255,4
4-Alto	2	584,4	234,4
5-Muito alto	1	600,0	206,3
<b>Total Geral</b>	<b>30</b>	<b>415,7</b>	<b>217,7</b>

A concentração de bactérias no ar está correlacionada positivamente e de forma estatisticamente significativa com o grau de movimentação de pessoas no local (Correlação Spearman=0,658;  $N=30$ ;  $p=0,000$ ), indicando que quanto maior o grau de movimentação de pessoas no local, maior é a concentração de bactérias no ar. No caso dos fungos, a correlação não é estatisticamente significativa (Correlação Spearman=0,326;  $N=30$ ;  $p=0,079$ ).

Foram detectadas diferenças significativas entre as concentrações de bactérias em quartos com diferentes graus de movimentação de pessoas (teste Kruskal-Wallis;  $Chi^2=15,476$ ;  $g.l.=5$ ;  $p=0,009$ ) enquanto no caso dos fungos as diferenças não são significativas (teste Kruskal-Wallis;  $Chi^2=3,918$ ;  $g.l.=5$ ;  $p=0,561$ ).

#### 4.5.2.2 – NÚMERO DE PESSOAS NO LOCAL

Na Tabela 27 são apresentadas as concentrações médias de microorganismos no ar nos locais do interior do HJA tipificados como quartos e salas, sendo os dados discriminados por número de pessoas no respectivo local amostrado.

Tabela 27 – Concentrações médias de microorganismos no ar interior do HJA discriminados por número de pessoas no local.

Número de pessoas no local	Número de amostras	Concentração média de bactérias totais (UFC/m <sup>3</sup> )	Concentração média de fungos totais (UFC/m <sup>3</sup> )
2	9	325,7	163,9
3	2	365,6	350,0
4	2	365,6	196,9
6	1	400,0	181,3
7	2	484,4	196,9
8	1	600,0	206,3
14	1	556,3	262,5
21	1	418,8	206,3
23	1	481,3	143,8
<b>Total Geral</b>	<b>20</b>	<b>390,9</b>	<b>198,1</b>

A concentração de bactérias no ar está correlacionada positivamente e de forma estatisticamente significativa com o número de pessoas no local (Correlação Spearman=0,614;  $N=20$ ;  $p=0,004$ ), indicando que quanto maior o número de pessoas no local, maior é a concentração de bactérias no ar. No caso dos fungos, este tipo de correlação é estatisticamente não significativa (Correlação Spearman=0,301;  $N=20$ ;  $p=0,198$ ).

Não existem diferenças significativas entre as concentrações de microorganismos em quartos com diferentes números de pessoas, tanto no caso das bactérias (teste Kruskal-Wallis;  $Chi^2=10,085$ ;  $g.l.=8$ ;  $p=0,259$ ) como no caso dos fungos (teste Kruskal-Wallis;  $Chi^2=5,290$ ;  $g.l.=8$ ;  $p=0,726$ ).

#### 4.5.2.3 – VENTILAÇÃO PRÉVIA DO LOCAL

Na Tabela 28 são apresentadas as concentrações médias de microorganismos no ar nos locais do interior do HJA tipificados como quartos, sendo os dados discriminados por quarto com e sem ventilação prévia do local relativamente ao momento da amostragem do ar.

Tabela 28 – Concentrações médias de microorganismos no ar interior do HJA, discriminados por tipo de ventilação prévia do local.

Ventilação prévia do local	Número de amostras	Concentração média de bactérias totais (UFC/m <sup>3</sup> )	Concentração média de fungos totais (UFC/m <sup>3</sup> )
<b>Não (Janelas fechadas)</b>	11	402,8	196,6
<b>Sim (Janelas abertas)</b>	5	342,5	217,5
<b>Total Geral</b>	<b>16</b>	<b>384,0</b>	<b>203,1</b>

Verifica-se uma maior concentração de bactérias no ar nos quartos quando estes não tiveram uma ventilação prévia. No caso da concentração de fungos no ar a tendência foi inversa, ou seja, existiam menos fungos no ar quando não houve ventilação prévia.

No entanto, as diferenças entre as concentrações médias de bactérias (teste T-student;  $T=0,991$ ;  $g.l.=14$ ;  $p=0,338$ ) e de fungos (teste U de Mann-Whitney;  $U=13,500$ ;  $p=0,112$ ) entre quartos com e sem ventilação prévia não são estatisticamente significativas.

#### 4.5.2.4 – LIMPEZA DOS QUARTOS

Na Tabela 29 são apresentadas as concentrações médias de microorganismos no ar nos locais do interior do HJA tipificados como quartos, sendo os dados discriminados por quarto com a limpeza já feita e por fazer relativamente ao momento da amostragem do ar.

Tabela 29 – Concentrações médias de microorganismos no ar interior do HJA, discriminados por quartos com limpeza feita e por fazer.

Limpeza do quarto	Número de amostras	Concentração média de bactérias totais (UFC/m <sup>3</sup> )	Concentração média de fungos totais (UFC/m <sup>3</sup> )
<b>Por fazer</b>	8	407,8	232,8
<b>Feita</b>	8	360,2	173,4
<b>Total Geral</b>	<b>16</b>	<b>384,0</b>	<b>203,1</b>

Verifica-se que existe uma maior concentração de fungos e bactérias no ar nos quartos por limpar comparativamente aos quartos previamente limpos.

No entanto, as diferenças existentes entre as concentrações médias não são estatisticamente significativas tanto para as bactérias (teste T-student;  $T=0,836$ ;  $g.l.=14$ ;  $p=0,417$ ), como para os fungos (teste U de Mann-Whitney;  $U=22,500$ ;  $p=0,318$ ).

## 4.6 – AMOSTRAS SEQUENCIADAS

São apresentados as características das 24 amostras bacterianas seleccionadas para identificação por sequenciação e respectivos resultados da identificação pela base de dados *Bio Informatic Bacteria Identification* (BIBI). Dados detalhados presentes nos Apêndices nas Tabelas 4 e 7, e informação adicional presente nos Apêndices nas Tabelas 8 a 11 e Figura 31.

Tabela 30 – Informação geral acerca das amostras bacterianas sequenciadas.

Número da amostra	Número da colónia	Nome da OTU representada (padrão de RFLP)	Tamanho da sequência (pb)	Número de bases não determinadas	Fiabilidade da sequência	Local de amostragem
3	3	A-B	661	0	Fiável	Corredor Piso 3
3	45	P-D	584	1R	Fiável	Corredor Piso 3
4	10	AN-D	504	12N	Suspeita	Quarto Toutinegra
9	40	W-M	727	1R	Fiável	Quarto Parda da Terra
9	65	A-A	1372	0	Fiável	Quarto Parda da Terra
9	77	R-D	669	0	Fiável	Quarto Parda da Terra
14	10	AE-Z	906	0	Fiável	Exterior - Terraço
14	15	AI-S	834	1R	Fiável	Exterior - Terraço
14	18	J-V	492	0	Suspeita	Exterior - Terraço
15	51	AD-A	730	0	Fiável	Quarto Til
21	53	T-A	662	0	Fiável	Sala estar (modificada para quarto)
23	14	AE-AE	561	11N	Suspeita	Exterior - Átrio entrada
25	15	AU-AU	567	0	Fiável	Sala convívio
25	57	I-AH	730	1N	Suspeita	Sala convívio
28	61	R-AI	834	1R	Fiável	Lavandaria
29	45	AE-L	659	1Y	Fiável	Sala convívio
30	11	AE-AS	664	1Y	Fiável	Sala fisioterapia
31	60	AG-D	671	0	Fiável	Corredor Piso 0
33	38	N-Y	727	0	Fiável	Corredor Piso 1
35	10	AL-AP	740	0	Fiável	Bar pessoal
35	67	AK-A	735	0	Fiável	Bar pessoal
35	73	AJ-K	739	0	Fiável	Bar pessoal
37	16	AF-BC	504	9N	Suspeita	Corredor Piso 1
37	32	T-B	565	34N	Suspeita	Corredor Piso 1

Tabela 31 – Resultados da identificação das amostras sequenciadas pela base de dados *Bio Informatic Bacteria Identification* (BIBI). Homologia (N) - número de nucleótidos iguais entre sequências / número de nucleótidos totais da sequência da amostra; Referências bibliográficas relativas às sinonímias: 1- Sneath (1992), 2- CCUG, 3- Yoon *et al* (2000), 4- Arenskötter *et al* (2005), 5- IJSEM (2003)

Número da amostra	Número da colônia	Identificação final da base de dados BIBI	Sequência com maior homologia e número de acesso no GenBank	Homologia (N)	Homologia (%)
3	3	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	<i>Staphylococcus cohnii urealyticum</i> (AB009936) (syn. <i>S. cohnii urealyticus</i> ) <sup>1</sup>	661/661	100%
3	45	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i> (AJ536198), <i>Micrococcus luteus</i> (AF542073)	582/584	99,66%
4	10	<i>Micrococcus sp.</i>	<i>Micrococcus luteus</i> (AJ536198), <i>Micrococcus luteus</i> (AF542073) <i>Micrococcus thailandicus</i> (AB247644)	489/504	97,02%
9	40	<i>Moraxella osloensis</i> ou <i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i> (AJ550856) (syn. <i>Moraxella osloensis</i> ) <sup>2</sup>	724/727	99,59%
9	65	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	<i>Staphylococcus cohnii urealyticum</i> (AB009936) (syn. <i>S. cohnii urealyticus</i> ) <sup>1</sup>	1372/1372	100%
9	77	<i>Kocuria palustris</i>	<i>Kocuria palustris</i> (Y16263)	669/669	100%
14	10	<i>Bacillus simplex</i>	<i>Bacillus simplex</i> (AJ628743), <i>Bacillus simplex</i> (AB363738)	906/906	100%
14	15	<i>Gordonia alkanivorans</i>	<i>Gordonia nitida</i> (AF148947) (syn. <i>G. alkanivorans</i> ) <sup>3,4</sup>	833/834	99,88%
14	18	<i>Staphylococcus hominis hominis</i>	<i>Staphylococcus hominis hominis</i> (Z26905)	492/492	100%
15	51	<i>Staphylococcus capitis</i> ou <i>S. caprae</i>	<i>Staphylococcus caprae</i> (AB009935), <i>S. capitis urealyticus</i> (AB233325)	730/730	100%
21	53	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (AP006716), <i>Staphylococcus haemolyticus</i> (D83367)	662/662	100%
23	14	<i>Planococcus sp.</i>	<i>Planococcus rifitiensis</i> (AJ493659)	532/556	95,68%
25	15	<i>Paracoccus yeei</i>	<i>Paracoccus yeeii</i> (AY014173) (syn. <i>Paracoccus yeei</i> ) <sup>5</sup>	576/576	100%
25	57	<i>Paracoccus yeei</i>	<i>Paracoccus yeeii</i> (AY014173) (syn. <i>Paracoccus yeei</i> ) <sup>5</sup>	729/730	99,86%
28	61	<i>Kocuria rhizophila</i>	<i>Kocuria rhizophila</i> (Y16264)	833/834	99,88%
29	45	<i>Bacillus granadensis</i>	<i>Bacillus granadensis</i> (DQ400692)	644/657	98,02%
30	11	<i>Crocino bacterium jejui</i>	<i>Crocino bacterium jejui</i> (AM295339)	653/664	98,34%
31	60	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i> (AJ536198), <i>Micrococcus luteus</i> (AF542073)	671/671	100%
33	38	<i>Staphylococcus kloosii</i>	<i>Staphylococcus kloosii</i> (AB009940)	727/727	100%
35	10	<i>Lactococcus lactis lactis</i>	<i>Lactococcus lactis lactis</i> (AB100803), <i>Lactococcus lactis lactis</i> (AB008215)	739/740	99,86%
35	67	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (AP006716), <i>Staphylococcus haemolyticus</i> (D83367)	735/735	100%
35	73	<i>Exiguobacterium homiense</i>	<i>Exiguobacterium homiense</i> (DQ351341)	736/739	99,59%
37	16	<i>Corynebacterium sp.</i>	<i>Corynebacterium afermentans</i> (X82055), <i>Corynebacterium afermentans</i> (X82054)	467/498	93,78%
37	32	<i>Staphylococcus sp.</i>	<i>Staphylococcus hominis</i> (X66101)	526/565	93,10%

A árvore filogenética apresentada na Figura 16 resume a similaridade de sequências do gene 16S rRNA entre as amostras sequenciadas neste trabalho e as bactérias mais próximas filogeneticamente com sequências disponíveis na base de dados BIBI. O agrupamento foi efectuado pelo método de *Neighbor-Joining*, com base no número de diferenças nucleotídicas entre as sequências, com teste de *Bootstrap* com 1000 replicados e com eliminação completa das posições nucleotídicas sem dados, resultando em 325 posições nucleotídicas consideradas na análise. Nos Apêndices estão disponíveis as árvores filogenéticas individuais relativas a cada amostra sequenciada neste trabalho nas Figuras 6 a 30 e o alinhamento das sequências das amostras consta na Figura 31.

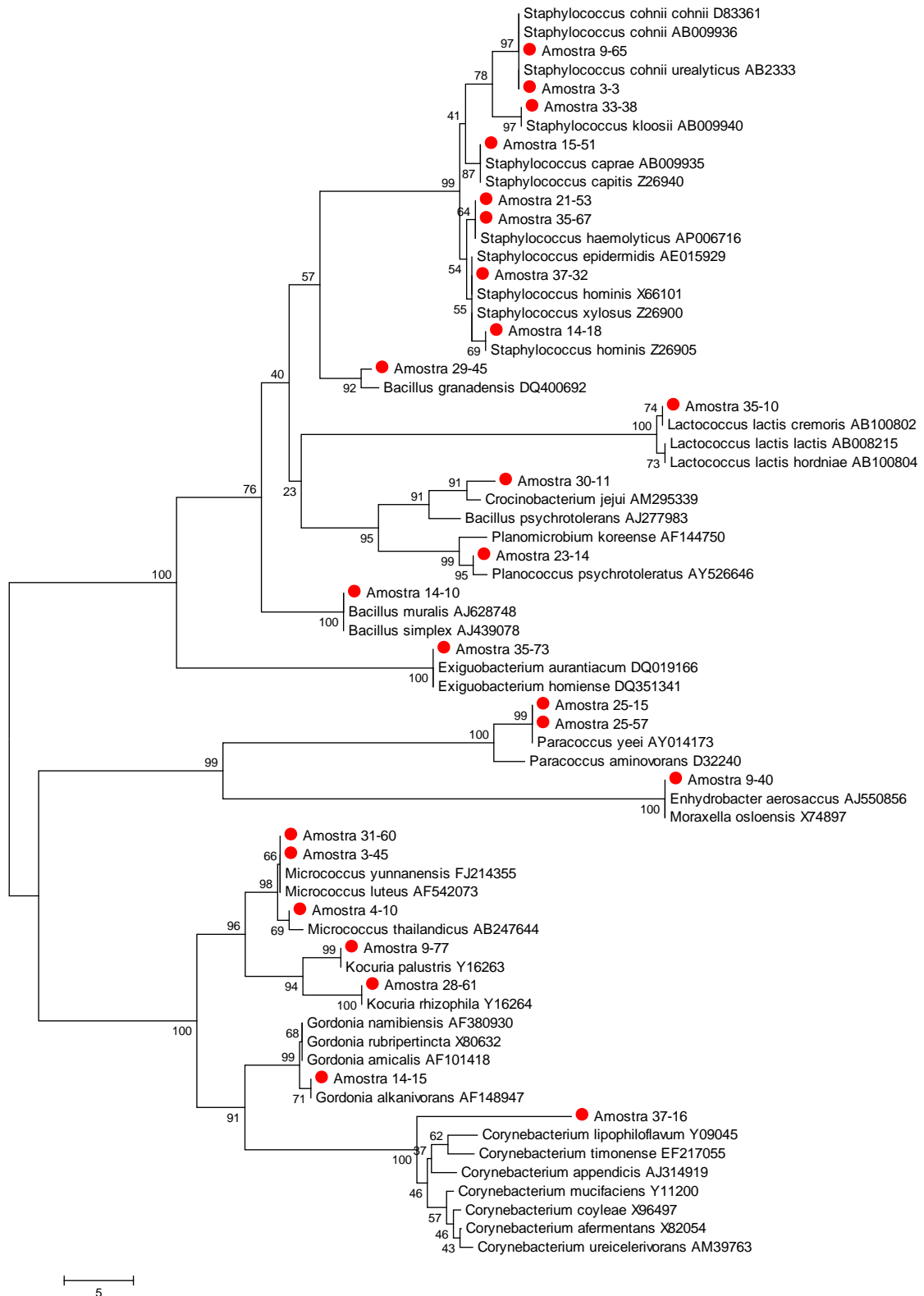


Figura 16 – Árvore filogenética com amostras deste trabalho e bactérias de estirpes tipo mais próximas filogeneticamente com base na sequência do gene 16S rRNA. Agrupamento *Neighbor-Joining* pelo número de nucleótidos diferentes, com teste de *Bootstrap* com 1000 replicados, com eliminação completa de posições nucleotídicas sem informação, sendo considerados 325 nucleótidos de todas as sequências na análise. Amostras marcadas a vermelho.

### 5.1 – FLORA BACTERIANA DETECTADA NO AR INTERIOR DO HJA

A flora bacteriana aerosolizada no interior do HJA é claramente dominada pelas bactérias gram positivas, que perfazem pelo menos 88% da flora, com as gram negativas a constituir os restantes 12%. Os cocos gram positivos constituem pelo menos 73% das bactérias existentes no ar (ver Tabela 8), seguidas pelos bacilos gram positivos (11%) e pelos cocos e bacilos gram negativos (6% e 5% respectivamente). Estes resultados são concordantes com o domínio de bactérias gram positivas em geral, e cocos gram positivos em particular, registados noutros trabalhos sobre a flora bacteriana aerosolizada em ambiente hospitalar, nomeadamente num Hospital Distrital não identificado no Nordeste de Portugal, onde foram amostrados o bloco operatório de ortopedia, corredores e serviço central de esterilização (Santos, 2008), em 5 hospitais gerais na Coreia do Sul com capacidade para 400 a 600 pacientes, nos quais foram amostrados o lobby de entrada, unidade de cuidados intensivos, laboratório e sala de recobro de cirurgia (Kim *et al*, 2010), num hospital em Florianópolis no Brasil, no qual foram amostradas as unidades de tratamento intensivo para adultos e neonatal e o centro cirúrgico (Quadros *et al*, 2009), e em ambiente interior de edifícios urbanos com outros tipos de utilização, como 2 restaurantes na China (Chan *et al*, 2009), mais de 100 apartamentos na Polónia (Górny e Dutkiewicz, 2002) e 2 centros comerciais em Singapura (Tringe *et al*, 2008). Efectivamente, os 88% de bactérias gram positivas e os 73% de cocos gram positivos detectados no HJA são muito próximos da média de cerca de 93% e 72%, respectivamente, detectada noutros hospitais (Kim *et al*, 2010). Comparando com a flora bacteriana aerosolizada detectada noutro hospital português, onde foram registadas 100% de bactérias gram positivas e 99,7% de cocos gram positivos (Santos, 2008), as percentagens registadas no HJA foram mais baixas, sendo no entanto de relembrar que devido à metodologia utilizada as percentagens reais deverão ser superiores às apresentadas, pelo que deverão ser mais próximas das desse hospital. Conclui-se assim que não existe um desvio significativo da flora bacteriana aerosolizada do HJA em relação à existente noutros hospitais.

O domínio do género *Staphylococcus* no ar interior do HJA é inegável ao perfazer pelo menos 68% da globalidade da flora bacteriana (ver **Erro! A origem da referência não foi encontrada.**), alientando-se as espécies mais comuns *S. cohnii urealyticus*, representativa de pelo menos 12% da flora bacteriana total, *S. haemolyticus* (5%), *S. capitis* ou *S. caprae* (3%) e *S. kloosii* (1%), sendo que os restantes 48% de bactérias da flora global que pertencem ao género *Staphylococcus* ficaram por identificar até à espécie. Os restantes 32% da globalidade da flora

bacteriana aerossolizada no interior do HJA são respeitantes a outros géneros que não o *Staphylococcus* e dividem-se pelas espécies *Micrococcus luteus*, *Micrococcus sp.*, *Bacillus granadensis*, *Bacillus simplex*, *Moraxella osloensis* ou *Enhydrobacter aerosaccus*, *Kocuria palustris*, *Kocuria rhizophila*, *Paracoccus yeei*, *Crocino bacterium jeju*, *Corynebacterium sp.*, *Exiguobacterium homiense*, *Lactococcus lactis lactis*, as quais representam cada uma cerca de 1% da globalidade da flora bacteriana, tendo ficado por identificar 24% de bactérias da flora global que não pertencem ao género *Staphylococcus*. É de referir que as espécies identificadas são, na sua maioria, as mais frequentes em cada um dos grupos mencionados na identificação por métodos bioquímicos, nomeadamente “*Staphylococcus sp.*” e “Outros géneros”, pelo que as espécies mais frequentes de cada grupo estão representadas.

O domínio do género *Staphylococcus* no ar interior do HJA, perfazendo no mínimo 68% de toda a flora bacteriana, é muito próximo dos 73% registados noutra hospital português (Santos, 2008), mas superior aos 51% registados em hospitais coreanos (Kim *et al*, 2010) e aos 43% registados num hospital brasileiro (Quadros *et al*, 2009). A maior proporção de *Staphylococcus* no ar dos hospitais portugueses poderá indicar uma provavelmente maior representatividade de bactérias provenientes da flora bacteriana associada ao corpo humano, uma vez que este género bacteriano é dos mais frequentes no corpo humano (Murray *et al*, 2005).

As 4 espécies bacterianas mais frequentes no ar interior do HJA também foram detectadas noutra hospital português, nomeadamente as mais frequentes no outro hospital, *Staphylococcus cohnii* e *Micrococcus luteus* e as menos frequentes *S. haemolyticus* e *S. caprae*, enquanto relativamente aos géneros bacterianos, ambos os hospitais partilhavam *Staphylococcus*, *Micrococcus* e *Kocuria* (Santos, 2008). Também em hospitais na Coreia do Sul foram detectados vários géneros bacterianos iguais aos encontrados no HJA, nomeadamente *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* e *Bacillus* (Kim *et al*, 2010). Isto indica que a flora bacteriana do HJA é semelhante à existente noutros hospitais.

Entre as espécies bacterianas identificadas no ar interior do HJA, que incluem as bactérias mais frequentemente presentes no ar, não foi detectada nenhuma das espécies provenientes de isolados clínicos de pacientes do Serviço Regional de Saúde no mesmo ano da realização deste trabalho e relacionadas com infecções nosocomiais ou de comunidade (Serviço Regional de Saúde, 2009), pelo que o risco de contrair uma infecção bacteriana por uma destas espécies patogénicas no HJA através de dispersão pelo ar deverá ser baixo. Por outro lado, as espécies frequentemente associadas a IN segundo Brachman e Abrutyn (2009) detectadas no ar interior do HJA foram apenas as *Staphylococcus* coagulase negativas, o que inclui todas as espécies deste género identificadas no HJA. No entanto, a maioria destas bactérias são membros da

flora habitual nos humanos e *S. cohnii*, *S. capitis*, *S. caprae* e *S. kloosii* raramente causam doença humana, enquanto apenas *S. haemolyticus* é conhecida por frequentemente causar doença (Murray *et al*, 2005). Tendo em conta que *S. haemolyticus* foi a segunda espécie mais frequente no ar do HJA e tem potencial patogénico, esta deverá ser uma espécie a ter em consideração futuramente em relação a potencial contaminação de ocupantes do edifício.

Comparando a flora bacteriana do ar interior do HJA com a flora presente no ar de outros tipos de edifícios, os géneros *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Lactococcus*, *Paracoccus*, e *Moraxella* são partilhados com centros comerciais (Tringe *et al*, 2008), *Micrococcus* e *Bacillus* são partilhados com restaurantes (Chan *et al*, 2009) e *Micrococcus*, *Kocuria*, *Staphylococcus*, *Bacillus* são partilhados com apartamentos (Górny e Dutkiewicz, 2002). O elevado grau de partilha da flora bacteriana do ar do HJA com outros tipos de edifícios indica que a flora é relativamente similar entre edifícios, devendo este conjunto bacteriano ser relativamente comum no ambiente interior de edifícios em geral, facto também corroborado por Tringe *et al* (2008), que detectou na flora do ar interior de centros comerciais organismos similares aos detectados em hospitais e comumente isolados em ambiente ocupados por humanos.

A grande maioria das espécies identificadas no ar interior do HJA pertence à flora bacteriana comum que coloniza o ser humano (ver Tabela 9), havendo uma representatividade reduzida de bactérias de origem ambiental. A origem de cada bactéria é discutida em detalhe no tópico 5.6. É no entanto evidente que a principal fonte de bactérias aerossolizadas no ar interior do HJA é o próprio ser humano ocupante do edifício, havendo também alguma intromissão de bactérias de origem ambiental, como seria expectável pela utilização de ventilação natural e não filtrada no edifício e já reportado anteriormente noutros edifícios residenciais (Pastuszka *et al*, 2000; Wu *et al*, 2000).

Este predomínio das espécies associadas ao ser humano era expectável tendo em conta a ocupação humana do edifício e sendo conhecido que as bactérias colonizadoras da pele humana e o tracto respiratório superior são habitualmente libertadas para o ar pelo ser humano (Clark e Calcina-Goff, 2009; Fang *et al*, 2008) e indica que os ocupantes do HJA são os principais focos de contaminação do ar por bactérias, não havendo focos significativos com outras origens e potencial patogénico a registar.

Tendo em conta que muitas das espécies encontradas no ar interior do HJA também foram encontradas na pele humana (Grice *et al*, 2008, 2009) e no ar e pó do interior de edifícios ocupados por humanos (Rintala *et al*, 2008; Täubel *et al*, 2009), a pele humana parece ser efectivamente a origem mais frequente das bactérias existentes no ambiente interior de edifícios ocupados por humanos.

Noutros hospitais já tinha sido reportado que os principais factores que influenciam os microorganismos no ar interior são a actividade humana, material orgânico proveniente do exterior e eficiência da ventilação do hospital (Jaffal *et al*, 1997; Li e Hou, 2003), tal como verificado no HJA. Noutro tipo de edifícios já tinha sido reportado que as espécies detectadas no ar interior eram representativas da pele e tracto respiratório de humanos e do solo (Chan *et al*, 2009).

Relativamente ao risco associado às espécies bacterianas identificadas no ar interior do HJA, apenas *Staphylococcus haemolyticus* é uma espécie patogénica reconhecida por frequentemente causar doença humana, como a bacteremia, endocardite, infecções urinárias, de ossos e de feridas, enquanto *S. cohnii urealyticus*, *S. capitis*, *S. caprae* e *Paracoccus yeei* apresentam um potencial patogénico pouco frequente (Daneshvar *et al*, 2003; Murray *et al*, 2005). Quantitativamente, a única espécie frequentemente patogénica, *S. haemolyticus*, representa pelo menos 5% da flora bacteriana presente no ar interior do HJA, enquanto todas as espécies com potencial patogénico, frequente ou raro, representam 21% da flora bacteriana. Uma baixa proporção de bactérias patogénicas no ar interior de hospitais foi detectada noutros hospitais (Jaffal *et al*, 1997; Kim *et al*, 2010), rondando apenas 1% da flora bacteriana total, pelo que o HJA tendo uma proporção superior de bactérias patogénicas deverá tomar medidas de remediação como por exemplo aumentar a ventilação do interior. Noutro tipo de edifícios, a maioria das bactérias detectadas eram patogénicas oportunistas (Chan *et al*, 2009).

Tendo em linha de conta que a metodologia adoptada na selecção das colónias bacterianas a serem processadas para identificação implicava a amostragem de colónias morfológicamente distintas, ao invés de uma amostragem aleatória, é esperado o enviesamento dos dados quantitativos associados a qualquer um dos níveis de identificação. Assim, as bactérias mais comuns foram tendencialmente sub-estimadas enquanto as mais raras foram sobre-estimadas em termos quantitativos.

Analisando o gráfico de acumulação de OTU por esforço de amostragem e estimadores de diversidade, aplicado aos dados das OTU detectadas no ar interior do HJA (Figura 3 nos Apêndices), verifica-se que é estimada a existência de cerca de 130 a 280 OTU no ar interior, ao invés das apenas 91 detectadas neste trabalho, pelo que os dados analisados sob abordagem por OTU reportam-se a apenas cerca de 33% a 70% de toda a diversidade bacteriana presente no HJA. Tendo em conta que foram identificadas por sequenciação apenas 21 OTU bacterianas presentes no ar interior, pelo que foram identificadas 8% a 16% das OTU existentes. É de ressaltar contudo que nem todas as OTU representam um taxon distinto (discussão detalhada no tópico 5.6), pelo que o número de espécies bacterianas existentes não é tão elevado como o número estimado de OTU.

A discussão dos dados quantitativos da flora bacteriana aerossolizada no interior do HJA é abordada no próximo tópico.

## 5.2 – QUALIDADE DO AR INTERIOR DO HJA

### 5.2.1 – BACTÉRIAS

Analisando a flora bacteriana aerossolizada no interior do HJA de forma quantitativa (ver Tabela 10 e Tabela 11), verificou-se que a sua concentração teve uma média de 413,2 UFC/m<sup>3</sup> nas 36 amostragens e variou entre um mínimo de 193,8 e um máximo de 625,0 UFC/m<sup>3</sup>, com 2 dos 15 locais amostrados (13%) a apresentarem uma concentração média superior ao máximo de referência previsto no Decreto-Lei 79/2006, nomeadamente 500 UFC/m<sup>3</sup>. Em termos de amostragens individuais (ver Tabela 2 nos Apêndices), em 8 das 36 amostragens (22%) registaram-se concentrações acima do mencionado máximo de referência.

Comparando as concentrações de bactérias no ar registadas no HJA com outro hospital português, que registou concentrações entre 1 e 31 UFC/m<sup>3</sup> (Santos, 2008), o HJA apresentou concentrações muito mais elevadas, tendo outros hospitais estrangeiros apresentado concentrações inferiores às do HJA, nomeadamente com médias de 72,3 UFC/m<sup>3</sup> num hospital em Múrcia na Espanha, onde foram amostrados bloco operatórios, maternidades e quartos (Ortiz *et al*, 2009), de 187 UFC/m<sup>3</sup> no Brasil (Quadros *et al*, 2009) e 271,3 UFC/m<sup>3</sup> na Coreia do Sul (Kim *et al*, 2010) e também superiores às do HJA, nomeadamente de cerca de 550 UFC/m<sup>3</sup> num quarto com 4 camas nos cuidados intensivos dum hospital em Taiwan monitorizado durante 1 ano (Tang *et al*, 2009). Pode-se concluir portanto que relativamente à maioria dos outros hospitais considerados nesta comparação, o HJA tem pior qualidade do ar interior no que concerne à quantidade de bactérias no ar, tendo inclusive sido detectados alguns casos de excesso em relação ao máximo de referência previsto no Decreto-Lei 79/2006. No entanto, os valores registados no HJA estão dentro dos valores mínimo de 88 UFC/m<sup>3</sup> e máximo de 4297 UFC/m<sup>3</sup> detectados em apartamentos sem contaminação por bolores na Polónia e abaixo do valor limite residencial de 5000 UFC/m<sup>3</sup> proposto por Górný e Dutkiewicz (2002) como concentração máxima admissível em habitações.

Globalmente, os corredores do HJA apresentam concentrações mais elevadas de bactérias no ar, seguidos por ordem decrescente pelas salas, zona alimentar, lavandaria e, por fim, pelos quartos. Este facto evidencia que as áreas ocupadas, mesmo que apenas momentaneamente, por um grande número e variedade de pessoas, como os corredores e salas ocupados por visitantes, funcionários e pacientes, apresentam uma maior poluição do ar por bactérias do que as áreas com menor ocupação humana, como a lavandaria e quartos. O mesmo tipo de

situação acontece noutros hospitais, tendo sido registadas as maiores concentrações bacterianas nos lobbies de entrada comparativamente às salas de recobro de cirurgia, unidades de cuidados intensivos e laboratórios (Kim *et al*, 2010), no corredor de acesso ao bloco operatório comparativamente ao bloco operatório (Santos, 2008) e em quartos de hospital em comparação com blocos operatórios e maternidades (Ortiz *et al*, 2009). Depreende-se assim que na generalidade dos casos, as áreas sujeitas a maior e mais diversa ocupação humana têm maior carga bacteriana aerossolizada do que as áreas sujeitas a menor ocupação humana, tendo esta regra aplicação no HJA.

Comparando as concentrações bacterianas no ar por tipo de local entre o HJA e outros hospitais, os corredores do HJA apresentaram 465,3 UFC/m<sup>3</sup> comparativamente à média de 372 UFC/m<sup>3</sup> registada nos lobbies de entrada de 5 hospitais coreanos (Kim *et al*, 2010) e máximo de 31 UFC/m<sup>3</sup> detectados no corredor de acesso ao bloco operatório noutra hospital português (Santos, 2008). Os quartos do HJA apresentaram 384 UFC/m<sup>3</sup> comparativamente aos 124,4 UFC/m<sup>3</sup> registados nos quartos de um hospital espanhol (Ortiz *et al*, 2009). Verifica-se assim que tanto sob uma perspectiva global do hospital, como sob uma perspectiva mais específica por tipos de local equiparáveis, o HJA continua a apresentar uma maior concentração bacteriana no ar.

Individualmente, os locais que apresentaram as concentrações bacterianas no ar mais elevadas foram a sala de estar modificada para quarto do piso 2 e o corredor do piso 3, ambos com concentração média acima do máximo de referência de 500 UFC/m<sup>3</sup>, seguidos pelo corredor do piso 2, sala de convívio (sem nome próprio) e quarto Papoila. As menores concentrações bacterianas no ar foram registadas no quarto Toutinegra, seguidas por ordem crescente pelos quartos Til e Castanholas.

A sala de estar modificada para quarto do piso 2 apresentou uma concentração média de bactérias no ar acima do máximo de referência e os dados indicam que deverão existir fontes internas de contaminação do ar com bactérias, uma vez que os restantes quartos do HJA e locais adjacentes no mesmo piso, bem como o ar exterior, apresentam concentrações inferiores. Também têm de ser considerados as particularidades desta divisão como o facto de:

- a) ser um quarto com 5 camas, sendo o valor máximo por quarto registado neste trabalho;
- b) as janelas estarem fechadas antes das amostragens, não existindo portanto ventilação prévia;
- c) ter sido registada uma presença média de 7,5 pessoas no quarto durante a amostragem, a qual foi o valor máximo por quarto registado neste trabalho;
- d) numa das amostragens estar a decorrer a limpeza das camas e grande movimentação de pessoas enquanto na outra amostragem a limpeza diária ainda estava por fazer. Cada uma destas particularidades

registadas *per si* expectavelmente degradará a QAI e combinadas resultaram no excesso de bactérias no ar registado nesta divisão.

Assim, como medida correctiva deveria haver uma maior ventilação do quarto, e no caso desta medida ser ainda insuficiente, deverá haver uma menor ocupação do quarto com pacientes. Salienta-se que o grande pico de concentração de bactérias no ar neste quarto foi detectado na amostra efectuada durante a limpeza do quarto, nomeadamente na mudança de lençóis das camas, evidenciando que este acto faz aerossolizar as partículas, incluindo bactérias, que estejam depositadas nas superfícies e assim contribuindo para uma menor QAI durante um período de tempo posterior ao acto. Efectivamente, estudos similares demonstraram que os níveis bacterianos duplicam nos quartos dos pacientes na altura em que são feitas as camas (Pastuszka, 2005), e que este acto constitui uma das actividades onde se libertam grandes quantidades de microorganismos para o ar (Beggs, 2004). Assim, na medida possível, seria aconselhável evitar a presença de pacientes no interior do quarto aquando da limpeza das camas para evitar a sua exposição a elevadas concentrações bacterianas que poderão facilmente infectar pessoas com sistemas imunitários debilitados. Relativamente à protecção dos funcionários que efectuam a limpeza, o facto de não terem o sistema imunitário debilitado protege-os mais eficazmente de infecções, mas poderá ser aconselhado o uso de máscaras faciais para filtragem do ar inspirado e uso de bata protectora do vestuário pessoal.

O corredor do piso 3 também apresentou uma concentração média de bactérias no ar acima do máximo de referência e os dados indicam novamente que deverão existir fontes internas de contaminação do ar com bactérias, uma vez que os locais adjacentes no mesmo piso apresentam concentrações inferiores, bem como o ar exterior. Este local também apresenta particularidades que deverão estar relacionadas com a má QAI, nomeadamente: a) em 2 das 4 amostragens realizadas, este corredor apresentou carros de transporte de material de limpeza, porque a mesma estava a ser realizada nos quartos desse piso; b) foram detectadas muitas pessoas nos corredores (não quantificadas), incluindo pacientes acamados. Em termos de influência na QAI, mas pela positiva, as janelas estiveram abertas antes e durante as amostragens e a movimentação de pessoas foi mediana. Face aos resultados obtidos e características do local e amostragens, presume-se que os carros utilizados na limpeza dos quartos serão um foco de contaminação do ar, o que é compreensível pois nele são transportados os resíduos dos quartos e roupas de cama sujas, devendo portanto os mesmos permanecer o mínimo tempo indispensável nos corredores e/ou quartos e ser removidos das zonas públicas quando não estiverem em utilização. Além deste foco de contaminação, presume-se que o facto de haver pacientes acamados no corredor contribua negativamente para a QAI pelo que este tipo de situação deverá ser reduzido, ou mesmo eliminado, na

medida possível. A QAI do corredor do piso 3 foi inferior à dos corredores dos restantes pisos do hospital, provavelmente porque os outros não apresentaram este tipo de situação.

As 8 amostras individuais que registaram uma concentração de bactérias no ar acima do máximo de referência foram detectadas no corredor do piso 1 (1 amostra), corredor do piso 2 (1 amostra), corredor do piso 3 (3 amostras), sala de estar modificada para quarto (1 amostra), sala de fisioterapia (1 amostra) e na cozinha (1 amostra), resultando em 6 locais distintos com excesso de bactérias no ar numa ou mais amostragens, representando 40% dos locais amostrados com excesso pontual de bactérias no ar. Como referido anteriormente, destes 6 locais, apenas o corredor do piso 3 e sala de estar modificada para quarto registaram uma concentração média de bactérias por local acima do máximo de referência e as razões para tal já foram anteriormente discutidas. Os restantes casos de excesso de bactérias no ar poderão ser explicados da seguinte forma:

A sala de fisioterapia durante a amostragem que revelou concentrações excessivas de bactérias apresentava as janelas fechadas e 14 pessoas no seu interior em actividade física, o que provavelmente originou este excesso, tanto que a outra amostra deste local foi feita com a sala sem utilizadores e previamente fechada, tendo sido detectada uma concentração bacteriana inferior a metade da concentração no caso com excesso.

A cozinha apresentou uma concentração excessiva de bactérias numa amostra realizada num dia de bruma, com actividade moderada na cozinha, com 5 pessoas no local, janelas abertas e chão molhado após lavagem. Com base nos dados disponíveis não é possível determinar a origem deste excesso, podendo eventualmente ser relacionado com transferência de resíduos, previamente à lavagem do chão, fazendo com que tenha ocorrido a aerossolização de bactérias.

Os corredores dos pisos 1 e 2 registaram excesso de concentração de bactérias no ar nos casos das amostragens associadas a um maior grau de movimentação de pessoas no local, indicando que este deverá ser o factor que originou este excesso. De facto, o grau de movimentação de pessoas nestas amostras específicas foi semelhante ao grau registado nas amostras do corredor do piso 3 que também apresentaram excesso, nomeadamente apresentando grau 3 e 4 na escala de 0 a 5, enquanto as amostras com grau 2 nunca apresentaram excesso de concentração bacteriana.

### 5.2.2 – FUNGOS

Analisando a flora fúngica aerossolizada no interior do HJA de forma quantitativa (ver Tabela 12 e Tabela 13), verificou-se que a sua concentração teve uma média de 243,8 UFC/m<sup>3</sup> nas 36 amostragens e variou entre um mínimo de 100,0 e um máximo de 575,0 UFC/m<sup>3</sup>, com apenas

1 dos 15 locais amostrados (7%) a apresentar uma concentração média superior ao máximo de referência previsto no Decreto-Lei 79/2006, nomeadamente 500 UFC/m<sup>3</sup>. Em termos de amostragens individuais (ver Tabela 2 nos Apêndices), em 4 das 36 amostragens (11%) registaram-se concentrações acima do mencionado máximo de referência.

Comparando as concentrações de fungos no ar registadas no HJA com outro hospital português, que registou concentrações entre 0 e 7 UFC/m<sup>3</sup> (Santos, 2008), o HJA apresentou concentrações muito mais elevadas, tendo outros hospitais estrangeiros apresentado concentrações médias inferiores às do HJA, nomeadamente de 5,9 UFC/m<sup>3</sup> em Espanha (Ortiz *et al*, 2009) e 110,8 UFC/m<sup>3</sup> na Coreia do Sul (Kim *et al*, 2010), e concentrações similares às do HJA no Brasil com 231 UFC/m<sup>3</sup> (Quadros *et al*, 2009) e Taiwan com cerca de 300 UFC/m<sup>3</sup> (Tang *et al*, 2009). Pode-se concluir portanto que relativamente a outros hospitais considerados nesta comparação, o HJA tem pior ou semelhante qualidade do ar interior no que concerne à quantidade de fungos no ar, tendo inclusive sido detectados alguns casos de excesso em relação ao máximo de referência previsto no Decreto-Lei 79/2006. No entanto, os valores registados no HJA estão dentro dos valores mínimo de 0 UFC/m<sup>3</sup> e máximo de 1997 UFC/m<sup>3</sup> detectados em apartamentos sem contaminação por bolores na Polónia e abaixo do valor limite residencial de 5000 UFC/m<sup>3</sup> proposto por Górný e Dutkiewicz (2002) como concentração máxima admissível em habitações, tendo nesse trabalho sido detectada uma concentração máxima de 16968 UFC/m<sup>3</sup> em apartamentos com contaminação por bolores. Também em 48 escolas nos Estados Unidos da América foram detectados fungos no ar interior com uma concentração de cerca de 260 UFC/m<sup>3</sup> (Cooley *et al*, 1998), a qual é muito próxima da detectada no HJA.

Globalmente, a zona alimentar apresenta as concentrações mais elevadas de fungos no ar, seguidos por ordem decrescente pelos corredores, lavandaria, quartos, e, por fim, pelas salas. Depreende-se que as áreas onde a água é manipulada e existe maior e mais diversa ocupação humana pode haver maior carga fúngica aerossolizada do que nas áreas sujeitas a menor ocupação humana e utilização de água, não sendo esta regra muito clara pois as salas tal como os corredores têm uma grande quantidade e diversidade de utilizadores mas têm concentrações fúngicas distintas. Noutros hospitais, foram registadas as maiores concentrações fúngicas nos lobbies de entrada comparativamente às salas de recobro de cirurgia, unidades de cuidados intensivos e laboratórios (Kim *et al*, 2010) e em quartos de hospital em comparação com blocos operatórios e maternidades (Ortiz *et al*, 2009). Não é possível encontrar uma relação causa - efeito clara entre a concentração de fungos no ar e as características gerais dos locais e que englobe o que ocorre no HJA e outros hospitais, sendo apenas aplicável a relação de uma menor poluição por fungos nas zonas de maior risco de

contaminação de pacientes, como nas salas de cirurgia por exemplo, por existirem seguramente maiores cuidados de esterilização nesses locais.

Comparando as concentrações fúngicas no ar por tipo de local entre o HJA e outros hospitais, os corredores do HJA apresentaram 256,9 UFC/m<sup>3</sup> comparativamente à média de 156 UFC/m<sup>3</sup> registada nos lobbies de entrada de 5 hospitais coreanos (Kim *et al*, 2010) e máximo de 2 UFC/m<sup>3</sup> detectado no corredor de acesso ao bloco operatório noutra hospital português (Santos, 2008). Os quartos do HJA apresentaram 203,1 UFC/m<sup>3</sup> comparativamente aos 10,6 UFC/m<sup>3</sup> registados nos quartos de um hospital espanhol (Ortiz *et al*, 2009). Verifica-se assim que tanto sob uma perspectiva global do hospital, como sob uma perspectiva específica por tipos de local equiparáveis, o HJA continua a apresentar uma maior concentração fúngica no ar.

Individualmente, os locais que apresentaram as concentrações fúngicas no ar mais elevadas foram a cozinha, com concentração média acima do máximo de referência de 500 UFC/m<sup>3</sup>, seguidos pelo corredor do piso 1, bar do pessoal e quarto Castanholas. As menores concentrações fúngicas no ar foram registadas no quarto Pardal da Terra, seguidas por ordem crescente pelos quarto Papoila e sala de convívio do piso 0 (sem nome próprio).

A cozinha apresentou uma concentração média de fungos no ar acima do máximo de referência, mas desta vez os dados indicam que a fonte de contaminação do ar com fungos está localizada no exterior, uma vez que o ar exterior apresenta uma concentração fúngica superior. No dia em que se realizaram as amostragens na cozinha estava a decorrer um evento de bruma, também denominado de “tempo de leste”, no qual a concentração de fungos no ar exterior foi superior à registada no interior da cozinha (ver discussão detalhada sobre o efeito da bruma no tópico 5.4) e o facto de existirem várias portas e janelas nessa divisão viradas para o exterior e que frequentemente são abertas indica que terá havido mistura de ar entre ambientes, levando assim à entrada de fungos na cozinha. Assim, recomenda-se que em dias de bruma sejam abertas as portas e janelas apenas durante o mínimo de tempo indispensável, sendo recomendável o uso de ventilação mecânica com filtragem do ar durante esse período para prevenir a entrada de fungos do ar exterior e manter os parâmetros físico-químicos do ar interior dentro dos valores aceitáveis. Possivelmente a concentração de fungos no ar na cozinha seria aceitável se não estivesse a decorrer o fenómeno de bruma, uma vez que a sua concentração no interior é inferior ao exterior, indicando que não deverão existir fontes internas de contaminação a contribuir para a elevada concentração de fungos, e assim presume-se que em condições normais do ar exterior não deverão ser necessárias medidas correctivas.

As 4 amostras individuais que registaram uma concentração de fungos no ar acima do máximo de referência foram detectadas no corredor do piso 1 (1 amostra), bar do pessoal (1 amostra), quarto Castanholas (1 amostra) e na cozinha (1 amostra), resultando em 4 locais distintos com excesso de fungos no ar numa ou mais amostragens, representando 27% dos locais amostrados com excesso pontual de fungos no ar. Para além da cozinha, os restantes casos de excesso de fungos no ar também poderão ser explicados pela ocorrência do evento de bruma, uma vez que todos estes excessos foram registados no mesmo dia durante um evento de bruma. A bruma implica uma maior concentração de fungos no ar exterior, comprovada pela amostragem realizada no exterior nesse dia, contaminando gradualmente o interior do edifício, tanto que todos os locais interiores amostrados nesse dia registaram excesso de fungos no ar, sendo este registado apenas durante a tarde, após contaminação a partir do exterior e de forma gradual (discutida detalhadamente no tópico 5.4).

### 5.2.3 – PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Analisando os parâmetros físico-químicos do ar interior do HJA (ver Tabela 14 a Tabela 16), verifica-se que todos os valores medidos, nomeadamente temperatura do ar, humidade relativa do ar e concentração de CO<sub>2</sub>, estão dentro dos limites recomendados pelos Decretos-Lei nº 78, 79 e 80/2006 e Nota técnica NT-SCE-02 (ADENE, 2009), pelo que não deverá haver qualquer tipo de riscos relacionados com estes parâmetros que afectem os utilizadores dos espaços, não sendo apontadas nenhuma medida correctiva neste ponto. O gás NO<sub>2</sub> foi detectado apenas por uma vez na lavandaria e num valor muito baixo (0,1ppm), não havendo situações de risco para a saúde humana e não sendo necessárias medidas preventivas relativamente a este gás.

Noutros hospitais foram registados valores dos parâmetros físico-químicos do ar interior relativamente próximos aos detectados no HJA, nomeadamente em Portugal com cerca de 20 a 24°C de temperatura e cerca de 25 a 55% de humidade relativa (Santos, 2008) e Brasil com 23,8 a 28,4°C de temperatura, 47,6 a 64,7% de humidade relativa (Quadros *et al*, 2009), sendo apenas a concentração de CO<sub>2</sub> inferior no HJA (200 a 360ppm) comparativamente a um hospital brasileiro com 321 a 618ppm de CO<sub>2</sub> (Quadros *et al*, 2009) e um hospital chinês no qual 90% das medições de CO<sub>2</sub> superaram os 1000ppm (Tang *et al*, 2009). Esta comparação indica que o HJA tem ar interior com parâmetros físico-químicos similares a outros hospitais, sendo a concentração de CO<sub>2</sub> mais baixa e portanto melhor para os ocupantes.

#### 5.2.4 – GLOBALIDADE DA QAI

Analisando globalmente a QAI do HJA (ver Tabela 16), verifica-se que apenas a concentração de microorganismos no ar excedeu os limites de referência. Os excessos pontuais (por amostra) foram detectados em 12 de 72 amostragens (16,7%) e foram detectados em 8 dos 15 locais analisados (53,3%). Em termos de concentração média, apenas 3 dos 15 locais (20%) apresentam excesso de microorganismos no ar, sendo eles o corredor do piso 3 e a sala de estar modificada para quarto com excesso de bactérias no ar, e a cozinha com excesso de fungos no ar. Todos os excessos de fungos no ar interior foram relacionados com eventos de bruma que contamina o ar interior do HJA com fungos, enquanto os excessos de bactérias no ar interior foram relacionados com a forte presença e actividade humana nesses locais em conjugação com factores adjuvantes para a má QAI como fraca ventilação e a presença ou manipulação de materiais contaminados com bactérias, como resíduos e roupa suja.

A maior concentração de bactérias no ar comparativamente à de fungos que foi registada no HJA também já tinha sido detectada noutros hospitais (Kim *et al*, 2010; Li e Hou, 2003; Tang *et al*, 2009) e deverá estar associada à forte actividade humana libertar bactérias para o ar, tal como reportado por Li e Hou (2003) e Jaffal *et al*. (1997).

#### 5.3 – DISPERSÃO DA FLORA BACTERIANA NO AR INTERIOR DO HJA

É possível distinguir uma maior similaridade da flora bacteriana aerossolizada entre os locais com o mesmo tipo de utilização, e consequentemente com o mesmo padrão de ocupação humana, do que entre locais próximos espacialmente pela análise das Figuras 6 e 7. Verifica-se a existência de 2 grandes grupos baseados no índice de similaridade com valor superior a 25%, um que engloba os corredores dos pisos 0, 1, 2 e ainda o quarto Toutinegra, e outro grande grupo que engloba quase todos os quartos e ambas as salas analisadas. Fora destes 2 grupos ficam locais muito distintos destes grupos e também entre si, como a cozinha, bar do pessoal, quarto castanholas, lavandaria e por fim, o mais diferente deles todos, o corredor do piso 3.

Depreende-se assim que se a maioria dos locais com o mesmo tipo de utilização, como os corredores e os quartos, mesmo sendo distantes espacialmente têm uma flora bacteriana aerossolizada similar entre si, esta deverá ser influenciada pelo tipo de utilização do local e padrão de ocupação humana e não pela localização espacial no edifício. Relativamente aos locais que não pertencem aos 2 grandes grupos mencionados anteriormente, é expectável que locais com padrão de ocupação humana e tipo de uso tão distinto entre si como a cozinha, bar do pessoal e lavandaria tenham uma baixa similaridade entre si, sendo mais difícil de entender a baixa similaridade do quarto Castanholas e corredor do piso 3 relativamente às restantes

divisões com o mesmo tipo de uso. No entanto, a baixa similaridade do quarto Castanholas relativamente aos restantes quartos poderá ser explicada pelo muito baixo número de amostras processadas nesse quarto, com apenas 5 amostras, enquanto os restantes quartos tiveram 14 a 19 amostras processadas. O facto do corredor do piso 3 ser muito dissimilar dos restantes corredores, e até mesmo de todos os restantes locais, poderá estar relacionado com o facto de este ser um dos locais com maior concentração bacteriana no ar interior no HJA, pelo que a existência de maior número de bactérias no ar potencia uma maior diversidade das mesmas e como a metodologia de selecção de amostras para identificação previa a escolha da maior diversidade possível, este local mostra essa diversidade amplificada artificialmente.

A análise referente ao **piso 0 do HJA** (figuras 8 e 9) permite comprovar que as salas de fisioterapia e de convívio têm uma flora bacteriana aerosolizada muito semelhante, sendo diferente da presente no corredor desse piso, enquanto a presente na lavandaria é distinta de todas as restantes. O ar exterior destaca-se por ser muito diferente de qualquer das divisões internas do HJA. Isto permite inferir que a composição de bactérias no ar deverá ser influenciada pela utilização dada aos locais e ao padrão de presença humana nos mesmos, uma vez que: 1) ambas as salas destinam-se ao uso colectivo de vários pacientes em simultâneo durante períodos de tempo relativamente longos, sendo libertadas para o ar bactérias maioritariamente provenientes dos pacientes utentes da sala e numa concentração comparativamente elevada; 2) no corredor existe uma utilização humana variada, com todo o tipo de pessoas e materiais a circular, como pacientes e funcionários, implicando uma maior diversidade bacteriana, mas de inferior duração temporal por pessoa, implicando uma menor concentração bacteriana se o corredor for pouco utilizado ou maior concentração se o corredor for muito utilizado; 3) na lavandaria são manipuladas roupas provenientes de todo o edifício, potenciando a existência de bactérias provenientes de todos os locais do HJA. Como um todo, o ar interior do HJA é distinto do ar exterior do edifício, o que resulta do efeito do edifício ser um espaço confinado com presença humana, potenciando a acumulação de bactérias no ar, enquanto no exterior existe sempre a possibilidade de dispersão bacteriana num enorme volume de ar. Concluindo, dado que o perfil de ocupação humana e tipo de uso dado a cada local é distinto, é facilmente compreensível e até expectável que os resultados obtidos nesta análise mostrem o padrão de similaridade obtido.

A análise referente ao **piso 1 do HJA** (figuras 10 e 11) permite comprovar que a cozinha, corredor e bar do pessoal têm uma flora bacteriana aerosolizada relativamente semelhante, sendo a do quarto Castanholas muito diferente, enquanto o ar exterior destaca-se por ser muito diferente de qualquer das divisões internas do HJA. Isto permite inferir novamente que a composição de bactérias no ar deverá ser influenciada pela utilização dada aos locais e ao

padrão de presença humana nos mesmos, uma vez que: 1) o quarto apresente uma ocupação de longo termo com poucos pacientes, sendo a maioria da flora bacteriana aerosolizada provavelmente proveniente dos pacientes, mas com uma comparativamente baixa diversidade; 2) o bar do pessoal é utilizado por um grande número de funcionários e neste local são manipulados alimentos e líquidos, implicando uma maior diversidade bacteriana; 3) na cozinha são relativamente poucas as pessoas com acesso ao local mas por outro lado a manipulação de alimentos crus e líquidos frequentemente permitirá a presença de uma maior diversidade bacteriana; 4) no corredor ocorrerão os factos já referidos anteriormente relativamente ao corredor do piso 0. Conclui-se assim que o padrão relativamente estático de ocupação e utilização do quarto comparativamente aos padrões dinâmicos que ocorrem nos restantes locais contribuíram para a flora bacteriana do quarto ser distinta da existente nos restantes locais, e para uma relativa semelhança entre flora presente na cozinha, bar do pessoal e corredor.

A análise referente ao **piso 2 do HJA** (figuras 12 e 13) permite comprovar que os quartos têm uma flora bacteriana aerosolizada semelhante, sendo a do corredor um pouco diferente, enquanto o ar exterior destaca-se por ser muito diferente das divisões internas do HJA. Isto permite inferir novamente que a composição de bactérias no ar deverá ser influenciada pela utilização dada aos locais e ao padrão de presença humana nos mesmos. O facto de ocorrer maior partilha de OTU entre locais do mesmo tipo e afastados espacialmente (quartos) do que entre locais mais próximos mas de tipo diferente (entre quartos e corredor central) permite inferir a inexistência de um padrão de dispersão de bactérias a partir de um foco de contaminação localizado, existindo sim, um padrão de composição bacteriana no ar associada ao tipo uso e padrão ocupacional humano do local.

A análise referente ao **piso 3 do HJA** (figuras 14 e 15) permite comprovar que os quartos têm uma flora bacteriana aerosolizada semelhante, sendo a do corredor um pouco diferente, enquanto o ar exterior é muito diferente das divisões internas do HJA. Isto permite inferir mais uma vez que a composição de bactérias no ar deverá ser influenciada pela utilização dada aos locais e ao padrão de presença humana nos mesmos pelos motivos expostos anteriormente.

Analisando a **globalidade dos pisos**, a maior similaridade na composição bacteriana aerosolizada, e conseqüentemente maior partilha de OTU, entre divisões do mesmo tipo do que entre divisões próximas espacialmente permite concluir que o tipo de uso dado a cada local, e conseqüentemente o perfil de ocupação humana, deverá ser o factor determinante da composição da flora bacteriana presente no ar. Não foi detectado nenhum foco localizado de contaminação bacteriana do ar para além da presença humana, nem um padrão de dispersão de bactérias no edifício do HJA. O facto dos índices de similaridade entre locais serem

relativamente baixos, sendo registado um máximo próximo de 45%, indica que deverá ocorrer uma muito baixa contaminação cruzada dos locais pois são muito poucas as OTU, as quais representam espécies ou mesmo estirpes iguais, partilhadas entre locais. Também, o facto da composição bacteriana aerossolizada no ar interior ser sempre muito diferente do ar exterior indica que as fontes de bactérias presentes em cada tipo de ar são distintas, sendo que pelo menos a maioria das fontes de bactérias do ar interior deverão estar localizadas no interior do edifício, e indicando também que deverá existir uma baixa taxa de renovação do ar interior, pois a reduzida mistura dos dois tipos de ar impede uma maior similaridade na composição bacteriana presente no ar.

O facto de esta análise ter por base relativamente poucos dados das OTU por local, os quais variaram entre 5 a 19 OTU determinadas por local e um máximo de 3 OTU partilhadas entre locais, é uma limitação que implica que as taxas de similaridade reais entre locais possam variar muito em relação aos valores obtidos. Não obstante este facto, será expectável que o padrão de similaridade entre locais seja semelhante ao obtido com os actuais valores, pois os padrões detectados não são anormais. Também o facto de terem sido analisados relativamente poucos locais por piso, 3 a 4 locais, tornou difícil a detecção de um padrão de dispersão de bactérias a partir de um potencial foco de contaminação localizado e diferente do esperado, como a presença humana e tipo de uso do local, mas é muito provável a inexistência de um foco deste tipo uma vez que as maiores similaridades ocorreram sempre entre locais do mesmo tipo separados espacialmente, ao contrário da necessária maior similaridade com base na localização espacial no edifício. Outros dados que corroboram a dedução da inexistência dum foco de contaminação localizado são o facto da menor e da segunda maior concentração bacteriana média do ar por local registada no interior do HJA ter ocorrido em 2 locais adjacentes, respectivamente o corredor do piso 3 e o quarto Toutinegra (ver Tabela 11 e Figura 14), indicando assim que locais espacialmente próximos possam diferir grandemente em termos de flora bacteriana aerossolizada.

#### 5.4 – COMPARAÇÃO ENTRE O AR INTERIOR E EXTERIOR DO HJA

Relativamente às bactérias identificadas por métodos moleculares no ar exterior e interior do HJA (ver Tabela 17), foram detectados um total de 20 taxa distintos, dos quais 13 são exclusivos do interior (65%), 4 são partilhados (20%) e 3 são exclusivos do exterior (15%). Nos 20% dos taxa presentes em ambos os ambientes incluem-se 3 dos taxa mais abundantes no interior, designadamente *Staphylococcus cohnii urealyticus*, *S. capitis* ou *S. caprae* e *Micrococcus luteus*.

A discussão dos taxa bacterianos detectados no ambiente interior já foi abordada no tópico 5.1. Entre os taxa detectados no ambiente exterior, *S. cohnii urealyticus*, *S. capitis* ou *S. caprae* e *Micrococcus luteus*, que são partilhados com o interior, são provavelmente de origem humana, bem como *S. hominis* que foi detectado exclusivamente no exterior, enquanto os restantes taxa detectados no exterior são provavelmente de origem ambiental, nomeadamente *Bacillus simplex*, *Gordonia alkanivorans* e *Planococcus sp.* (Tabelas 10 e 11 nos Apêndices).

Depreende-se portanto que uma proporção importante (4 em 7, ou 57%) das bactérias identificadas no ar exterior tem origem na flora bacteriana associada aos seres humanos, sendo a restante composta por bactérias existentes comumente no ambiente exterior.

É importante salientar que o esforço de amostragem em ambos os locais foi muito desequilibrado, sendo 10 vezes superior no interior comparativamente ao exterior, e que apenas 24 das 96 OTU detectadas na globalidade das amostras foram identificadas por sequenciação, pelo que os números absolutos de taxa presentes em cada local deverão ser muito superiores aos apresentados e a proporção de taxa exclusivos e de cada tipo de origem poderá diferir grandemente. Esta limitação poderia ter sido ultrapassada aumentando o número de amostras do exterior sequenciadas, mas este trabalho foi focado essencialmente na flora bacteriana interior.

Das 96 OTU distintas detectadas na globalidade das amostras, apenas 4 (4%) eram partilhadas entre o ar exterior e o interior do HJA, mas considerando também o número de amostras pertencentes às OTU vemos que 29% (56 de 192 colónias) dos tipos de bactérias existiam em ambos os ambientes (Tabela 18). Cinquenta e uma das 182 colónias (28%) de bactérias presentes no ar interior do HJA tinham representantes do mesmo taxon no ar exterior. Infere-se portanto que existe uma baixa partilha de taxa bacterianos entre o ar interior e exterior e que a partilha ocorre maioritariamente nos taxa mais prevalentes.

Verifica-se um desequilíbrio entre a proporção de bactérias do género *Staphylococcus* no ar entre o ambiente exterior e interior do HJA (Tabela 19). No exterior, 50% das bactérias são do género *Staphylococcus* enquanto no interior essa proporção aumenta para 68%. Este mesmo efeito é também notado pelo aumento de 69% para 88% da proporção de bactérias Gram positivas no ar do ambiente exterior para o interior (Tabela 20).

Globalmente, a comparação **qualitativa** de **bactérias** presentes no ar entre o ambiente exterior e interior do HJA permite concluir que os ambientes diferem muito na flora bacteriana aerossolizada, pois a partilha de espécies bacterianas atinge valores de 20% quando considerados os dados com identificação por sequenciação e de apenas 4% quando considerados os dados das OTU e existe uma alteração forte da proporção de bactérias Gram

positivas e de *Staphylococcus* no ar entre os ambientes. A alteração da flora bacteriana do exterior para o interior do HJA deverá estar relacionada com a ocupação humana do espaço interior, pois a maioria das espécies detectadas no interior têm origem associada ao ser humano. Verificou-se também que a partilha de espécies bacterianas entre os ambientes incide sobretudo nas espécies mais comuns detectadas no ar interior, o que é facilmente compreensível, pois ao existirem em concentrações superiores terão maior probabilidade de serem detectadas no ar exterior devido a existir sempre algum grau de mistura de ar entre os dois ambientes. A mistura de ar entre ambientes deverá ser reduzida, pelo facto da flora bacteriana ser tão diferente entre ambientes, havendo contudo alguma interligação que é corroborada com a existência de algumas espécies partilhadas e compreensível pelo facto do HJA recorrer a ventilação natural para arejar o edifício, havendo assim mistura não filtrada de ar entre os ambientes.

Comparando **quantitativamente** a **flora bacteriana** aerosolizada, no interior do HJA foi registada uma concentração de bactérias no ar que equivale a 3,5 vezes a concentração do exterior, sendo portanto significativamente diferente a concentração bacteriana entre ambientes (ver Tabela 21). Esta grande discrepância entre os ambientes permite concluir que no ambiente interior estão localizadas fontes importantes de produção de bactérias para o ar, as quais como anteriormente referido deverão ser relacionadas com a ocupação humana do prédio. Os dados apontam também para uma baixa ventilação do HJA, pois se a taxa de renovação do ar fosse superior certamente a concentração bacteriana no ar interior seria menor e mais próxima da do ar exterior. O ar exterior ao apresentar uma baixa concentração de bactérias no ar, comparativamente ao ar interior, poderá ser utilizado directamente na ventilação natural do prédio e permitirá uma redução da concentração de bactérias no ar sem acréscimo de custos de funcionamento do HJA. A ventilação natural tem sido utilizada nos locais amostrados no interior do HJA mas deverá ser fomentada sempre que possível para a manutenção de uma baixa concentração de bactérias no ar, desde que esta não leve à infracção dos limites dos restantes parâmetros da QAI e os considerados de conforto para os utentes, como a temperatura, humidade e velocidade do ar. A optimização da ventilação, a ter lugar, poderia ser realizada com ar proveniente do exterior mas com o tratamento térmico e de humidade, caudal regulado e filtragem proporcionados pelas modernas unidades de ar condicionado.

Esta maior concentração de bactérias no ar interior comparativamente ao exterior já foi detectada noutros hospitais, com uma proporção máxima de bactérias no ar interior equivalente a 2,4 vezes a concentração no exterior (Kim *et al*, 2010), enquanto no HJA esta

proporção é de 3,5 vezes, indicando assim que apesar de ser comum serem encontradas mais bactérias no ar interior do que no exterior, o HJA poderá ter uma baixa ventilação.

Comparando quantitativamente a **flora fúngica** aerossolizada, no interior do HJA foi registada uma concentração de fungos no ar 40% inferior à do exterior, sendo significativamente diferente a concentração fúngica entre ambientes (ver Tabela 22). Esta diferença entre os ambientes revela novamente uma baixa mistura entre o ar exterior e o interior do HJA, mas neste caso com efeitos benéficos uma vez que a existência de maior concentração de fungos no exterior determina a uma pior qualidade do ar neste parâmetro. Este facto revela também que existem no exterior do HJA fontes de fungos relativamente próximas e que o interior não apresenta fontes significativas de fungos a registar. A proximidade da floresta Laurissilva no limite superior da cidade do Funchal, permite a emanação de esporos fúngicos característicos de áreas de floresta. Por outro lado, as gramíneas, proliferam em quantidade e variedade ao longo de todo o ano, constituindo um substrato importante para o crescimento de fungos, nomeadamente de Deuteromicetes, como é o caso do *Cladosporium* (Câmara, 2007).

Em escolas americanas já tinham sido também detectadas concentrações de fungos no ar exterior superiores às do ar interior, sendo que enquanto as concentrações no interior eram semelhantes às registadas no HJA, as do exterior eram cerca do dobro das registadas no exterior do HJA (Cooley *et al*, 1998), pelo que comprova-se a possibilidade de existência de importantes fontes de fungos no exterior.

O HJA cumpre com o valor máximo recomendável para a contaminação microbiológica do ar interior no Brasil, com uma concentração de fungos no ar inferior a 750 UFC/m<sup>3</sup> e uma proporção de fungos no ar interior/exterior inferior a 1,5 (ANVISA, 2003b).

Durante os **eventos de bruma** (Tabela 23), verificou-se que a concentração de bactérias no ar sofreu alterações negligenciáveis tanto no ar exterior como interior, enquanto relativamente aos fungos houve um acentuado acréscimo no ar interior e exterior durante os eventos de bruma, sendo registado um incremento na ordem dos 70% e 235% respectivamente. Apesar da concentração média de fungos não ser significativamente diferente entre os dias normais e com bruma no ar exterior segundo o teste estatístico realizado, o que deverá estar relacionado com o baixo número de amostras e a utilização de estatística não paramétrica, a ordem de magnitude do acréscimo (235%) indica que houve claramente uma grande variação. É também de especial relevância o facto da concentração de fungos no ar exterior durante os eventos de bruma ter ultrapassado o valor máximo de referência para o ar interior constante na legislação portuguesa em quase 24%, indicando assim que este ar terá uma baixa qualidade para ser utilizado na respiração humana. Fica assim patente que os eventos de bruma têm um efeito importante na qualidade do ar,

originando um grande acréscimo da quantidade de fungos no ar e tendo um efeito negligenciável na concentração de bactérias aerossolizadas.

O efeito dos eventos de bruma na qualidade do ar já tinha sido descrito anteriormente, sendo conhecido o transporte de muitas espécies de fungos e bactérias nas nuvens de poeira provenientes do deserto, incluindo algumas espécies patogénicas de bactérias, tendo as bactérias na sua maioria de origem ambiental, nomeadamente no solo e ecossistemas marinhos (Polymenakou *et al*, 2008; Shinn *et al*, 2003). As brumas com poeiras dos desertos africanos são conhecidas por afectarem a qualidade do ar em África, Europa, Médio Oriente e o continente americano, e a exposição às poeiras transportadoras de fungos pode afectar a saúde humana directamente através da indução alérgica de stress respiratório, bem como os fungos transportados podem colonizar os ecossistemas e também os ambientes interiores de edifícios (Shinn *et al*, 2003).

O grande acréscimo da quantidade de fungos no ar promovido pelo evento de bruma é muito forte no exterior do HJA, mas também ocorre no interior do HJA de uma forma mais atenuada. Novamente é detectável a baixa taxa de ventilação do HJA pela reduzida mistura entre o ar exterior e o interior do HJA, o que neste caso resulta num efeito benéfico. Assim, será recomendável que durante os eventos de bruma seja reduzida ao mínimo indispensável a ventilação natural do interior do HJA, ou que seja utilizado um sistema mecânico de ventilação com filtração do ar capaz de remover os fungos aerossolizados.

Outra demonstração do efeito dos eventos de bruma na QAI é o facto de ter sido detectado um gradiente de concentração de fungos no ar decrescente do exterior para o interior do HJA num dia de bruma (04-06-2009, ver Tabela 1 e 2 nos Apêndices), no qual foi amostrado o piso 1 do edifício e todas as divisões interiores amostradas durante a tarde apresentaram uma concentração fúngica no ar superior ao máximo de referência, sendo simultaneamente as únicas divisões do HJA a registarem concentração excessiva de fungos no ar independentemente do dia de amostragem. Este dia apresentou a maior concentração média de fungos no interior do edifício por dia de amostragem ( $425 \text{ UFC/m}^3$ ) e nele foram detectados fungos a  $612 \text{ UFC/m}^3$  no ar exterior,  $501 \text{ UFC/m}^3$  na cozinha e a  $434 \text{ UFC/m}^3$  no corredor e  $412 \text{ UFC/m}^3$  no bar do pessoal. Constatou-se assim o mencionado gradiente de maior concentração de fungos do exterior para o interior do edifício, pois as divisões mais internas como o bar do pessoal e corredor apresentaram a menor concentração de fungos no ar nesse dia enquanto a divisão situada no interface com o exterior, a cozinha, apresentou uma concentração intermédia entre o ar exterior e ar dos restantes locais interiores. O outro local amostrado naquele dia, o quarto Castanholas, apresentou a menor concentração média de fungos no ar por local interior nesse dia, sendo este facto provavelmente devido às janelas

terem permanecido fechadas durante a maioria do dia, pois estavam fechadas antes e durante ambas as amostragens efectuadas no local, apesar de mesmo assim ter sido registado um grande aumento da concentração fúngica à tarde. Assim, verifica-se que os eventos de bruma são suficientes para degradar a QAI num edifício, mesmo com uma ventilação natural relativamente reduzida, como o caso do Quarto Castanholas, e desde que exista alguma interface frequente com o exterior, sendo este o piso de entrada principal dos visitantes e sendo registada na cozinha muita movimentação com o exterior, para a entrada de alimentos e saída de resíduos, torna-se evidente a frequente mistura de ar entre interior e exterior.

#### 5.5 – INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E CARACTERÍSTICAS DOS LOCAIS NA CONCENTRAÇÃO DE BIOAEROSSÓIS

Analisando a relação entre os **parâmetros físico-químicos** e a concentração de bioaerossóis no ar interior do HJA (ver tópico 4.5.1), verificou-se que somente a concentração de bactérias tem correlação significativa e positiva com a concentração de CO<sub>2</sub>. Tendo em conta que na maioria dos locais amostrados a principal fonte deste gás é a respiração humana, e sendo conhecida a correlação entre a concentração de CO<sub>2</sub> e o grau de ocupação do ambiente hospitalar (Quadros *et al*, 2009), podemos inferir que a presença humana nos locais corresponderá a uma fonte importante de bactérias que serão aerosolizadas, pois quanto maior a concentração de CO<sub>2</sub>, resultante dum maior número de pessoas no local ou a uma permanência mais prolongada e aliada a uma eventual baixa renovação do ar, maior será a concentração de bactérias no ar.

Analisando a relação entre as **características do local** amostrado e a concentração de bioaerossóis no ar interior do HJA (ver tópico 4.5.2), verificou-se a existência de correlação significativa e positiva entre a concentração de bactérias no ar e o grau de movimentação de pessoas no local e número de pessoas no local, o que evidencia o efeito importante que a presença humana tem sobre a presença de bactérias no ar interior. Este mesmo tipo de relação entre a actividade humana no local e a concentração de bactérias no ar em ambiente hospitalar já tinha sido detectado anteriormente (Jaffal *et al*, 1997; Li e Hou,2003).

Se quanto maior for o número de pessoas ou a sua movimentação no local, maior é a concentração de bactérias no ar, tal como demonstrado pelas correlações anteriores, um tipo de medida eficaz para a redução de concentração bacteriana aerosolizada poderá ser a redução do número de pessoas, ou sua movimentação, em locais críticos cuja concentração seja demasiado elevada.

Foi detectada também uma tendência de redução da concentração bacteriana no ar quando ocorria ventilação prévia do local amostrado aliada a um acréscimo da concentração fúngica,

apesar das diferenças entre as concentrações não serem significativas em ambos os casos. Estes dados revelam que a ventilação do local permite uma maior aproximação das concentrações microbiológicas no ar aos valores obtidos no exterior, onde como referido no tópico 5.4, existe ar com menor concentração bacteriana mas com maior concentração fúngica. O facto do efeito medido de ventilação não demonstrar diferenças significativas entre locais com e sem ventilação prévia à amostragem, poderá dever-se à fraca taxa de renovação do ar permitida pela ventilação natural utilizada nos locais amostrados, a qual depende da amplitude de abertura de portas e janelas, diferenças de pressão e velocidade dos ventos. Independentemente destes factores, como abordado no tópico 5.4, se existem diferenças importantes entre o ar exterior e interior do HJA, a ventilação irá provocar uma alteração da composição de bioaerossóis presentes no interior do edifício, sendo a magnitude desse efeito dependente da intensidade da ventilação.

Foi ainda detectada uma tendência de menor concentração de bactérias e fungos no ar em quartos cuja limpeza já tinha sido realizada comparativamente a quartos com a limpeza por fazer, apesar das diferenças entre as concentrações não serem significativas em ambos os casos. Estes dados revelam que a limpeza efectuada potencia a redução de bioaerossóis, apesar das diferenças registadas não serem significativas, mas sendo compreensível que tal aconteça por ocorrer a remoção de roupas pessoais e de cama contaminadas por microorganismos associados à pele humana, bem como a remoção dos microorganismos que possam se ter depositado no chão ou noutras superfícies e que poderiam ser aerosolizados novamente por movimentações de ar. É de referir que aquando da limpeza de um quarto, nomeadamente ao serem feitas as camas, houve um acréscimo de concentração de bactérias no ar evidenciando que o acto de fazer as camas faz aerosolizar as partículas, incluindo bactérias, que estejam depositadas nas superfícies e assim contribuindo para uma menor qualidade do ar durante um determinado período de tempo posterior ao acto. Efectivamente, estudos similares demonstraram que os níveis bacterianos duplicam nos quartos dos pacientes na altura em que são feitas as camas (Pastuszka, 2005), e que este acto constitui uma das actividades onde se libertam grandes quantidades de microorganismos para a atmosfera (Beggs, 2004).

## 5.6 – AMOSTRAS SEQUENCIADAS

Neste tópico são discutidos os detalhes acerca das amostras sequenciadas, nomeadamente a forma como foi decidida a identificação definitiva e a origem provável da bactéria baseando-se nas sequências com maior homologia e em informações genéricas acerca do taxon, sendo também abordadas as potenciais implicações na saúde humana, a relevância da sua detecção no HJA, a fiabilidade da identificação com base na qualidade da sequência obtida e a proximidade filogenética entre amostras com base na OTU a que pertencem e eventual partilha de padrão de RFLP.

Foram sequenciadas 24 amostras bacterianas, 21 de bactérias colhidas no interior do HJA e 3 no exterior. Foi sequenciado 1 amostra de cada OTU, sendo a identificação dessa amostra atribuída a todos os membros da mesma OTU, ou seja, os que partilham o mesmo padrão de RFLP para o corte com ambas as enzimas de restrição utilizadas neste trabalho. As amostras a serem sequenciadas foram escolhidas por pertencerem às OTU mais frequentes, sendo sequenciadas todas as que tinham pelo menos 3 bactérias, e de entre as restantes OTU foram escolhidas preferencialmente as não pertencentes ao género *Staphylococcus* de acordo com a identificação bioquímica.

A discussão das amostras sequenciadas está organizada por ordem decrescente do número de bactérias amostradas pertencentes a cada taxon identificado. Os dados detalhados estão disponíveis nos Apêndices nas Tabelas 1, 3 a 11 e Figuras 4 a 31.

As **amostras 3-3 e 9-65** foram identificadas definitivamente como *Staphylococcus cohnii urealyticus* e provêm de bactérias amostradas no interior do HJA, pertencem às OTU denominadas de A-B e A-A respectivamente, existindo bactérias da OTU A-A também detectadas no exterior. A subespécie representada por estas amostras foi o taxon bacteriano mais frequente no ar interior do HJA, representando um total de 45 amostras do total de 113 amostras identificadas por técnicas moleculares respeitantes ao ar exterior e interior do HJA. A sequência da amostra 9-65 foi a única amostra em que foi sequenciado o gene 16S quase completo (1372pb), sendo em todas as restantes amostras, incluindo a 3-3, sequenciada apenas a porção inicial do gene (média de 670pb). Ambas as amostras em análise foram consideradas como fiáveis por não apresentarem falhas na leitura do electroferograma.

O facto destas duas OTU pertencerem à mesma subespécie indica que a técnica de RFLP aplicada neste trabalho permite distinguir diferenças genéticas com um nível de distinção superior ao da subespécie, sendo que neste caso concreto as duas OTU partilhavam o padrão de corte enzimático com a enzima HhaI, mas não o padrão referente à enzima HaeIII. Efectivamente, as sequências obtidas para ambas as amostras são exactamente iguais, mas

sendo a da amostra 9-65 completa enquanto a da amostra 3-3 apenas parcial, as diferenças genéticas seguramente deverão ser localizadas na parte terminal e não sequenciada do gene na amostra 3-3, pelo que essas diferenças terão originado o diferente padrão de corte com *HaeIII* entre as amostras. Para ser obtido um padrão de RFLP distinto basta haver apenas 1 base diferente entre sequências na zona de corte da enzima, sendo no entanto considerada a mesma espécie quando ambas as sequências têm uma diferença inferior a 1% entre si (Drancourt *et al*, 2000), o que no gene 16S rRNA com cerca de 1500 pb equivale a 15 nucleótidos. Sendo assim, é compreensível obter duas OTU distintas com a mesma identificação taxonómica, como foi o caso verificado com estas duas amostras.

A base de dados BIBI (ver Tabela 7 nos Apêndices) apresentou identificações automáticas das amostras indicando a possibilidade de poderem ser *S. cohnii*, *S. cohnii urealyticus*, *S. cohnii cohnii* ou mesmo *S. nepalensis* (esta última apenas para a amostra 3-3), mas o facto de ambas apresentarem homologia a 100% apenas com a sequência de uma estirpe tipo de *S. cohnii urealyticus* permitiu identificá-las com certeza como *S. cohnii urealyticus*, tal como a observação das árvores filogenéticas (ver Figuras 6 e 9 nos Apêndices) permitiu confirmar a maior proximidade filogenética. É de ressaltar que a identificação taxonómica original da sequência com maior homologia às amostras era *S. cohnii urealyticum*, a qual foi rectificada por Sneath (1992), passando a ser designada como *S. cohnii urealyticus*.

A base de dados GenBank (ver Tabela 8 nos Apêndices) indicou várias sequências com homologia perfeita às amostras, sendo que a identificação taxonómica delas foi variável ao nível da precisão (algumas apenas até à espécie, género ou mesmo não identificadas), mas sempre concordante com a identificação das amostras como pertencentes à subespécie *S. cohnii urealyticus*.

A identificação automática até ao género proporcionada pela base de dados RDP (ver Tabela 9 nos Apêndices) indicou 100% de probabilidade das amostras pertencerem ao género *Staphylococcus*, pelo que a identificação continuou concordante.

A base de dados EMBL (ver Tabela 10 nos Apêndices) indicou a existência de várias sequências com homologia a 100% a ambas as amostras, com uma identificação taxonómica máxima até ao género *Staphylococcus*, sendo novamente concordante com as identificações das restantes bases de dados.

Concluindo, todas as bases de dados utilizadas deram uma identificação congruente para ambas as amostras, pelo que sem dúvida pertencem à subespécie *S. cohnii urealyticus*. Outro facto interessante analisando estas duas amostras é que tanto a sequenciação completa como a parcial do gene 16S rRNA proporcionou uma identificação inequívoca, pelo que confirma-se que a sequenciação parcial do gene tem um poder discriminatório suficiente para uma

identificação segura, tal como proposto por Cai *et al* (2003) e Clarridge (2004), pelo menos para espécies bacterianas de interesse clínico.

Relativamente à origem da provável destas bactérias no ar interior do HJA, foi possível aferir na base de dados EMBL (ver Tabela 10 nos Apêndices) que as bactérias com sequências homólogas tiveram origem no pó do chão de edifícios (Rintala *et al*, 2008) e pele humana (Grice *et al*, 2009), sendo também detectadas em parasitas de roedores (Reed e Hafner, 2002). Este último resultado foi inesperado mas segundo Grice *et al* (2009) existem fortes similaridades entre as bactérias colonizadoras da pele humana e de roedores. É importante salientar que tanto estas duas amostras como várias outras sequenciadas neste trabalho tiveram elevadas taxas de homologia com o trabalho de Rintala *et al* (2008), que avaliou a composição bacteriana no pó no ambiente interior de edifícios, tendo determinado que a maioria das bactérias presentes provinham dos utilizadores dos edifícios, bem como com o trabalho realizado por Grice *et al* (2009), o qual versou a diversidade bacteriana presente na pele humana.

Procurando outras fontes de informação acerca da origem provável desta bactéria (ver Tabela 11 nos Apêndices), segundo a CCUG esta espécie está presente na pele humana e também foi também detectada no trabalho de Täubel *et al* (2009), que pesquisou a flora bacteriana associada ao pó da casa e a sua relação com a ocupação humana.

Assim, poder-se-á concluir que as amostras bacterianas 3-3 e 9-65 tiveram origem muito provavelmente na pele dos ocupantes do HJA, sendo colonizadoras habituais da pele humana e estando frequentemente nas partículas de poeira no interior de edifícios, pelo que com correntes de ar poderão ser aerosolizadas e estar presentes no ar, tal como foi detectado neste trabalho. O facto de terem sido encontradas algumas bactérias pertencentes ao mesmo taxon no ar exterior, mas em muito menor densidade, leva a crer que poderão ter tido origem no interior do HJA e se ter dispersado para o exterior através da ventilação natural aplicada no edifício, tendo o mesmo ocorrido com outros 3 taxa.

Efectivamente, *S. cohnii urealyticus* corresponde a uma bactéria comum na pele dos seres humanos, fazendo parte da sua microbiota normal, podendo em certos casos originar sérias infecções, sendo reconhecida como podendo estar envolvida em casos raros de endocardites, pneumonias, infecções do trato urinário, abscessos cerebrais, artrites sépticas, entre outras infecções (D'Azevedo *et al*, 2008). É uma espécie frequentemente encontrada em ambiente hospitalar e quando isolada de infecções humanas geralmente apresenta um perfil multi-resistente a antibióticos, podendo constituir um reservatório hospitalar de genes de resistência para outras espécies bacterianas (Drozenova e Petras, 2000; Szewczyk e Rozalskz, 2000; Szewczyk *et al*, 2004; Waldon e Szewczyk, 2002).

A correcta identificação de *Staphylococcus* coagulase negativos nos laboratórios de microbiologia clínica é muito trabalhosa e poucos laboratórios a fazem. No entanto, cada vez mais descrições de casos e surtos mostram que cada espécie tem um papel importante na epidemiologia hospitalar, bem como um perfil diferenciado quanto à resistência aos antimicrobianos. *Staphylococcus cohnii urealyticus* é um patógeno incomum em infecções humanas e a sua correcta identificação com testes de susceptibilidade a antimicrobianos pode auxiliar no rumo da terapêutica a ser tomada em cada caso (D'Azevedo *et al*, 2008).

As amostras 21-53 e 35-67 foram identificadas definitivamente como *Staphylococcus haemolyticus* e provêm de bactérias amostradas no interior do HJA, pertencentes às OTU denominadas de T-A e AK-A respectivamente, tendo sido todas as bactérias pertencentes a ambas as OTU detectadas exclusivamente no interior. Esta espécie foi o segundo taxon bacteriano mais frequente no ar interior do HJA, representando um total de 17 amostras do total de 113 amostras identificadas por técnicas moleculares no ar exterior e interior do HJA. Ambas as sequências são parciais, relativas apenas à porção inicial do gene 16S rRNA e foram consideradas como fiáveis por não apresentarem falhas na leitura do electroferograma.

Tal como aconteceu com o par de amostras 3-3 e 9-65, as amostras 21-53 e 35-67 têm homologia perfeita entre si na zona sequenciada, pelo que as diferenças que originaram as duas OTU distintas deverão estar na zona não sequenciada, pelo que partilham apenas um dos dois padrões de RFLP utilizados para definir as OTU.

A base de dados BIBI (ver Tabela 7 nos Apêndices) apresentou a identificação automática das amostras indicando que seriam pertencentes à espécie *S. haemolyticus*, sem haver outras hipóteses de identificação. Ambas as amostras tiveram homologia a 100% com duas estirpes tipo desta espécie pelo que não houve qualquer tipo de dúvidas na identificação.

A base de dados GenBank (ver Tabela 8 nos Apêndices) indicou várias sequências com homologia perfeita às amostras, sendo que estas apresentavam diferentes identificações taxonómicas entre si, incluindo outras espécies do mesmo género e inclusive 1 amostra identificada como pertencente ao género *Pseudomonas sp.*. Sendo conhecida a existência de falhas na identificação taxonómica de sequências depositadas no GenBank (Boudewijns *et al*, 2006), e dado que o maior número de sequências homólogas pertencia a *S. haemolyticus*, seria esta a identificação mais provável se fosse tida em conta exclusivamente esta base de dados para a identificação destas amostras. Se ainda restassem dúvidas, é também de salientar que na base de dados BIBI são usadas apenas sequências de referência de estirpes tipo, o que garante uma identificação mais fidedigna, enquanto no GenBank são usadas todas as sequências submetidas independentemente da sua qualidade.

A identificação pela base de dados RDP (ver Tabela 9 nos Apêndices) também indicou 100% de probabilidade das amostras pertencerem ao género *Staphylococcus*, pelo que a identificação continuou concordante com as anteriores, enquanto na base de dados EMBL (ver Tabela 10 nos Apêndices) existiam várias sequências com homologia a 100% para ambas as amostras, mas sem identificação taxonómica.

Segundo os resultados obtidos nas várias bases de dados conclui-se sem dúvidas que ambas as amostras pertencem à espécie *S. haemolyticus*.

Relativamente à origem provável destas bactérias no ar interior do HJA, foi possível determinar que as bactérias com sequências homólogas às amostras tiveram origem no pó do colchão da cama de humanos e foram considerados de origem humana provável (Täubel *et al*, 2009) e na pele humana (Grice *et al*, 2009), senda esta última a origem também da sequência homóloga na base de dados BIBI.

Conclui-se portanto que estas amostras identificadas como *Staphylococcus haemolyticus* tiveram origem muito provável na pele humana, sendo esta espécie também encontrada no pó interior de edifícios, pelo que é expectável poder encontrá-la no ar tal como foi detectado no interior do HJA. É uma espécie que é comum em humanos e que está associada a uma variedade de infecções humanas (Murray *et al*, 2005), pelo que é uma espécie que deverá ser tida em atenção e monitorizada no futuro.

A amostra 15-51 foi identificada definitivamente como *Staphylococcus capitis* ou *S. caprae* e foi amostrada no interior do HJA. Pertence à terceira OTU mais frequentemente detectada no interior do HJA, denominada de AD-A, a qual engloba 11 bactérias detectadas no interior do HJA e apenas 1 no exterior.

A base de dados BIBI (ver Tabela 7 nos Apêndices) apresentou a identificação automática indicando que a amostra poderia ser pertencente às espécies *S. caprae*, *S. capitis*, *S. capitis urealyticus* ou *S. capitis capitis*, mas a homologia a 100% ocorreu apenas com uma estirpe tipo de *S. caprae* e com uma de *S. capitis urealyticus*. Analisando a árvore filogenética (Figura 8 nos Apêndices) é possível verificar que *S. capitis* e *S. caprae* são muito próximas filogeneticamente e chegam a misturar-se algumas estirpes nos mesmos ramos da árvore. Este facto também foi detectado pela CCUG e por Dufour *et al* (2002), pois *S. capitis* tem poucas bases de diferença de *S. caprae*, sendo das espécies mais próximas dentro do género relativamente à sequência do gene 16S rRNA, pelo que torna-se difícil distingui-las utilizando apenas a sequência parcial do gene com 730 pb, tal como foi realizado neste trabalho, apesar da sequência não ter apresentado dificuldades na leitura das bases.

Efectivamente, uma análise complementar dessas sequências permitiu verificar que a amostra 15-51 é perfeitamente igual a ambas as sequências mencionadas anteriormente e

também a outra sequência de *S. capitis* (Z26940), sendo esta última mais curta do que a da amostra e portanto ignorada. No entanto, as sequências de *S. capitis urealyticus* e *S. caprae* apesar de serem iguais entre si na zona sequenciada da amostra 15-51, são diferentes na restante sequência em apenas 4 bases, pelo que seria possível identificar a espécie da amostra se tivesse sido realizada a sequenciação completa do gene.

A base de dados GenBank (ver Tabela 8 nos Apêndices) indicou 18 sequências com homologia perfeita à amostra e estas apresentavam diferentes identificações taxonómicas entre si, mas todas do género *Staphylococcus*, pelo que seguramente a amostra pertence a este género, tal como comprovado também na base de dados RDP (ver Tabela 9 nos Apêndices). No entanto entre as sequências com homologia perfeita, o maior número de identificações pertencia a *S. capitis*, seguida por *S. epidermidis* e *S. caprae* pelo que esta base de dados também não permite identificação segura da amostra, apesar de *S. capitis* poder ser a espécie candidata por ter mais sequências homólogas à amostra. É também evidenciada a proximidade filogenética de *S. epidermidis* às espécies *S. capitis* e *S. caprae*, informação também disponibilizada pela CCUG.

Na base de dados EMBL (ver Tabela 10 nos Apêndices) existiam mais de 50 sequências com homologia a 100% com a amostra, mas todas sem identificação taxonómica, pelo que a identificação definitiva não é auxiliada por estes resultados.

Segundo os resultados obtidos nas várias bases de dados, conclui-se que a amostra deverá pertencer à espécie *S. capitis* ou à *S. caprae*, pela homologia perfeita a estirpes tipo de ambas as espécies, sendo impossível distinguir a qual delas pertence por ambas serem muito próximas filogeneticamente e a zona sequenciada da amostra não englobar nenhuma das 4 bases diferentes entre ambas as sequências.

Relativamente à origem provável destas bactérias no ar interior do HJA, foi possível determinar na base de dados EMBL que as bactérias com sequências homólogas à amostra tiveram origem na pele humana (Grice *et al*, 2009; Täubel *et al*, 2009) e no pó do chão e do colchão da cama de humanos (Täubel *et al*, 2009). Segundo a CCUG e Murray *et al* (2005), ambas as espécies possíveis para identificação desta amostra estão presentes em humanos, mas enquanto a colonização humana por *S. caprae* é pouco comum e apenas tem poucos relatos de infecção humana, *S. capitis* é um colonizador comum e por vezes resulta em doenças humanas, como a endocardite.

Conclui-se portanto que esta amostra teve uma origem muito provável na pele humana, sendo frequentemente encontrada no pó interior de edifícios, pelo que é expectável poder encontrá-la no ar tal como foi detectado no HJA. Tendo em conta o facto de *S. capitis* ser mais frequente em humanos do que *S. caprae*, a primeira deverá ser a identificação definitiva mais

provável desta amostra e por estar associada a doença humana (Murray *et al*, 2005) deveria ser monitorizada no HJA.

As **amostras 3-45** e **31-60** foram identificadas definitivamente como *Micrococcus luteus* e provêm de bactérias amostradas no interior do HJA, pertencem às OTU denominadas de P-D e AG-D respectivamente, tendo sido as bactérias destas OTU detectadas maioritariamente no interior (5 bactérias) e apenas uma no exterior. Esta espécie foi o quarto taxon bacteriano mais frequente no ar interior do HJA, representando um total de 6 amostras do total de 113 identificadas por técnicas moleculares no ar exterior e interior do HJA. Ambas as sequências são parciais do gene 16S rRNA e foram consideradas fiáveis, tendo sido detectada ambiguidade de leitura apenas em 1 base na amostra 3-45.

Este par de amostras difere em apenas 1 base nas 584 bases homólogas sequenciadas em ambas as amostras, o que perfaz uma dissimilaridade inferior a 0,2%, a qual foi possível detectar como OTU diferentes com a técnica de RFLP aplicada neste trabalho, indicando novamente um elevado grau de resolução da técnica utilizada.

A base de dados BIBI (ver Tabela 7 nos Apêndices) apresentou uma identificação automática unicamente como *M. luteus* para ambas as amostras, indicando as mesmas 2 sequências de *M. luteus* com homologia máxima a 99,7% e 100% para as amostras 3-45 e 31-60 respectivamente, permitindo identificá-las sem dúvidas como *M. luteus*, tal como a observação das árvores filogenéticas (ver Figuras 11 e 13 nos Apêndices) também permite confirmar.

Na base de dados GenBank (ver Tabela 8 nos Apêndices) a amostra 3-45 também poderia ser identificada sem dúvidas como *M. luteus* por todas as amostras com homologia máxima serem concordantes com essa identificação, sendo a taxa de homologia de 99,83% suficiente para poder identificar a amostra com certeza como sendo da mesma espécie que a das sequências apresentadas. No caso da amostra 31-60, além da homologia a 100% com 9 sequências de *M. luteus*, eram apresentadas 2 sequências de *M. yunnanensis* e 1 de *Variovorax sp.* com a mesma homologia, pelo que exclusivamente por esta base de dados não seria possível identificar esta amostra com plena confiança nem sequer até ao género, apesar da identificação mais provável ser *Micrococcus sp.* pois 19 sequências homólogas eram desse género enquanto apenas 1 era de outro género. Este facto evidencia que deverá haver uma falha na identificação taxonómica da amostra identificada como *Variovorax sp.* pois as sequências mais próximas de *M. luteus* são as pertencentes a outras espécies de *Micrococcus* e ao género *Arthrobacter*, tal como pode ser verificado nas árvores filogenéticas geradas pela base de dados BIBI, devendo o género *Variovorax* ser mais distante e portanto com uma sequência diferente das referentes a *Micrococcus*.

A base de dados RDP (ver Tabela 9 nos Apêndices) confirmou a inclusão de ambas as amostras no género *Micrococcus* e segundo a base de dados EMBL (ver Tabela 10 nos Apêndices) não seria possível identificar as amostras.

Relativamente à identificação das amostras, foi concluída assim a identificação de ambas como pertencentes sem dúvida à espécie *M. luteus*.

A origem das bactérias na base de dados EMBL com maior homologia às amostras foi a pele humana (Grice *et al*, 2008, 2009; Täubel *et al*, 2009), pó do chão de edifícios (Täubel *et al*, 2009) e crosta oceânica (Santelli *et al*, 2008). Para além dos já anteriormente abordados trabalhos de Grice *et al* (2009) e de Täubel *et al* (2009), o trabalho de Grice *et al* (2008) também versou a diversidade bacteriana da pele humana, sendo que o facto destas amostras serem homólogas a amostras detectadas noutros trabalhos sobre a pele humana e pó do interior de edifícios indica que esta é uma bactéria comum da flora da pele humana e que frequentemente pode ser encontrada no ambiente interior.

Procurando outras fontes de informação acerca da proveniência provável desta bactéria em análise (ver Tabela 11 nos Apêndices), segundo a CCUG esta espécie está presente na pele de mamíferos, tendo como habitat secundário a carne, produtos lácteos, solo e água, sendo uma espécie não patogénica.

Assim, conclui-se com certeza que as bactérias das amostras 3-45 e 31-60 pertencem à espécie *M. luteus*, tendo origem muito provável nos ocupantes do HJA, sendo um colonizador habitual da pele humana e estando frequentemente presente nas partículas de poeira no interior de edifícios, pelo que poderá ser aerosolizada e estar presente no ar, tal como detectado neste trabalho.

A **amostra 37-32** foi identificada definitivamente como *Staphylococcus sp.* e foi amostrada no interior do HJA. Pertence à quinta OTU mais frequentemente detectada no interior do HJA, denominada de T-B, a qual engloba 4 bactérias detectadas exclusivamente no interior do HJA.

A sequenciação desta amostra não correu bem, sendo a sequência considerada suspeita, ou seja, não fiável para identificação, por conter 34 ambiguidades na leitura das bases. Não obstante este facto, por ser um dos grupos mais representados no ar interior do HJA e por ser caro fazer sequenciações, optou-se pela identificação da amostra com esta sequência de má qualidade por permitir mesmo assim uma identificação, ainda que não tão precisa como quando se utiliza sequências com boa qualidade.

A base de dados BIBI (ver Tabela 7 nos Apêndices) não apresentou uma identificação automática da amostra, sendo a homologia máxima da amostra de apenas 93,1% com *S. hominis*, enquanto analisando a árvore filogenética (Figura 10 nos Apêndices) é possível verificar que todas as sequências próximas pertencem a espécies do género *Staphylococcus*.

Na base de dados GenBank (ver Tabela 8 nos Apêndices) a homologia máxima foi também de apenas 93,27% com 44 sequências, das quais 40 eram pertencentes a bactérias do género *Staphylococcus* e maioritariamente à espécie *S. hominis* (22 sequências). Na base de dados RDP (ver Tabela 9 nos Apêndices) foi confirmada a pertença da amostra ao género *Staphylococcus* com 100% de probabilidade, enquanto na base de dados EMBL (ver Tabela 10 nos Apêndices) a taxa máxima de homologia foi de 93,1% com bactérias identificadas como *Staphylococcus*.

Conclui-se da análise dos resultados das várias bases de dados utilizadas que a amostra 37-32 pertence ao género *Staphylococcus*, sendo tal facto confirmado pela base de dados RDP, sendo a identificação mais provável desta bactéria a espécie *S. hominis* por ser a que apresentou mais frequentemente a mais alta taxa de homologia, não podendo tal identificação ser atribuída pela baixa taxa de homologia entre sequências, se bem que esta baixa taxa deverá ter origem na má qualidade da sequência da amostra e não em diferenças reais entre as sequências.

Quanto à origem provável destas bactérias no ar interior do HJA, na base de dados EMBL as bactérias com sequências com maior homologia à amostra tiveram origem na pele humana e no pó do colchão da cama de humanos (Täubel *et al*, 2009) e no ar da cabine de aviões comerciais (Osman *et al*, 2008). Segundo a CCUG, o género *Staphylococcus* compreende bactérias presentes habitualmente na pele, glândulas da pele e membranas mucosas de animais de sangue quente, como os humanos, sendo algumas espécies patogénicas oportunistas.

Conclui-se assim que apesar de apenas identificada até ao género, esta amostra deverá ter tido uma origem provável na pele humana, sendo encontradas bactérias similares no pó interior de edifícios e no ar interior de espaços com ocupação humana, pelo que é expectável poder encontrá-la no ar tal como foi detectado no HJA. Se esta bactéria for efectivamente da espécie *S. hominis*, esta é uma das principais bactérias que colonizam a pele humana, sendo associada a vários tipos de infecção (CCUG), pelo que seria um provável candidato a ser detectado no ar interior do HJA, sendo no entanto recomendada vigilância para esta espécie.

A amostra 9-40 foi identificada definitivamente como *Moraxella osloensis* ou *Enhydrobacter aerosaccus* e pertence a uma OTU que engloba 3 bactérias detectadas apenas no interior do HJA

A base de dados BIBI (ver Tabela 7 nos Apêndices) apresentou a identificação automática da amostra como sendo *E. aerosaccus*, sendo a homologia máxima da amostra de 99,59% apenas com a sequência AJ550856 dessa espécie, com apenas 3 bases de diferença. As 3 bases diferentes consistiam em 2 bases não determinadas em cada uma das sequências e 1 base

efectivamente diferente. No entanto, segundo a CCUG, a sequência AJ550856 de *E. aerosaccus* deverá ser na realidade *M. osloensis*, o que é corroborado pela *Belgian Co-ordinated Collections of Micro-Organisms* que indica uma elevada similaridade da sequência do gene 16S entre estas espécies, tornando-as difíceis de distinguir geneticamente.

A sequência da estirpe tipo de *M. osloensis* (X74897) não foi considerada tão próxima da amostra por ter uma sequência curta com menos 47 bases do que a amostra, tendo no entanto apenas 2 bases diferentes desta. Analisando a árvore filogenética (Figura 14 nos Apêndices) é possível verificar que é próxima da amostra e de *E. aerosaccus*, sendo algo distante das restantes sequências das outras espécies do género *Moraxella*, mas isto devido ao menor comprimento da sua sequência.

Tendo em conta que a sequência da estirpe tipo de *E. aerosaccus* apresenta pelo menos 1 ambiguidade e é provavelmente pertencente a *M. osloensis*, e que a sequência de *M. osloensis* é muito curta, torna-se difícil uma identificação conclusiva acerca da identificação da amostra tendo por base apenas estas sequências das estirpes tipo.

A pesquisa efectuada no GenBank (ver Tabela 8 nos Apêndices) revelou homologia máxima com 19 sequências com apenas 1 base diferente, a qual era correspondente à base não determinada na amostra, sendo que 16 sequências correspondiam ao género *Moraxella*, incluindo 7 da espécie *M. osloensis* e apenas 1 ao género *Enhydrobacter* indicando que provavelmente *M. osloensis* deveria ser a identificação correcta da amostra pois bastaria apenas a sequência de *Enhydrobacter* ter sido mal identificada taxonomicamente para podermos identificar definitivamente a amostra como *M. osloensis*.

Na base de dados RDP (ver Tabela 9 nos Apêndices) a identificação correspondia a 100% de probabilidade de pertença ao género *Enhydrobacter*, enquanto na base de dados EMBL (ver Tabela 10 nos Apêndices) a identificação máxima possível era apenas de pertença às Gama proteobactérias, o que inclui a possibilidade de identificação como ambas as espécies propostas.

Com tão grande dificuldade em distinguir *M. osloensis* de *E. aerosaccus*, e com resultados que indicavam dever pertencer a uma ou a outra espécie, não restou outra alternativa senão considerar que a amostra deverá pertencer a uma delas.

Na base de dados EMBL, a pele humana (Grice *et al*, 2009; Täubel *et al*, 2009) e o pó interior de edifícios (Täubel *et al*, 2009), bem como as guelras de lapas (Zbinden *et al*, não publicado) tinham bactérias com sequências homólogas à da amostra, indicando que a amostra poderá ter origem humana ou ambiental.

*Enhydrobacter aerosaccus* foi descrita por Staley *et al* (1987) como um género e espécie nova para a ciência, sendo amostrada na zona anóxica de um lago eutrófico nos Estados

Unidos da América há 23 anos. Actualmente este género continua a não ter nenhuma outra espécie além da originalmente descrita (CCUG). Por outro lado, *M. osloensis* foi descrita antes de *E. aerosaccus* por Bøvre e Henriksen (1967), sendo frequentemente encontrada no ambiente exterior e em material clínico humano, nomeadamente no sangue, urina e tracto respiratório (CCUG).

Face à ecologia de ambas as espécies analisadas, e tendo em conta que todas as bactérias mais frequentemente encontradas no ar interior do HJA tiveram origem provável associada à flora bacteriana humana, será de esperar que muito provavelmente a identificação desta amostra deva ser *M. osloensis* por ser a espécie associada ao ser humano.

Sendo tão difícil distinguir estas duas espécies com base na sequência do gene 16S rRNA deveria ter sido utilizada a sequenciação de outros genes para a identificação definitiva da amostra, não obstante ambas poderem de facto ser a mesma espécie pois *E. aerosaccus* parece uma espécie perdida sem outros parentes próximos taxonomicamente, sendo no entanto filogeneticamente muito próxima de *M. osloensis*, a qual por maior antiguidade deveria prevalecer com o nome do taxon.

*Enhydrobacter aerosaccus* já foi detectada na pele humana (Gao *et al*, 2007; Täubel *et al*, 2009) mas procedendo à identificação das bactérias por homologia do gene 16S rRNA com sequências no GenBank, tal como neste trabalho, pelo que ocorrendo confusão entre os taxa poderiam estar na realidade a se referir a *M. osloensis*, a qual é comumente detectada na flora bacteriana humana (CCUG), bem como no ambiente onde geralmente se encontra apenas *E. aerosaccus*, de acordo com a pesquisa efectuada no GenBank.

Conclui-se portanto que a amostra provavelmente pertencerá à espécie *M. osloensis*, sendo comum encontrá-la na flora bacteriana humana pelo que é expectável encontrá-la no HJA, não sendo no entanto preocupante por estar muito pouco representada no ar, levando a um baixo potencial de contaminação, e ter baixa patogenicidade. Se a amostra fosse *E. aerosaccus* também não seriam necessárias precauções por ser uma bactéria ambiental sem significância clínica.

A amostra 9-77 foi identificada definitivamente como *Kocuria palustris* e foi amostrada no ar interior do HJA, tal como as outras 2 bactérias pertencentes à OTU denominada de R-D.

A identificação foi inequívoca como *K. palustris* segundo todas as 4 bases de dados consultadas, com homologia a 100% com esta espécie e tendo a sequência da amostra boa qualidade.

Sequências homólogas a 100% com a amostra foram obtidas na pele humana (Grice *et al*, 2008, 2009) e no pó do chão de edifícios (Täubel *et al*, 2009), segundo a EMBL.

*Kocuria palustris* foi originalmente descrita como obtida na raiz de *Typha angustifolia* (Kovács *et al*, 1999), sendo considerada omnipresente no ambiente e sem significado clínico (CCUG).

O facto de ter sido detectada na pele humana em trabalhos de Grice *et al* (2008,2009) indica que mesmo sendo uma bactéria predominantemente ambiental poderá colonizar a pele humana, pelo que é considerada, tal como todas as bactérias anteriormente analisadas, que esta deverá ter origem na flora bacteriana da pele dos ocupantes do HJA, o que também é suportado pelo facto desta espécie apenas ter sido detectada no interior do HJA, não sendo possível no entanto excluir a possibilidade de ser de origem ambiental. No entanto não serão necessárias precauções relativamente a esta espécie pois não são conhecidas doenças humanas associadas.

A **amostra 28-61** foi identificada definitivamente como *Kocuria rhizophila* e foi amostrada no ar interior do HJA, tal como as outras 2 bactérias pertencentes à OTU denominada de R-AI. A amostra pertence ao mesmo género que a amostra 9-77, partilhando apenas o padrão de RFLP da enzima de restrição Hhal.

A identificação foi inequívoca como *K. rhizophila* segundo todas as 4 bases de dados consultadas, não obstante a identificação original da base de dados BIBI ter indicado também a possibilidade de ser *K. varians*. Contudo, a maior homologia da amostra com *K. rhizophila*, com apenas 1 base de diferença que corresponde à base ambígua da sequência da amostra, e a árvore filogenética mostrando uma maior proximidade de *K. rhizophila* (Figura 22 nos Apêndices) e no GenBank apenas *K. rhizophila* apresentar a mais alta taxa de homologia possível, tornou fiável e inequívoca a identificação.

Pesquisando a origem provável desta bactéria, na EMBL existiam sequências homólogas a 100% de bactérias que foram obtidas na pele humana (Grice *et al*, 2009) e no pó do colchão de cama (Täubel *et al*, 2009). Esta espécie, tal como *K. palustris*, foi originalmente descrita como presente na raiz de *Typha angustifolia* (Kovács *et al*, 1999), sendo considerada omnipresente no ambiente e sem significado clínico (CCUG).

Tal como *K. palustris*, por ser omnipresente e ter sido detectada na pele humana é de esperar que possa colonizar a pele dos ocupantes do HJA, sendo provavelmente essa a sua origem, não sendo necessárias precauções por estar pouco presente no ar interior e não serem conhecidos casos de doença associada.

A **amostra 29-45** foi identificada definitivamente como *Bacillus granadensis* e tal como todos os 3 membros da OTU, foi detectado no ar interior do HJA.

A identificação até ao género *Bacillus* foi corroborada pelas 4 bases de dados utilizadas, mas relativamente à identificação até à espécie já não houve tanta certeza. Segundo a base de

dados BIBI (Tabela 7 nos Apêndices), a identificação prestada indicava *B. granadensis*, a qual apresentava a sequência única com maior homologia, a 98% de similaridade e 13 bases de diferença, o que à partida não deverá ser considerada uma identificação segura. Analisando a árvore filogenética (Figura 12 nos Apêndices) é possível verificar que *B. granadensis* é a espécie mais próxima da amostra, sendo todas as outras muito mais distantes, permitindo optar com alguma certeza por esta opção.

Na base de dados GenBank (Tabela 8 nos Apêndices), existiam 14 sequências de bactérias do género *Bacillus* com homologia perfeita à amostra, excepto numa base que correspondia a uma ambiguidade na sequência da amostra, mas cuja identificação até à espécie correspondia a 2 sequências de *B. flexus* e 1 de *B. bataviensis*, levando a crer que a identificação correcta da amostra deveria ser uma destas duas espécies por apresentarem maior homologia que a disponível na base de dados BIBI. No entanto, analisando novamente a árvore filogenética da base de dados BIBI é possível verificar que a estirpe tipo de *B. flexus* é distante da sequência da amostra e *B. bataviensis* nem aparece na árvore por ser ainda mais distante filogeneticamente, estando presente na árvore filogenética relativa à amostra 14-10 (Figura 23 nos Apêndices) próxima de outras espécies do mesmo género. Fazendo nova pesquisa na base de dados BIBI, mas desta vez utilizando o conjunto de dados *Bacteria\_SSU-rDNA-16S\_stringent* que inclui estirpes tipo e não tipo e com identificação concordante com a nomenclatura (Figura 30 nos Apêndices), é possível verificar que a grande maioria das sequências de *B. flexus* é próxima da sequência da estirpe tipo dessa espécie, enquanto um grupo muito distante filogeneticamente inclui a amostra, a estirpe tipo de *B. granadensis* e 3 sequências de *B. flexus*. Estes factos indicam que as tais 3 sequências identificadas como *B. flexus* e a própria amostra deverão pertencer à espécie *B. granadensis*, ou até constituir uma nova espécie, uma vez que a homologia entre a amostra e *B. granadensis* é inferior ao patamar de 99% considerado por Drancourt *et al* (2000) como necessário para ser considerada a mesma espécie, existindo 13 bases diferentes em 657 bases obtidas na sequenciação do gene 16S rRNA da amostra, cuja qualidade foi boa, existindo espécies distintas descritas com menor número de diferenças em todos os 1500 pb do gene (Clarridge, 2004).

O superior poder discriminatório proporcionado pela base de dados BIBI face ao GenBank, de acordo com os parâmetros de pesquisa seleccionados, permite optar com maior confiança nos resultados interpretados a partir da BIBI do que no GenBank, pelo foi considerada na identificação definitiva da amostra apenas os resultados da BIBI.

Pesquisando a origem provável desta bactéria (Tabelas 10 e 11 nos Apêndices), na EMBL foi obtida apenas uma sequência com homologia perfeita à amostra (com excepção de 1 base ambígua da amostra), a qual foi detectada numa bactéria presente no sistema gastrointestinal

humano (Frank *et al*, 2007). *B. granadensis* foi detectado pela primeira vez em água residual de lavagem de azeitonas em Espanha em 2006 (Quesada *et al*, não publicado), não sido ainda validamente publicada, e também foi detectada no pó interior de edifícios ocupados por humanos (Täubel *et al*, 2009).

Pode-se concluir portanto que apesar de este taxon ter sido descrito como sendo de origem ambiental e existirem registos dele no pó interior de edifícios, o facto de existirem bactérias iguais à amostra (e não necessariamente *B. granadensis*) colonizadoras do sistema gastrointestinal do corpo humano leva a crer que a origem mais provável da amostra será os ocupantes do HJA, associada eventualmente a incontinência fecal, não sendo possível excluir de todo a possibilidade de ter origem no ambiente exterior. Por ser um taxon novo e ainda não oficialmente descrito, não existem registos da sua patogenicidade, mas se causasse doença humana certamente já teria sido descrito e analisado pela comunidade científica há mais tempo.

A amostra 14-10 foi identificada definitivamente como *Bacillus simplex* e foi amostrada no exterior do HJA, existindo mais 1 bactéria da mesma OTU detectado no ar interior do HJA.

Esta amostra foi identificada automaticamente pela base de dados BIBI (Tabela 7 nos Apêndices) como *B. simplex*, existindo unicamente 2 sequências dessa espécie com homologia perfeita à amostra, o que juntamente com árvore filogenética (Figura 23 nos Apêndices) a demonstrar que *B. simplex* é a espécie mais próxima da amostra, permite uma identificação fiável.

Na base de dados GenBank (Tabela 8 nos Apêndices), a identificação como *B. simplex* não era confirmada, sendo no entanto a mais provável por apresentar 18 sequências com homologia perfeita, existindo também sequências de *B. muralis* e *Brevibacterium frigoritolerans* com o mesmo grau de homologia. No entanto, a informação existente no GenBank acerca de *Brevibacterium frigoritolerans* indica que na realidade trata-se de *Bacillus frigoritolerans*, pelo que confirma-se pelo menos o género da amostra como sendo *Bacillus*, tal como foi confirmado pelas bases de dados RDP e EMBL (Tabelas 9 e 10 nos Apêndices).

Uma vez que a base de dados BIBI permite maior grau de fiabilidade da identificação, por utilizar apenas as estirpes tipo, ao contrário do GenBank que utiliza sequências de qualquer origem, optou-se por aceitar a identificação proposta pela base de dados BIBI.

Relativamente à origem da amostra sequenciada, na base de dados EMBL foram detectadas sequências iguais referentes a bactérias de aerossóis urbanos, tendo sido descrita a espécie *B. simplex* como presente em muros urbanos (Heyrman *et al*, 2005), pelo que foi considerado que seguramente a amostra deverá ter origem ambiental. Pelo facto desta bactéria ter sido detectada no ar exterior e estar pouco representada no ar interior do HJA confirma-se a sua

quase certa origem ambiental, sendo demonstrada a entrada de bactérias do ambiente exterior para o ar interior do HJA, ainda que com baixa representatividade. A pouca significância desta espécie em amostras clínicas humanas (CCUG) leva a crer que é uma espécie que não deverá suscitar preocupações de monitorização e controlo futuras.

As **amostras 25-15 e 25-57** foram identificadas definitivamente como *Paracoccus yeei* e são representantes de duas OTU exclusivamente detectadas no ar interior do HJA e que totalizam apenas 3 representantes.

Ambas as amostras foram identificadas como *P. yeei* sem margem para dúvidas pelas bases de dados utilizadas, com homologia perfeita à mesma estirpe tipo dessa espécie, excepto no caso da amostra 25-57 cuja presença de 1 base ambígua na sequência não permitiu a homologia perfeita. Por outro lado, a amostra 25-15 foi identificada automaticamente pela base de dados BIBI como pertencente a *P. yeei* ou a *P. carotinifaciens*, mas a homologia perfeita apenas com *P. yeei* e a grande proximidade filogenética dessa espécie, em detrimento da muito afastada *P. carotinifaciens* (Figura 16 nos Apêndices), permite concluir com segurança a identificação da amostra como *P. yeei*. As restantes bases de dados utilizadas deram resultados sempre congruentes com a identificação das amostras exclusivamente como *P. yeei*.

Bactérias com sequências iguais às amostras em análise foram detectadas no pó do colchão da cama de humanos (Täubel *et al*, 2009), tendo a estirpe tipo de *P. yeei* sido caracterizada a partir de amostras clínicas e associada a infecção humana (Daneshvar *et al*, 2003), sendo esta espécie conhecida por estar associada ao ser humano e ser frequentemente detectada em amostras clínicas (CCUG). É de referir que a esta espécie foi descrita originalmente como *P. yeeii* (Daneshvar *et al*, 2003), mas a nomenclatura foi alvo de revisão, mudando-a para *P. yeei* (IJSEM, 2003).

Conclui-se portanto que as bactérias das amostras em questão terão seguramente origem nos ocupantes do HJA e, apesar de terem sido detectados poucos exemplares, deverá ser tida em consideração futuramente no ambiente hospitalar por estar associada a infecção humana e ter sido apenas recentemente descrita, pelo que ainda deverá existir pouco conhecimento acerca das implicações associadas à saúde humana.

A **amostra 4-10** foi identificada definitivamente como *Micrococcus sp.* e representa a OTU denominada de NA-D, que inclui 2 bactérias detectadas apenas no ar interior do HJA.

A sequência obtida para esta amostra foi de baixa qualidade, existindo um total de 12 bases ambíguas num comprimento de apenas 504 pb.

No entanto, aproveitando a sequência da amostra foi possível confirmar que esta pertence ao género *Micrococcus* com 98% de probabilidade segundo a base de dados RDP (Tabela 9 nos

Apêndices), sendo a identificação proporcionada pelas bases de dados BIBI e GenBank (Tabelas 7 e 8 nos Apêndices) concordantes com esta identificação, com a taxa de homologia com sequências de bactérias deste género a ser pouco superior a 97%, o que permite uma identificação segura relativamente a este género.

Relativamente à identificação até à espécie, a BIBI indica como possibilidade *Micrococcus luteus* e *Micrococcus thailandicus*, mas a análise da árvore filogenética (Figura 19 nos Apêndices) permite verificar uma maior proximidade a *M. luteus*, sendo no entanto a homologia de apenas 97%. Adicionalmente, o GenBank apresenta exclusivamente sequências dessa espécie (quando a identificação da sequência é feita até à espécie) como as mais similares à amostra e ocorre a partilha de um dos padrões de RFLP com as amostras 3-45 e 31-60 que foram identificadas como *M. luteus*.

Conclui-se portanto que a amostra 4-10 pertence certamente ao género *Micrococcus* e muito provavelmente à espécie *M. luteus*, sendo a baixa qualidade da sequência obtida o único entrave à identificação segura até à espécie, por permitir um relativamente baixo nível de homologia com sequências padrão.

Sendo esta amostra muito provavelmente pertencente à espécie *M. luteus*, aplicam-se a esta amostra as conclusões e recomendações referidas na análise das amostras 3-45 e 31-60.

A **amostra 33-38** foi identificada definitivamente como *Staphylococcus kloosii* e representa uma OTU que inclui 2 bactérias detectadas apenas no ar interior do HJA.

A identificação da amostra como *S. kloosii* foi inequívoca, havendo homologia perfeita exclusivamente com sequências dessa espécie na base de dados BIBI e no GenBank (Tabelas 7 e 8 nos Apêndices), enquanto as bases de dados RDP e EMBL (Tabelas 9 e 10 nos Apêndices) não indicavam resultados contrários a esta identificação.

Na base de dados EMBL, a maior homologia com a sequência da amostra era de 99,7% e provinha de uma bactéria encontrada em carne de porco refrigerada (Yun, não publicado), havendo também bactérias detectadas no pó do chão de edifícios ocupados por humanos com homologia ligeiramente inferior, igual a 99,3% (Täubel *et al*, 2009). Este taxon foi descrito originalmente em mamíferos (Schleifer *et al*, 1985), não sendo conhecidos casos de infecção humana (CCUG). Pode-se assim concluir que esta bactéria deverá ter origem ambiental, sendo no entanto relativamente comum o contacto com os humanos, seja sob a forma de pó no interior de edifícios, seja sob a forma de manipulação eventual de alimentos ou animais domésticos, mas a sua baixa concentração no HJA e a sua incapacidade de infecção humana revelam que é uma espécie que não deverá suscitar necessidade de monitorização no futuro.

A **amostra 30-11** foi identificada definitivamente como *Crocino bacterium jeju* e representa uma OTU que inclui 2 bactérias detectadas exclusivamente no ar interior do HJA.

A identificação da amostra como *C. jejui* foi atribuída de acordo com base de dados BIBI (Tabela 7 nos Apêndices), uma vez que essa foi a única possibilidade indicada pela identificação automática, pertencendo a esta espécie a sequência mais próxima à amostra, com homologia de 98,3%. No GenBank (Tabela 8 nos Apêndices), a maior homologia à amostra, com um valor de 99,7%, ocorreu apenas com uma sequência que pertencia a uma bactéria do género *Bacillus*, enquanto a base de dados RDP (Tabela 9 nos Apêndices) indicava uma probabilidade de apenas 44% da amostra pertencer ao género *Bacillus* e a EMBL não permitia identificar a amostra.

A proximidade da amostra ao género *Bacillus* não é de estranhar, pelo facto de *C. jejui* pertencer à mesma ordem, a Bacillales, mas é possível verificar que a amostra é muito mais próxima da estirpe tipo de *C. jejui* do que das estirpes tipo de outras espécies pertencentes ao género *Bacillus*, como a mais próxima *Bacillus psychrodurans* (Figura 15 nos Apêndices).

A homologia da amostra com a sequência da estirpe tipo de *C. jejui* abaixo do limiar adequado à identificação como sendo a mesma espécie, juntamente com o facto desta espécie ainda não ter sido validamente descrita (Lee, não publicado) e ser próxima de várias espécies do género *Bacillus*, implica que na realidade esta amostra deva pertencer a uma espécie ainda não descrita do género *Bacillus*, a qual já foi detectada anteriormente, o que é comprovado pela presença de sequências muito próximas no GenBank e EMBL identificadas apenas até ao género *Bacillus*. Contudo optou-se pela identificação como *C. jejui* em vez de apenas *Bacillus sp.* por indicar com maior precisão a bactéria em questão, evitando potenciais confusões com espécies conhecidas e com importância clínica pertencentes a este género, sendo que de futuro esta amostra deverá ser considerada noutra taxon quando houver a descrição da espécie apropriada.

Esta bactéria deverá ter uma origem ambiental uma vez que a bactéria com maior homologia na EMBL provinha de solo alcalino e *C. jejui* foi detectado originalmente em algas secas (Lee, não publicado). Por esta ser uma espécie ainda não validamente publicada e provavelmente ter pouca importância clínica, não são conhecidos casos de infecção humana, pelo que não constitui uma espécie preocupante no ambiente interior do HJA.

A amostra **35-73** foi identificada definitivamente como *Exiguobacterium homiense* e representa uma OTU que inclui apenas esta bactéria detectada no ar do bar do pessoal do HJA.

Esta bactéria foi identificada sem dúvidas até ao género *Exiguobacterium* pelas bases de dados BIBI, GenBank e RDP (Tabelas 7, 8 e 9 nos Apêndices). A identificação até à espécie foi possível apenas através da base de dados BIBI, a qual apresentou como identificação automática as espécies *E. homiense* e *E. aurantiacum*, mas a maior homologia da amostra com

*E. homiense* e com um valor válido para a identificar como sendo da mesma espécie permitiu optar com segurança por esta identificação.

Na EMBL (Tabela 10 nos Apêndices), entre as bactérias com a mais elevada homologia à amostra encontravam-se exemplares detectadas na pele do corpo humano (Grice *et al*, 2009), tendo sido detectadas bactérias do género *Exiguobacterium* no pó do interior de edifícios ocupados por humanos (Täubel *et al*, 2009). A espécie *E. homiense* foi detectada originalmente em areia do mar (Kwon, não publicado) e é considerada como colonizadora de ambiente alcalinos (CCUG), mas pelo facto de já ter sido detectada na pele humana foi considerada como tendo provável origem na flora bacteriana dos ocupantes do HJA, apesar de não poder ser descartada a possibilidade de ter origem no ambiente exterior.

Por esta bactéria ter uma baixa significância nas amostras clínicas humanas (CCUG) e estar muito pouco representada no ar interior do HJA, não deverão ser necessárias precauções especiais relativamente a esta espécie.

A amostra **37-16** foi identificada definitivamente como *Corynebacterium sp.* e representa uma OTU que inclui apenas esta bactéria detectada no ar do corredor do piso 1 do HJA.

A sequência da amostra foi considerada de fiabilidade suspeita por conter 9 bases ambíguas e ter apenas 504 bases de comprimento, mas foi utilizada para evitar a perda total da identificação da amostra.

A má qualidade da sequência da amostra impediu a obtenção de elevadas taxas de homologia com as sequências depositadas nas bases de dados, mas o facto das mais elevadas homologias ocorrerem somente com sequências de *Corynebacterium sp.* indica que este deverá ser o género a que pertence a amostra. Este resultado foi obtido nas bases de dados BIBI, GenBank e RDP, apesar dos valores absolutos de homologia não permitirem uma identificação segura de acordo com os critérios de Drancourt *et al* (2000). Por outro lado, uma vez que a baixa homologia deverá ter origem na má qualidade da sequência da amostra, o valor absoluto de homologia não poderá servir de guia para confirmar a identificação, sendo portanto identificada a amostra com base nas maiores homologias disponíveis.

Segundo a identificação automática da base de dados BIBI, esta amostra pertence à espécie *Corynebacterium afermentans*, sendo esta a espécie que demonstra maior homologia e proximidade filogenética com a amostra (Figura 26 nos Apêndices).

Conclui-se portanto que a amostra pertence quase de certeza ao género *Corynebacterium*, e muito provavelmente à espécie *Corynebacterium afermentans*, mas a má qualidade da sequência e baixas taxas de homologia impedem a confirmação inequívoca da identificação, tendo-se optado pela identificação apenas até ao género.

A sequência depositada na base de dados EMBL com maior homologia à amostra corresponde a uma bactéria recolhida da pele humana (Grice *et al*, 2009), tendo sido detectadas bactérias do género *Corynebacterium* na pele humana e pó interior de edifícios (Täubel *et al*, 2009) e sendo este género considerado como omnipresente no ambiente (CCUG). Assim considera-se que a amostra em análise deverá ter origem na flora bacteriana dos ocupantes do HJA, e se efectivamente for *Corynebacterium afermentans*, é uma bactéria geralmente detectada em amostras clínicas humanas, especialmente no sangue, mas sem relatos de patogenicidade (CCUG), pelo que não é preocupante encontrá-la nesta concentração tão baixa no ar interior do HJA.

A **amostra 35-10** foi identificada definitivamente como *Lactococcus lactis lactis* e representa uma OTU que inclui apenas esta bactéria detectada no ar do bar do pessoal do HJA.

A identificação da amostra como *Lactococcus lactis lactis* foi inequívoca segundo as 4 bases de dados consultadas, existindo homologia perfeita da amostra exclusivamente com sequências desta subespécie no GenBank, e quase perfeita com estirpes tipo desta subespécie na BIBI, sendo a diferença de apenas 1 base nas 740 bases da sequência da amostra.

Sequências com homologia de 99,9% com a amostra na base de dados EMBL foram obtidas de bactérias presentes na pele humana (Grice *et al*, 2009), no pó do chão da casa de humanos (Rintala *et al*, 2008; Täubel *et al*, 2009) e no sistema gastrointestinal humano (Eckburg *et al*, 2005; Ley *et al*, 2006). *Lactococcus lactis lactis* é conhecida por estar presente nos produtos lácteos, não sendo geralmente detectada em amostras clínicas e solo (CCUG).

Uma vez que esta bactéria foi detectada apenas no bar do pessoal, onde é frequente a manipulação de produtos lácteos associados à alimentação humana, a bactéria deverá ter tido origem ambiental, não sendo possível excluir a hipótese de ter tido origem na flora bacteriana dos ocupantes do HJA por já ter sido detectada associada ao corpo humano.

A **amostra 14-18** foi identificada definitivamente como *Staphylococcus hominis hominis* e representa uma OTU que inclui apenas esta bactéria detectada no ar do terraço exterior do piso 3 do HJA.

A sequenciação desta amostra correu mal, sendo seleccionada para identificação uma secção curta da sequência, com apenas 492 bases, cujas bases ambíguas segundo a leitura automática do electroferograma foram corrigidas por comparação com a sequência com maior homologia no GenBank, nomeadamente a de *S. hominis hominis*.

A sequência corrigida foi utilizada para identificação da amostra nas várias bases de dados, tendo todas originado uma identificação inequívoca como *S. hominis hominis*, com homologia a 100% com sequências desta subespécie nas bases de dados GenBank e BIBI, enquanto a RDP e EMBL limitavam-se apenas a confirmar a pertença a este género bacteriano.

Bactérias com homologia perfeita à amostra foram detectadas na pele humana (Grice *et al*, 2009; Täubel *et al*, 2009), no pó do chão e do colchão da cama de humanos (Täubel *et al*, 2009) e no ar da cabine de aviões comerciais (Osman *et al*, 2008). *Staphylococcus hominis hominis* é conhecida por colonizar a pele humana e estar associada a uma variedade de infecções humanas (CCUG).

Conclui-se portanto que apesar de esta bactéria ter sido detectada apenas no ar exterior do HJA, deverá ter tido origem nos ocupantes do edifício por ser uma bactéria intimamente ligada ao ser humano. É compreensível encontrá-la no terraço exterior do piso 3 do HJA tendo em conta a proximidade espacial e conectividade do ar através das janelas abertas com um dos locais interiores com maior concentração bacteriana no ar, o corredor do piso 3.

A **amostra 14-15** foi identificada definitivamente como *Gordonia alkanivorans* e representa uma OTU que inclui apenas esta bactéria detectada no terraço exterior do piso 3 do HJA.

A identificação desta amostra como *G. alkanivorans* foi congruente nas 4 bases de dados utilizadas, existindo homologia quase perfeita da amostra apenas com sequências de *G. alkanivorans* e *G. nitida*, sendo a diferença de apenas 1 base nas 834 bases da sequência da amostra. É de referir que *G. alkanivorans* (Kummer *et al*, 1999) foi descrita um ano antes de *G. nitida* (Yoon *et al*, 2000), tendo uma análise filogenética posterior (Arenskötter *et al*, 2005) determinado que *G. nitida* é na realidade uma sinonímia posterior de *G. alkanivorans*, devendo portanto prevalecer a identificação original da espécie.

Tanto a *G. alkanivorans* como *G. nitida* foram descritas como bactérias encontradas no ambiente em solo contaminado e água residual industrial respectivamente (Arenskötter *et al*, 2005), tendo a bactéria com maior homologia à amostra na base de dados EMBL tido origem na espuma de águas residuais (Shen *et al*, 2007).

Conclui-se assim que a bactéria da amostra 14-15 teve seguramente origem na flora bacteriana ambiental no exterior do HJA, por ser essa a origem habitual desta espécie, o que é também comprovado pelo facto de ter sido detectada exclusivamente no ar exterior do HJA.

A **amostra 23-14** foi identificada definitivamente como *Planococcus sp.* e representa uma OTU que inclui apenas esta bactéria detectada no exterior do HJA.

A sequência obtida para esta amostra foi de baixa qualidade, com 11 bases ambíguas ao longo de 561 bases, sendo mesmo assim utilizada na identificação da amostra.

A base de dados BIBI não foi capaz de fornecer uma identificação automática da amostra, sendo contudo considerada a inclusão da amostra no género *Planococcus* pela homologia máxima com *Planococcus rifitiensis*, apesar desta ser apenas 95,7%, e pela proximidade com este género na árvore filogenética (Figura 17 nos Apêndices). No entanto, na mesma árvore filogenética também se pode verificar uma proximidade semelhando ao género

*Planomicrobium*, sendo esta a identificação da amostra fornecida pela base de dados RDP, mas com uma probabilidade de apenas 43%. No GenBank, a homologia máxima da amostra ocorreu com 1 sequência de *Planococcus sp.* e com 1 de *Planomicrobium sp.*, pelo que exclusivamente por esta base de dados seria identificada a amostra apenas como pertencente à família Planococcaceae, sendo impossível distinguir a qual dos dois géneros pertence a amostra. É na base de dados EMBL que finalmente é confirmada a inclusão da amostra no género *Planococcus*, por ocorrer homologia com sequências deste género a 96,9%, o que é um valor muito próximo do limite de 97% considerado por Drancourt *et al* (2000) para a inclusão no mesmo género.

Conclui-se portanto que seguramente a amostra pertence à família Planococcaceae, sendo quase certa a inclusão no género *Planococcus* por ser o único a apresentar uma homologia à amostra a um nível próximo do limite de identificação segura, sendo também deste género a estirpe tipo que mostrou maior homologia na base de dados BIBI.

Entre as sequências com maior homologia à amostra na base de dados EMBL consta bactérias recolhidas num lago miniatura numa árvore em ambiente desértico (Qvit-Raz *et al*, 2008), tendo a estirpe tipo com maior homologia na base de dados BIBI sido amostrada em água sulfurosa com algas.

Esta bactéria é reconhecidamente parte da flora bacteriana ambiental, sendo geralmente associada a ambiente aquático, não sendo estranho o facto de ter sido detectada exclusivamente no ar exterior do HJA. Contudo, este género bacteriano já foi detectado no pó interior de edifícios ocupados pelo ser humano, pelo que poderá eventualmente vir a ser encontrado no interior do HJA.

## 6 – CONCLUSÕES

A biodiversidade bacteriana aerossolizada no ar interior do Hospital Dr. João de Almada consiste na sua grande maioria em cocos gram positivos, principalmente do género *Staphylococcus*, sendo as espécies mais frequentes *S. cohnii urealyticus*, *S. haemolyticus*, *S. capitis* ou *S. caprae* e *Micrococcus luteus*. A biodiversidade bacteriana existente no ar interior do HJA é semelhante à registada noutros hospitais e outros tipos de edifícios com ocupação humana como apartamentos, restaurantes e centros comerciais.

Entre as espécies bacterianas detectadas no HJA não foi encontrada nenhuma associada a infecções nosocomiais registadas nesse mesmo ano pelo Serviço Regional de Saúde, mas as *Staphylococcus* coagulase negativas são geralmente associadas a este tipo de infecção (Brachman e Abrutyn, 2009), nas quais se incluem *S. haemolyticus*, que é frequentemente patogénica, e as patogénicas oportunistas *S. cohnii* e *S. capitis* ou *S. caprae*, sendo estas as espécies que apresentam maiores riscos para os ocupantes do HJA e a ter em maior consideração em monitorizações futuras.

A maioria das bactérias detectadas pertence à flora comensal humana, estando frequentemente presente na pele, enquanto uma minoria de bactérias são saprófitas de origem ambiental. Assim, os ocupantes do HJA constituem o principal foco de contaminação do ar interior por bactérias, sendo o ambiente exterior um foco de menor importância mas compreensível pela ventilação natural utilizada no edifício.

A biodiversidade bacteriana aerossolizada no ar interior do HJA foi caracterizada de uma forma não exaustiva, tendo sido identificada 8% a 16% de toda a diversidade bacteriana provavelmente existente segundo estimadores de biodiversidade com base nos dados de RFLP. No entanto, foi realizada a identificação das bactérias mais prevalentes e de algumas menos frequentes pela adequação da metodologia de trabalho para a identificação da maior diversidade possível.

A análise integrada de todos os resultados relativos à QAI permite concluir que o HJA apresenta uma qualidade do ar interior conforme a legislação nacional na maioria dos locais. Os desvios dos valores de referência constantes na legislação foram detectados em 12 das 72 (17%) amostragens de microorganismos aerossolizados e em 8 dos 15 (53%) locais amostrados, reportando-se unicamente à concentração de bactérias e de fungos no ar acima do máximo de referência de 500 UFC/m<sup>3</sup>, enquanto a temperatura, humidade relativa do ar e concentração de CO<sub>2</sub> e NO<sub>2</sub> estavam em níveis apropriados. Os casos de desvios aos valores de referência indicam má QAI e poderão ter consequências negativas nos ocupantes do HJA, nomeadamente

provocar febres, dores de cabeça, fadiga, dores musculares, efeitos irritantes nos olhos, nariz, garganta e pele (ADENE, 2008). O HJA apresentou concentrações médias de bactérias e fungos no ar interior superiores às registadas na maioria dos outros hospitais considerados para efeitos comparativos, indicando uma comparativamente pior QAI em termos microbiológicos.

As mais elevadas concentrações bacterianas foram detectadas nos corredores e salas enquanto as menores foram registadas nos quartos, o que atendendo ao perfil de ocupação humana por tipo de local evidencia que este deverá ser o factor condicionante da QAI, acontecendo o mesmo noutros hospitais. Esta associação foi comprovada pela correlação positiva significativa entre a concentração de bactérias no ar e o número de pessoas no local, grau de movimentação de pessoas no local e concentração de CO<sub>2</sub>, o qual é libertado pela respiração humana, bem como pelo facto da maioria das bactérias detectadas ser comensal de humanos.

As concentrações de fungos não exibiram um padrão claro e reconhecível como associado ao tipo de utilização de cada tipo de local, havendo uma potencial relação com a ocupação humana e utilização de água no local. A fonte mais provável dos fungos deverá ser o ambiente exterior que apresentou sempre maior concentração fúngica em dias comuns e marcadamente superior em dias com eventos de bruma.

Todos os excessos de fungos no ar interior foram relacionados com eventos de bruma no exterior, a qual contaminou o ar interior do HJA com fungos, enquanto os excessos de bactérias no ar interior foram relacionados com a forte presença e actividade humana nesses locais em conjugação com factores adjuvantes para uma reduzida QAI, como a fraca ventilação, a presença de carros de transporte de material de limpeza com roupa suja e resíduos, manipulação de resíduos, a mudança de roupa de cama e a limpeza do quarto ainda por realizar.

A maior similaridade na composição bacteriana aerossolizada entre divisões com o mesmo tipo de utilização do que entre divisões próximas especialmente no HJA permite concluir que não existe um padrão de dispersão de bactérias no edifício do HJA nem focos localizados de contaminação bacteriana do ar para além da presença humana ou eventos pontuais já mencionados, sendo o tipo de uso dado a cada local, e consequentemente o perfil de ocupação humana, o factor determinante da composição da flora bacteriana presente no ar em cada local. A baixa partilha de bactérias com o mesmo perfil de RFLP entre locais indica a existência de uma baixa contaminação cruzada, não obstante serem necessários mais dados para chegar a uma conclusão fidedigna.

O ar interior do HJA apresenta uma maior concentração bacteriana e uma menor concentração fúngica comparativamente ao ar exterior, tal como acontece noutros hospitais e

tipos de edifícios, mas no caso do HJA a proporção de bactérias no ar interior comparativamente ao exterior é superior evidenciando uma pior QAI. A maior concentração de bactérias no ar interior indica que os focos de origem de bactérias deverão estar localizados no interior do edifício, enquanto o oposto ocorre relativamente aos fungos.

Existe uma baixa partilha de bactérias entre o ar interior e exterior, a qual ocorre maioritariamente nos taxa mais prevalentes no interior, o que poderá ser resultado da ventilação natural do HJA levar bactérias do interior para o exterior. As diferenças entre as comunidades bacterianas detectadas em cada ambiente deverão estar relacionadas com a forte ocupação humana do espaço interior em comparação com o exterior. As poucas bactérias de origem ambiental detectadas no ar interior do HJA deverão ter tido origem no exterior e entrado devido utilização de ventilação natural. A baixa partilha de bactérias entre os ambientes interior e exterior, aliada à grande diferença na concentração de microorganismos no ar indicia uma relativamente baixa ventilação do HJA, uma vez que a ventilação não é filtrada.

O ar exterior apresenta uma boa qualidade e poderá ser utilizado para a ventilação natural do interior do HJA por apresentar concentrações de microorganismos no ar abaixo dos máximos de referência. A excepção a esta regra ocorre durante eventos de bruma, também conhecidos como “tempo de leste”, durante os quais existem muitos fungos no ar, os quais contaminaram o interior do HJA de forma gradual e originaram as únicas medições de fungos no ar interior em excesso do máximo de referência. As brumas já tinham sido descritas anteriormente como transportadoras de grande quantidade de partículas, fungos e bactérias em suspensão, causando efeitos indesejáveis nos seres humanos (Polymenakou *et al*, 2008; Shinn *et al*, 2003).

#### **Medidas correctivas propostas**

Para fazer face aos problemas relacionados com a QAI detectados no HJA, propõem-se como medidas correctivas uma maior ventilação dos locais onde foram registadas as maiores concentrações médias de bactérias no ar, o corredor do piso 3 e sala de estar modificada para quarto do piso 2, e no caso desta medida ser ainda insuficiente, deverá haver uma menor ocupação humana destes locais. A ventilação do HJA poderá ser realizada de forma natural como o tem sido até agora, com ar proveniente do exterior a entrar directamente pelas janelas, uma vez que este ar tem boa qualidade e desde que não esteja a decorrer um evento de bruma ou existam fontes anormais de microorganismos nas proximidades.

Em todo o HJA deverá ser realizada ventilação dos locais em que exista uma grande aglomeração ou actividade humana, deverá ser reduzido o tempo de permanência dos carros

de transporte de material de limpeza nas áreas públicas ao mínimo indispensável, deverão ser tidos cuidados na manipulação de resíduos para evitar aerossolização de microorganismos e por fim, durante a mudança da roupa de cama deverão aumentar a ventilação ou evitar a permanência de pacientes no local.

Relativamente às espécies patogênicas frequentes e oportunistas, *S. haemolyticus*, *S. cohnii* e *S. capitis* ou *S. caprae*, por apresentarem maiores riscos para os ocupantes do HJA do que as restantes bactérias identificadas no ar interior, especialmente para os pacientes devido à sua menor defesa imunitária, deverão ser tidas em consideração como a provável origem infecciosa de doenças em pacientes, devendo ser monitorizadas futuramente.

### **Considerações acerca das técnicas moleculares aplicadas neste trabalho**

A metodologia adoptada na preparação do DNA para utilização em PCR revelou-se suficiente para a amplificação do gene 16S rRNA em 66% dos casos e praticamente todas as amplificações obtidas correram bem logo à primeira tentativa. Isto revela que a metodologia de preparação não é totalmente eficaz e poderá ser restrita a determinado grupo de bactérias, o que poderá ter enviesado os dados obtidos. A suspeita recaiu sobre a composição da parede celular bacteriana, tendo as bactérias gram positivas teoricamente maior resistência ao método por terem uma parede mais espessa, mas a percentagem de bactérias gram positivas e negativas cuja amplificação foi obtida foi semelhante.

A técnica de RFLP utilizada com recurso a 2 enzimas de restrição permitiu um elevado grau de diferenciação das bactérias, sendo inclusive detectadas linhagens geneticamente diferentes da mesma subespécie e espécie, nas quais apenas 1 dos padrões era distinto. A dissimilaridade entre estas sequências variou entre 0 e 1 bases diferentes em cerca de 600 bases sequenciadas do total de cerca de 1500pb do gene 16S rRNA.

A grande resolução da técnica de RFLP utilizada revela-se demasiado sensível para a descrição de biodiversidade quando se pretende apenas saber as espécies existentes, mas revela-se útil quando se pretende analisar a disseminação de bactérias entre locais. A técnica utilizada permitiu também agrupar bactérias por similaridade genética, sendo sequenciada apenas uma amostra por grupo, permitindo uma poupança de custos relacionados com sequenciações.

A sequenciação parcial do gene 16S rRNA revelou-se suficiente para a identificação inequívoca da maioria das bactérias, revelando uma poupança de custos comparativamente à sequenciação total do gene, sendo esta última indicada apenas nos casos cuja diferenciação entre taxa não seja possível apenas com a sequência parcial.

A globalidade da metodologia utilizada neste trabalho permitiu um elevado grau de precisão na identificação bacteriana, permitindo identificações fidedignas até à subespécie e inclusive linhagens distintas dentro da mesma espécie e subespécie. As dificuldades na identificação cabal das amostras tiveram origem em factores como a má qualidade da sequência obtida, falta de diferenciação genética na sequência do gene 16S rRNA entre taxa muito próximos filogeneticamente, ou falta de espécies descritas que fossem filogeneticamente próximas da amostra para permitir identificação. Estes problemas poderiam ser resolvidos, respectivamente, pela repetição da sequenciação da amostra, pela sequenciação do resto do gene 16S rRNA ou outros genes, e pela descrição de novas espécies. Independentemente destas vicissitudes, a sequenciação permite uma identificação bacteriana com uma precisão incomparável, desde que a sequência seja de boa qualidade e as bases de dados utilizadas tenham dados fidedignos e abrangentes o suficiente.

Entre as bases de dados utilizadas neste trabalho, a BIBI foi a mais indicada para a identificação bacteriana fiável e com maior precisão, servindo a RDP, GenBank e EMBL de suporte complementar na identificação atribuída às amostras. Na identificação dos locais de existência de bactérias com sequências homólogas às amostras, a base de dados EMBL é deveras indicada por apresentar as informações associadas a cada sequência de forma imediata e simplificada comparativamente às outras bases de dados.

Este trabalho permitiu descrever a diversidade bacteriana presente no ar interior do HJA, identificando as bactérias mais frequentes no ar, sendo muitas delas já conhecidas noutros hospitais e edifícios, e também identificou espécies mais raras e inesperadas, cuja presença geralmente passa despercebida quando se utilizam métodos tradicionais e não dirigidos à detecção dessas espécies. A identificação de bactérias no ar poderia ter sido mais exhaustiva mas os elevados custos das técnicas moleculares associados a um orçamento limitado, levaram à contenção de meios para atingir os objectivos, como por exemplo a não utilização de kits de extracção de DNA bacteriano e utilização de técnica de RFLP para diminuir o número de amostras a serem sequenciadas.

Por fim, para além do elevado grau de precisão disponibilizado pelas técnicas utilizadas, é de grande relevo o modernismo deste tipo de estudo, com algumas das espécies bacterianas a só recentemente terem sido descritas, e pelo facto de outras fontes de colheita de bactérias iguais terem sido conhecidas maioritariamente pela existência de trabalhos semelhantes muito recentes e publicados em revistas de elevado prestígio internacional.

Deveria ser implementada uma política de rastreios permanentes da QAI em ambiente hospitalar para salvaguarda da saúde pública, especialmente dos pacientes por muitos deles apresentarem um sistema imunitário debilitado ou serem sujeitos a intervenções invasivas que permitem uma contaminação facilitada do corpo humano pelos microorganismos presentes no ar, levando ao incremento da frequência de infecções nosocomiais.

Em Portugal deveria ser implementada legislação específica para ambiente hospitalar, a par da que já existe noutros países, uma vez que a actual é genérica para edifícios e a concentração máxima de referência para microorganismos no ar é demasiado permissiva para determinados locais no interior de hospitais, especialmente para as salas de cirurgia e locais de internamento de pacientes com sistema imunitário debilitado.

A obrigatoriedade de identificação das bactérias presentes no ar também deveria ser implementada na legislação nacional, pois os riscos para a saúde humana são muito variáveis consoante as espécies em questão e a legislação actual considera todas as bactérias com o mesmo risco ao limitar unicamente a concentração de bactérias totais presentes no ar. A quantificação selectiva de espécies patogénicas com recurso a meios de cultura selectivos ou técnicas moleculares dirigidas a essas espécies poderiam ser uma alternativa mais simples e menos dispendiosa à identificação de todas as bactérias presentes no ar.

Outra área com importância clínica e de saúde pública que deveria ser estudada futuramente em Portugal é a da resistência bacteriana a antibióticos no ambiente hospitalar. Existem evidências do aumento deste fenómeno a nível mundial, devendo ser estudado para permitir uma adequação da terapêutica antimicrobiana prescrita.

A utilização de técnicas moleculares na identificação bacteriana revela muitas vantagens, especialmente a elevada precisão, devendo substituir cada vez mais as técnicas tradicionais no futuro próximo. Estudos recentes têm utilizado técnicas moleculares na identificação e comparação de comunidades de bactérias de vários ambientes e a tendência futura é que estes tipos de estudos alarguem os horizontes para outros ambientes que tradicionalmente não são amostrados, como animais domésticos, utensílios alimentares e superfícies, entre inúmeras possibilidades.

As técnicas moleculares terão também cada vez mais importância na classificação taxonómica de bactérias, havendo ainda espécies novas por descrever mas cuja existência já foi detectada pela existência de sequências de DNA distintas das de espécies conhecidas, e nos estudos filogenéticos, permitindo inferir com elevado rigor a relação entre os taxa. Vários

grupos bacterianos já descritos deveriam ser reavaliados com estas novas técnicas para permitir a correcção das classificações taxonómicas mal aplicadas.

As técnicas moleculares aplicadas na detecção de bactérias serão cada vez mais utilizadas por não serem tão limitadas como as técnicas tradicionais, possibilitando por exemplo uma rápida detecção de contaminação ambiental, o rastreio de estirpes ou linhagens únicas para pesquisa epidemiológica de rotas de contaminação, rápida e precisa identificação de amostras clínicas permitindo uma célere aplicação de terapêutica adequada à espécie em questão e respectiva resistência a antibióticos, e a detecção e identificação de bactérias de cultivo difícil ou impossível.

## APÊNDICES


Sua Referência	Sua Comunicação	Nossa Referência	Serviço de Saúde da RAM, E.P.E.
			<b>SAÍDA</b> S.0910022 / 5 2009/08/10
 <b>Região Autónoma da Madeira</b> Serviço de Saúde da Região Autónoma da Madeira, E.P.E.			
[ Exma. Senhora Dr.ª Irene Gomes Câmara Camacho Departamento Biologia Universidade da Madeira Campus da Penteadá 9000-390 Funchal ]			
<p><b>ASSUNTO: TRABALHOS DE TESES DE Mestrado “DETECÇÃO DE BIOAERROSSÓIS EM AMBIENTE HOSPITALAR”</b></p> <p>Em resposta ao solicitado no V/ ofício, datado de 2009.06.04, relativamente ao assunto mencionado em epígrafe, informo V. Exa.. que o mesmo foi autorizado, por despacho do Conselho de Administração, de 2009.07.27.</p> <p>Com os melhores cumprimentos,</p> <p style="text-align: center;">O Presidente do Conselho de Administração</p> <p style="text-align: center;">             (António Almada Cardoso)         </p> <p style="text-align: center; font-size: small;">Avenida Luís de Camões 57 – 9004-514 Funchal - ☎291 700 - Fax 291 709600 - e-mail : cadmin@srs.pt</p>			

Figura 1 - Autorização do Conselho de Administração da SESARAM para a realização dos trabalhos da tese de mestrado.



Para: Exmo. Presidente do Conselho de  
Administração  
Dr. António Almada Cardoso  
Serviço de Saúde da R.A.M., E.P.E.  
Avenida Luís de Camões, nº 57-904-514  
Funchal

Funchal, 04 de Junho de 2009.

*Assunto: Tema de Tese de Mestrado*

Caro Dr.,

No âmbito do projecto “DETECÇÃO DE BIOAERROSSÓIS EM AMBIENTE HOSPITALAR” a decorrer neste momento no Hospital Dr. João de Almada, sob a orientação da colega Irene Câmara Camacho, venho por este meio solicitar autorização para o desenvolvimento de um tema de tese do Mestrado em Biodiversidade e Conservação da Universidade da Madeira. O tema intitula-se: “Detecção de bactérias no ar ambiente hospitalar com recurso a técnicas moleculares”. Esse trabalho será uma continuação e um complemento do actual projecto, uma vez que para além da caracterização bioquímica dos bioaerrossóis presentes no ar ambiente, far-se-á uma identificação molecular das estirpes bacterianas aí presentes, nomeadamente as implicadas nas infecções nosocomiais. O tema será desenvolvido pelo mestrando Roberto Camacho, cujo CV está anexado a esta proposta.

Tal como foi reiterado pela colega Irene, uma das nossas funções enquanto docentes é orientar trabalhos de estágio e prestar formação avançada, desde que se traduzam em temas de superior interesse para a Universidade da Madeira e para a comunidade onde ela se insere.

Os objectivos da proposta seguem em anexo, bem como a respectiva calendarização. À semelhança do projecto "DETECÇÃO DE BIOAERROSSÓIS EM AMBIENTE HOSPITALAR" a decorrer de momento, não haverá quaisquer encargos para o hospital Dr. João de Almada.

Sublinho a utilidade e a aplicabilidade deste tipo de estudos no que concerne ao conhecimento da qualidade do ar interior hospitalar, e em última análise no controle das infecções nosocomiais, sempre numa perspectiva preventiva.

Deixo à vossa consideração esta proposta, podendo contar da nossa parte com o máximo de discrição, *Know-how* e cooperação no desenvolvimento destes trabalhos, que no fundo são úteis e pertinentes para todos nós.

Agradeço a atenção dispensada,

Com os melhores cumprimentos,



Mahnaz Khadem

Professor Auxiliar do Departamento de Biologia

Universidade da Madeira

Campus da Penteada, 9000-390 Funchal

Figura 2 – Ofício da UMA a solicitar a autorização ao Conselho de Administração da SESARAM para a realização dos trabalhos da tese de mestrado. (Ofício de 2009.06.04 mencionado no documento anterior).

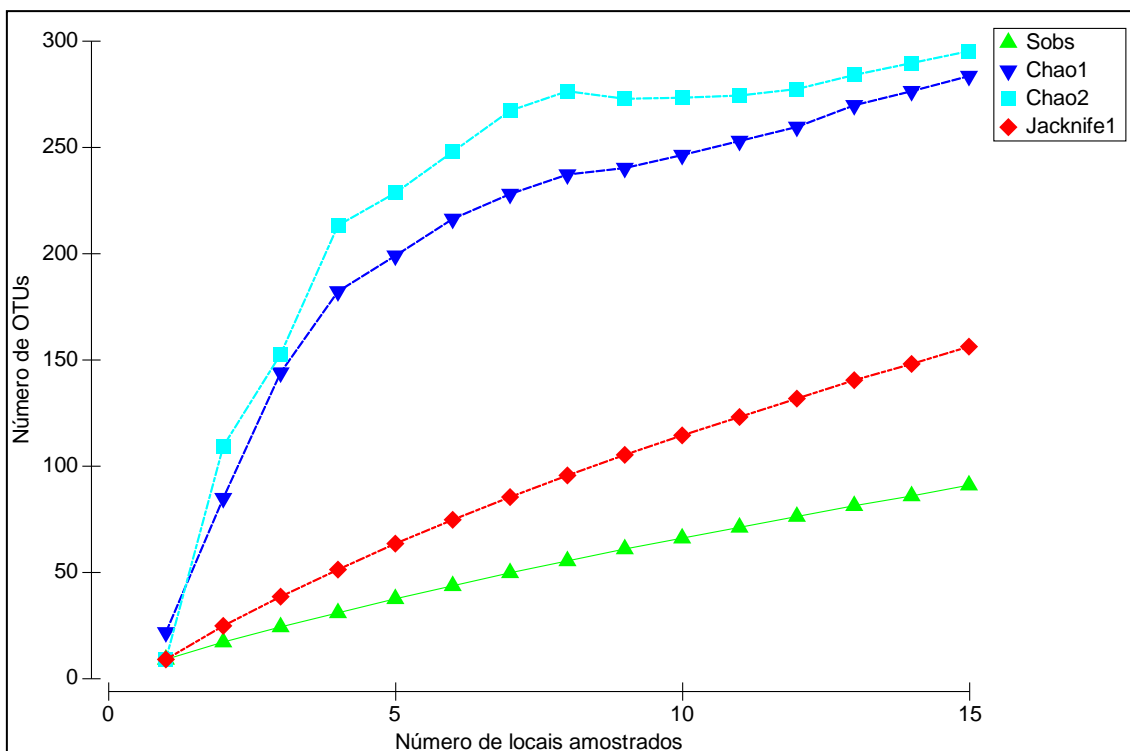


Figura 3 – Gráfico de acumulação de OTU por esforço de amostragem, com estimadores de diversidade biológica. São graficados o número de OTU de bactérias no ar interior do HJA pelo número de locais amostrados, com estimativas do número de OTU presentes. Sobs – dados observados neste trabalho; Chao1 – Estimador de *Chao* baseado no número de espécies raras; Chao2 - Estimador de *Chao* baseado nos dados de presença/ausência; Jacknife 1 – Estimador de *Jacknife* baseado em OTU que apenas aparecem em 1 amostra.

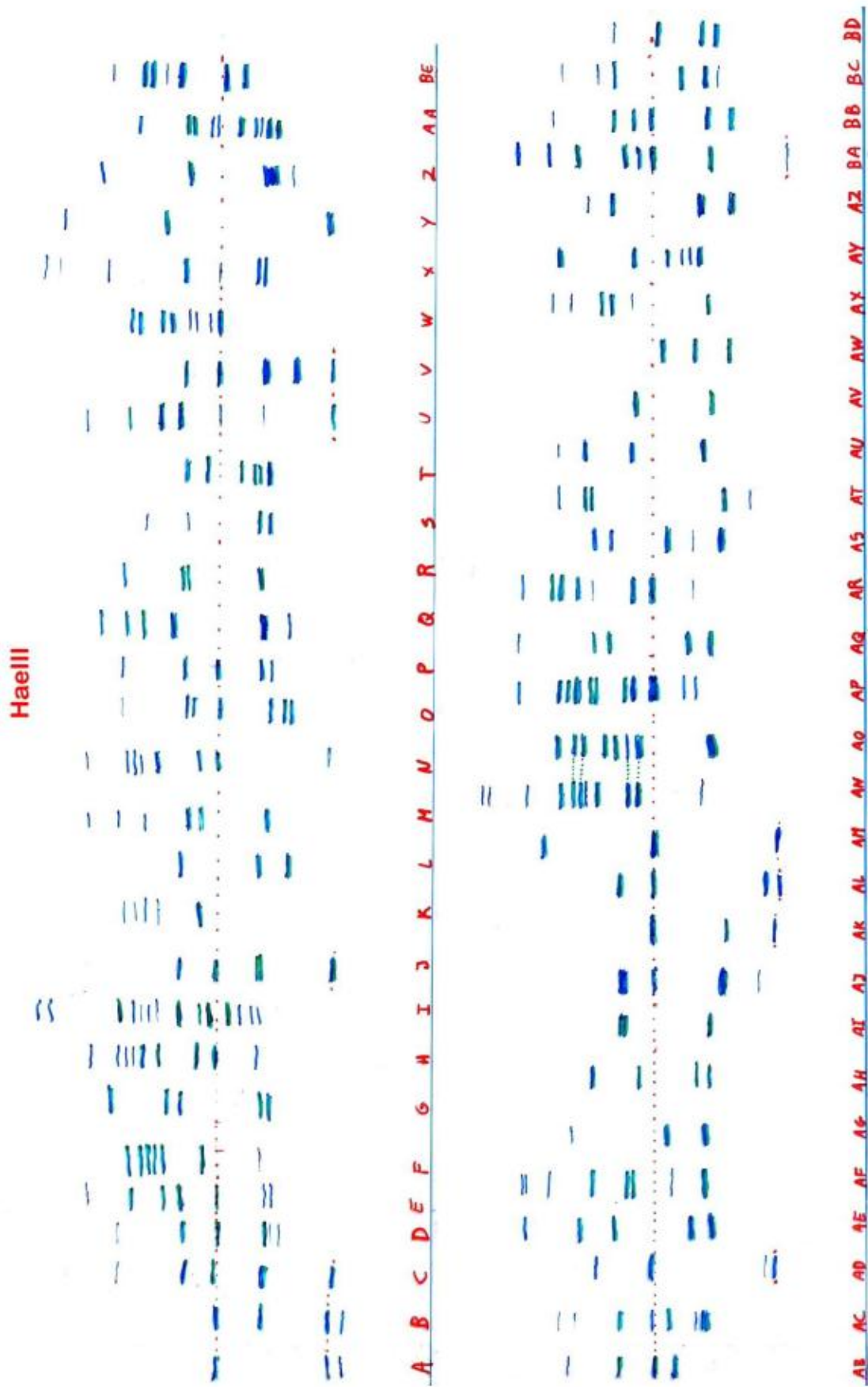


Figura 4 – Padrões de RFLP para digestão enzimática do gene 16S rRNA com enzima de restrição *HaeIII*. O padrão "A" corresponde ao corte de *Staphylococcus cohnii urealyticus*.

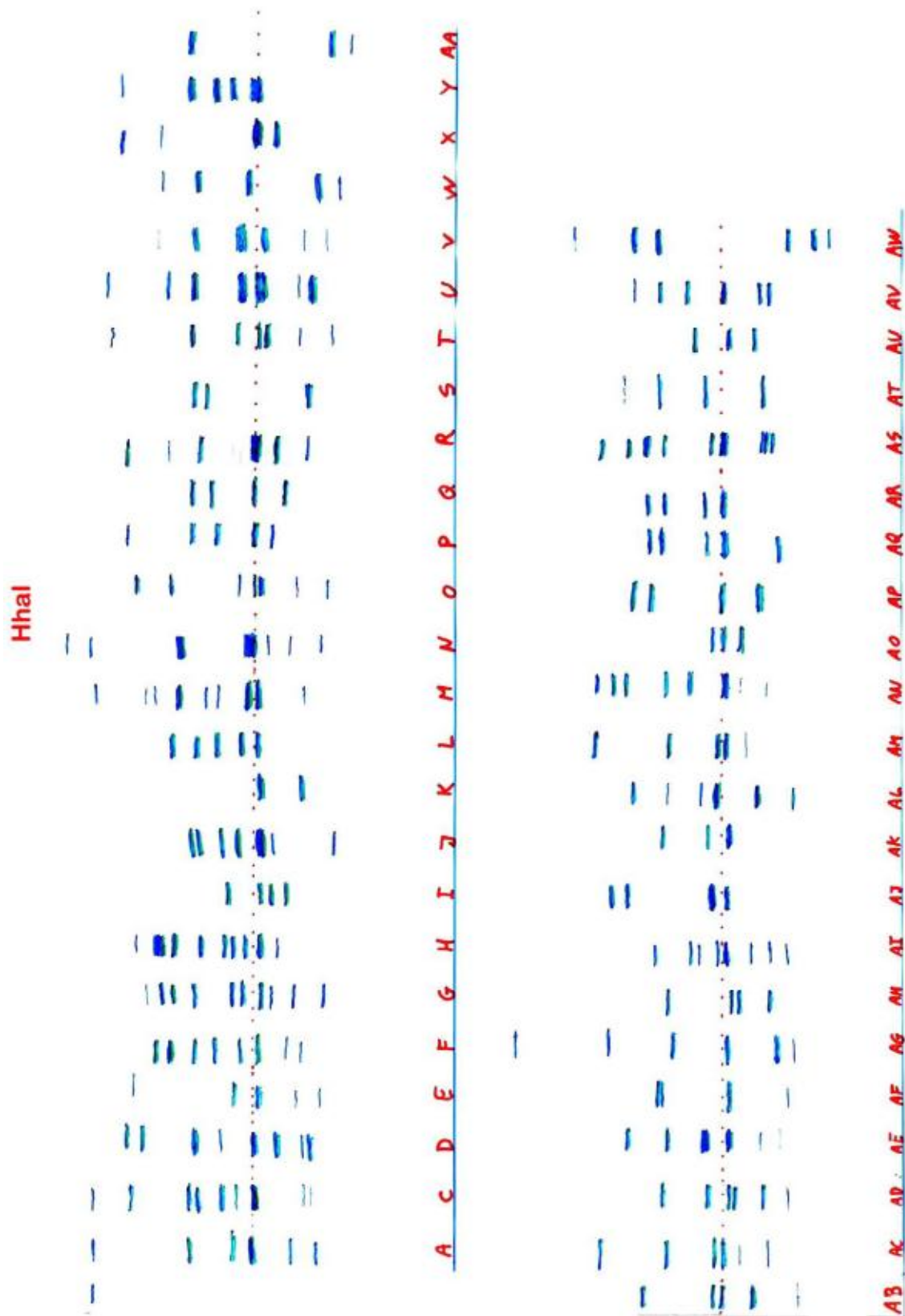


Figura 5 – Padrões de RFLP para digestão enzimática do gene 16S rRNA com enzima de restrição *HhaI*. O padrão “A” corresponde ao corte de *Staphylococcus cohnii urealyticus*.

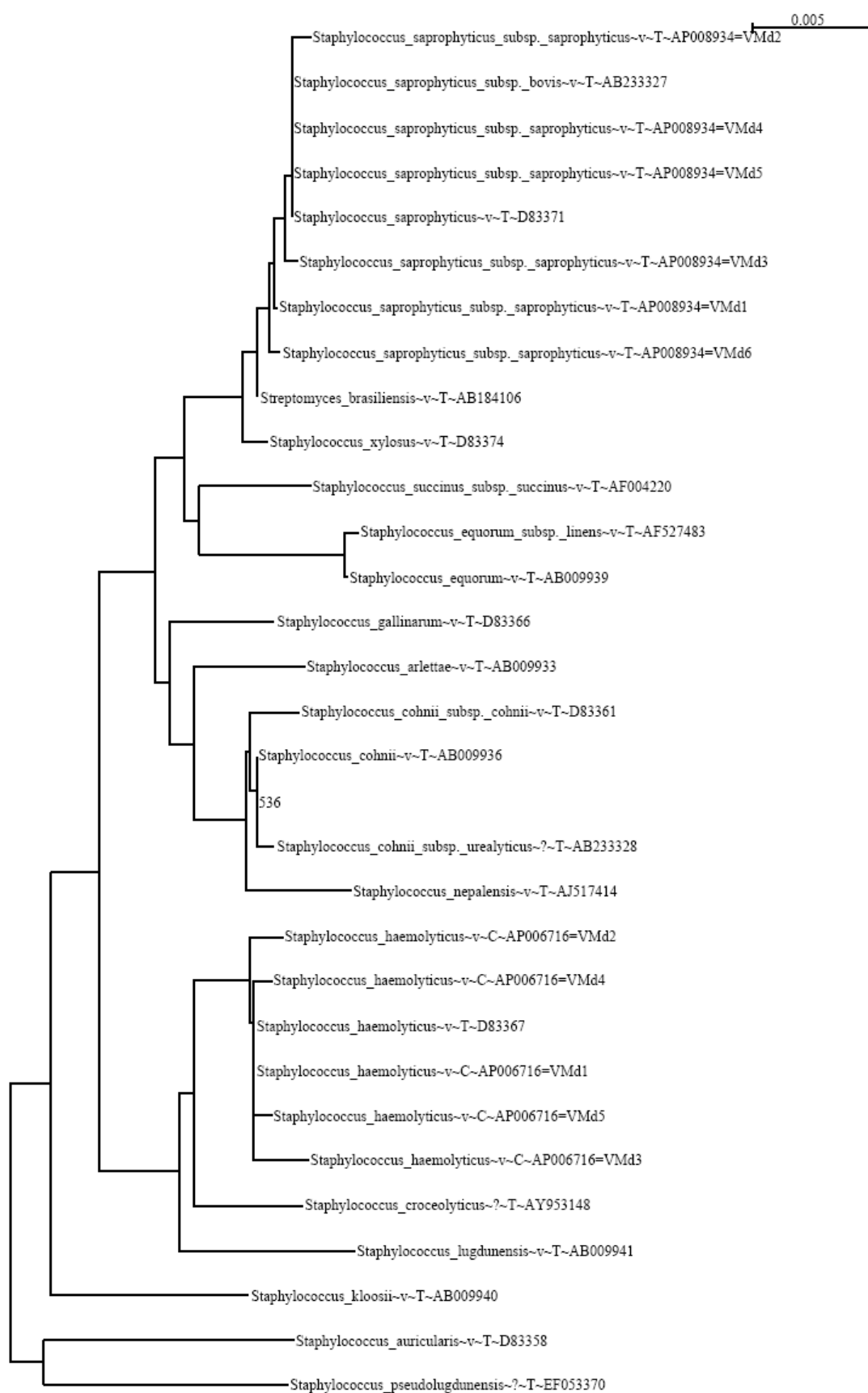


Figura 6 – Árvore filogenética gerada pela base de dados BIBI, com amostra da placa número 9, colônia número 65 (designada como 536 na figura) e estirpes tipo de espécies de bactérias próximas. Espécies identificadas com indicação de: nome válido (v), nome ainda não presente na base de dados nomenclatural (?), estirpe tipo (T), espécie com genoma completamente sequenciado (C), e número de acesso no *GenBank*.

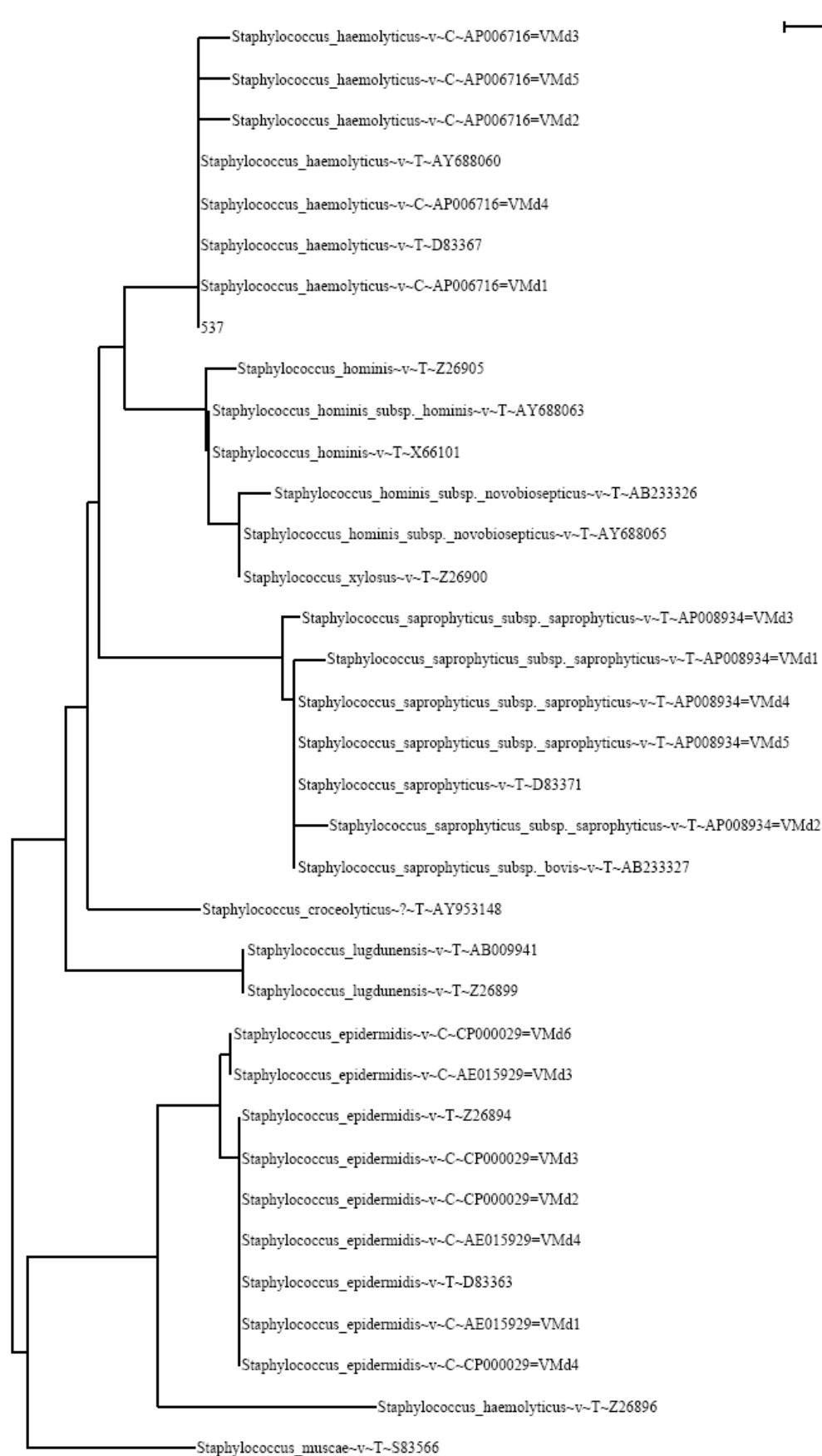


Figura 7 – Árvore filogenética gerada pela base de dados BIBI, com amostra da placa número 21, colônia número 53 (designada como 537 na figura) e estirpes tipo de espécies de bactérias próximas. Espécies identificadas com indicação de: nome válido (v), nome ainda não presente na base de dados nomenclatural (?), estirpe tipo (T), espécie com genoma completamente sequenciado (C), e número de acesso no *GenBank*.

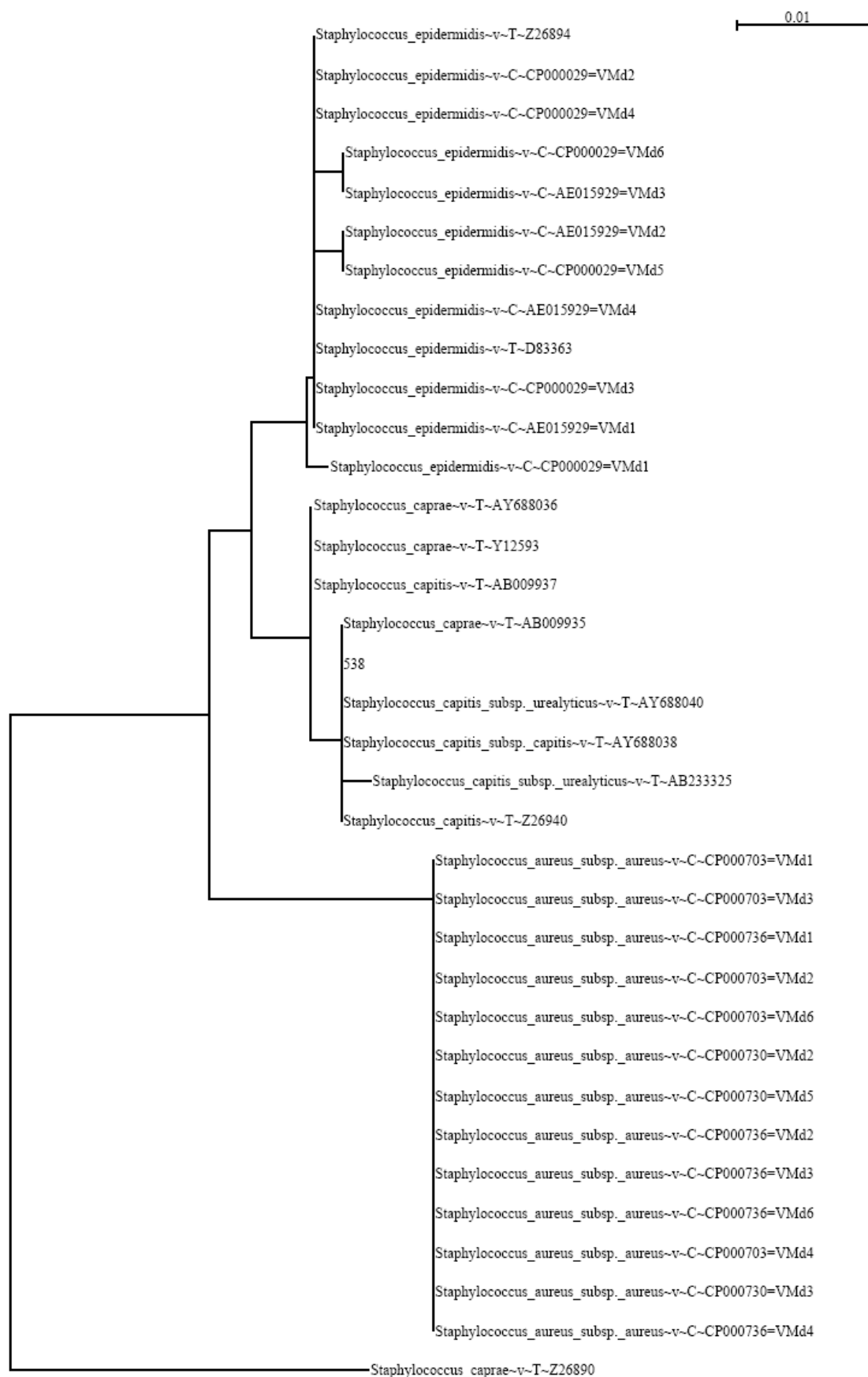


Figura 8 – Árvore filogenética gerada pela base de dados BIBI, com amostra da placa número 15, colônia número 51 (designada como 538 na figura) e estirpes tipo de espécies de bactérias próximas. Espécies identificadas com indicação de: nome válido (v), nome ainda não presente na base de dados nomenclatural (?), estirpe tipo (T), espécie com genoma completamente sequenciado (C), e número de acesso no *GenBank*.

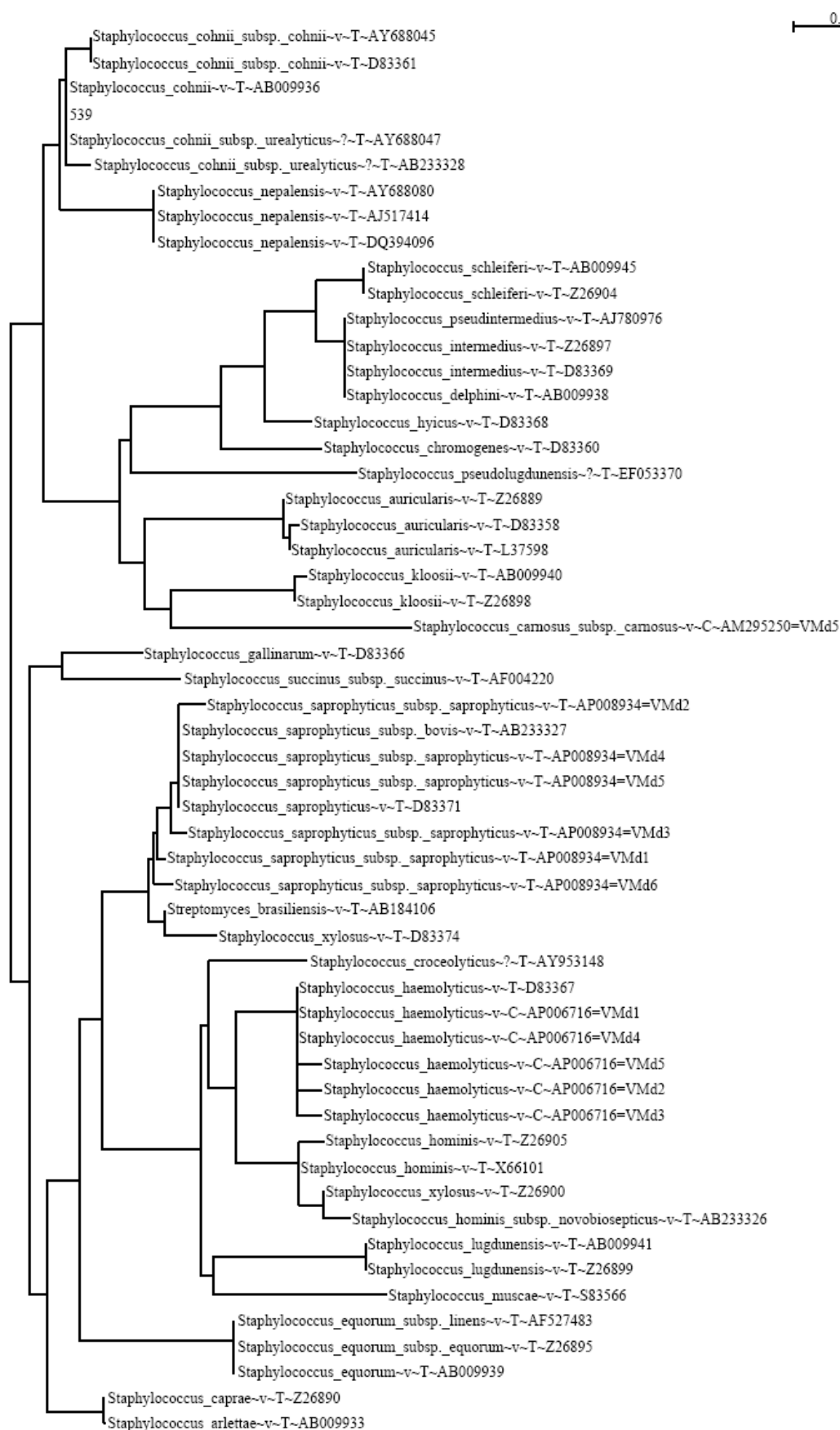


Figura 9 – Árvore filogenética gerada pela base de dados BIBI, com amostra da placa número 3, colônia número 3 (designada como 539 na figura) e estirpes tipo de espécies de bactérias próximas. Espécies identificadas com indicação de: nome válido (v), nome ainda não presente na base de dados nomenclatural (?), estirpe tipo (T), espécie com genoma completamente sequenciado (C), e número de acesso no *GenBank*.

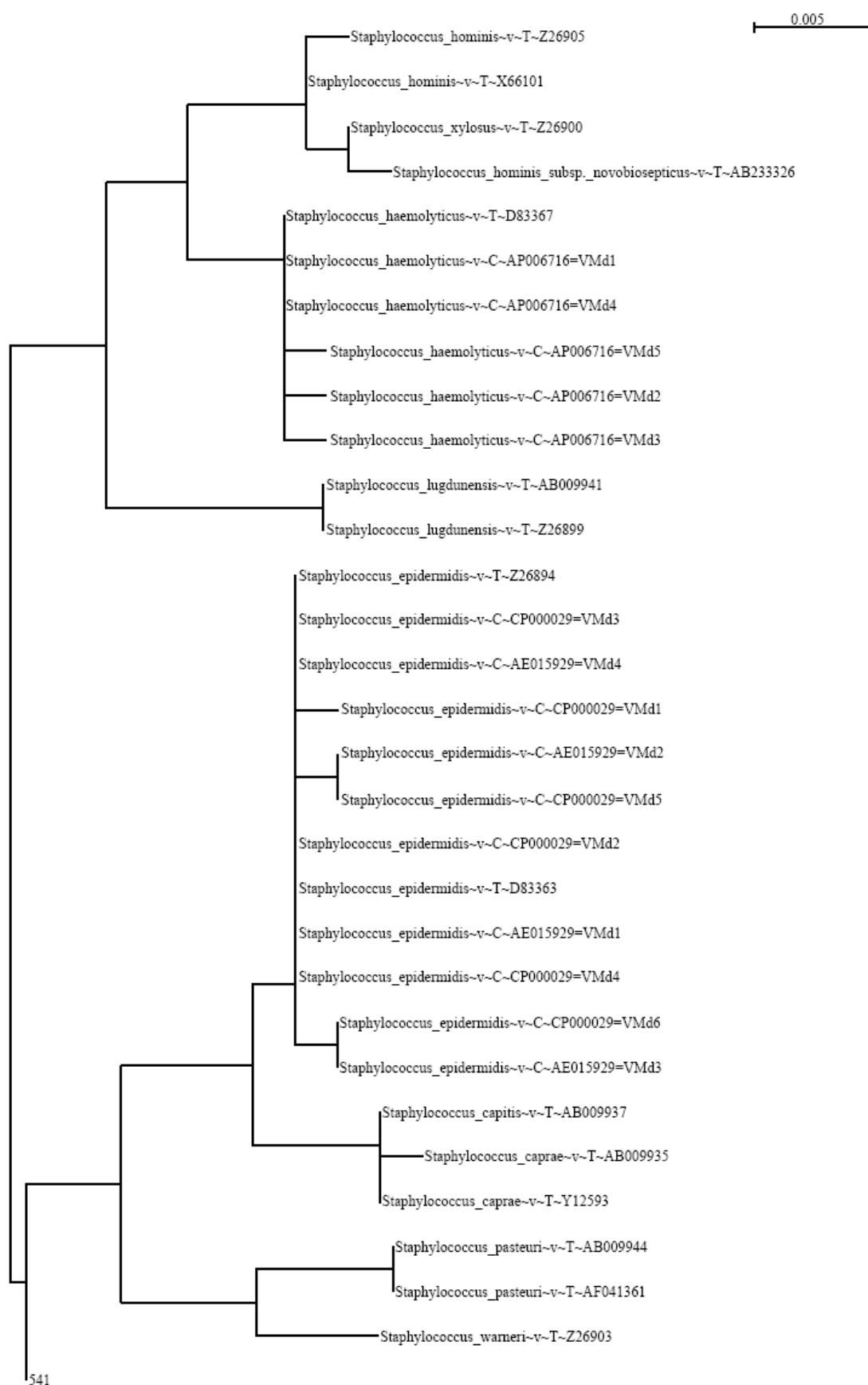


Figura 10 – Árvore filogenética gerada pela base de dados BIBI, com amostra da placa número 37, colônia número 32 (designada como 541 na figura) e estirpes tipo de espécies de bactérias próximas. Espécies identificadas com indicação de: nome válido (v), nome ainda não presente na base de dados nomenclatural (?), estirpe tipo (T), espécie com genoma completamente sequenciado (C), e número de acesso no *GenBank*.

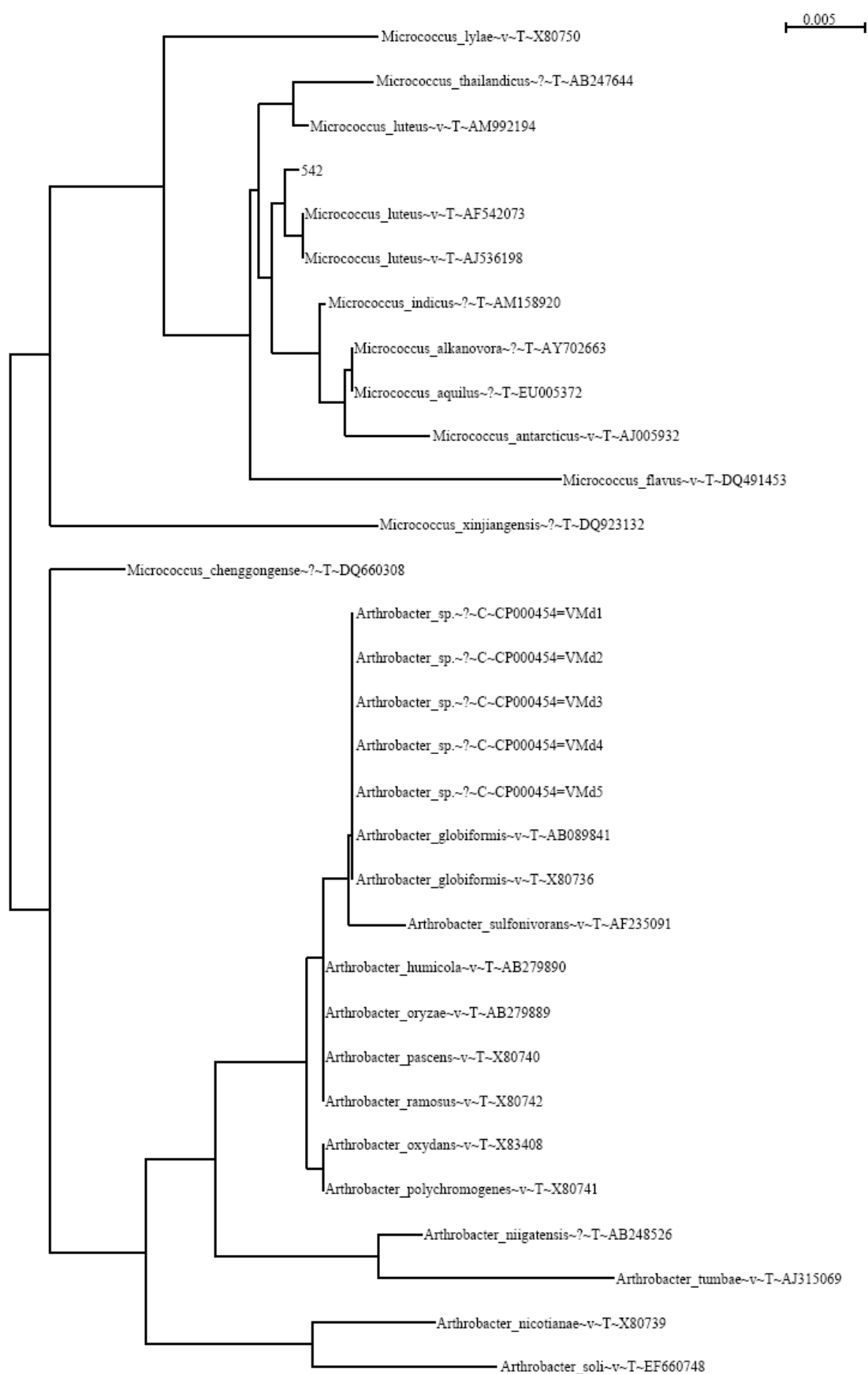


Figura 11 – Árvore filogenética gerada pela base de dados BIBI, com amostra da placa número 3, colônia número 45 (designada como 542 na figura) e estirpes tipo de espécies de bactérias próximas. Espécies identificadas com indicação de: nome válido (v), nome ainda não presente na base de dados nomenclatural (?), estirpe tipo (T), espécie com genoma completamente sequenciado (C), e número de acesso no *GenBank*.

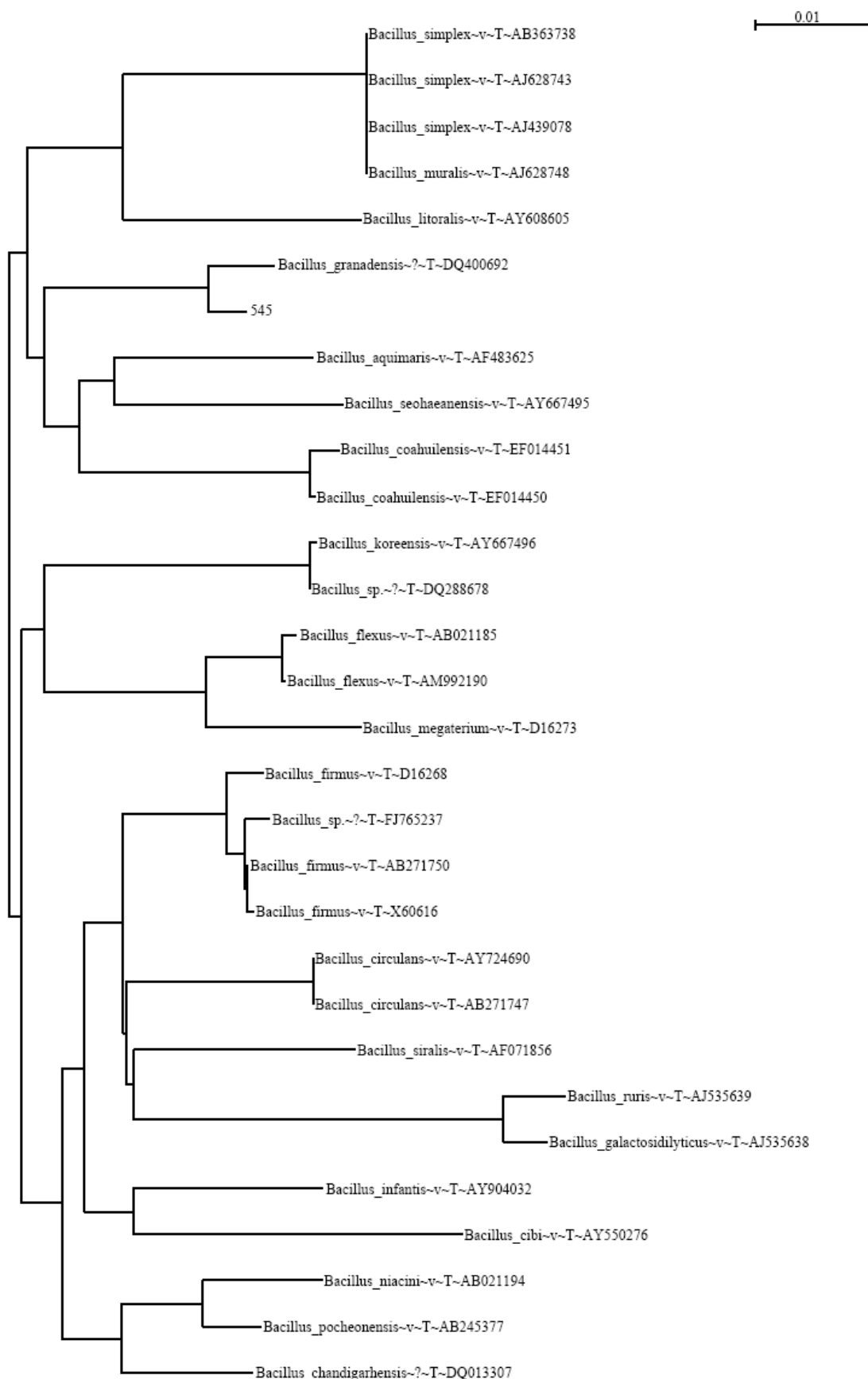


Figura 12 – Árvore filogenética gerada pela base de dados BIBI, com amostra da placa número 29, colônia número 45 (designada como 545 na figura) e estirpes tipo de espécies de bactérias próximas. Espécies identificadas com indicação de: nome válido (v), nome ainda não presente na base de dados nomenclatural (?), estirpe tipo (T), espécie com genoma completamente sequenciado (C), e número de acesso no *GenBank*.

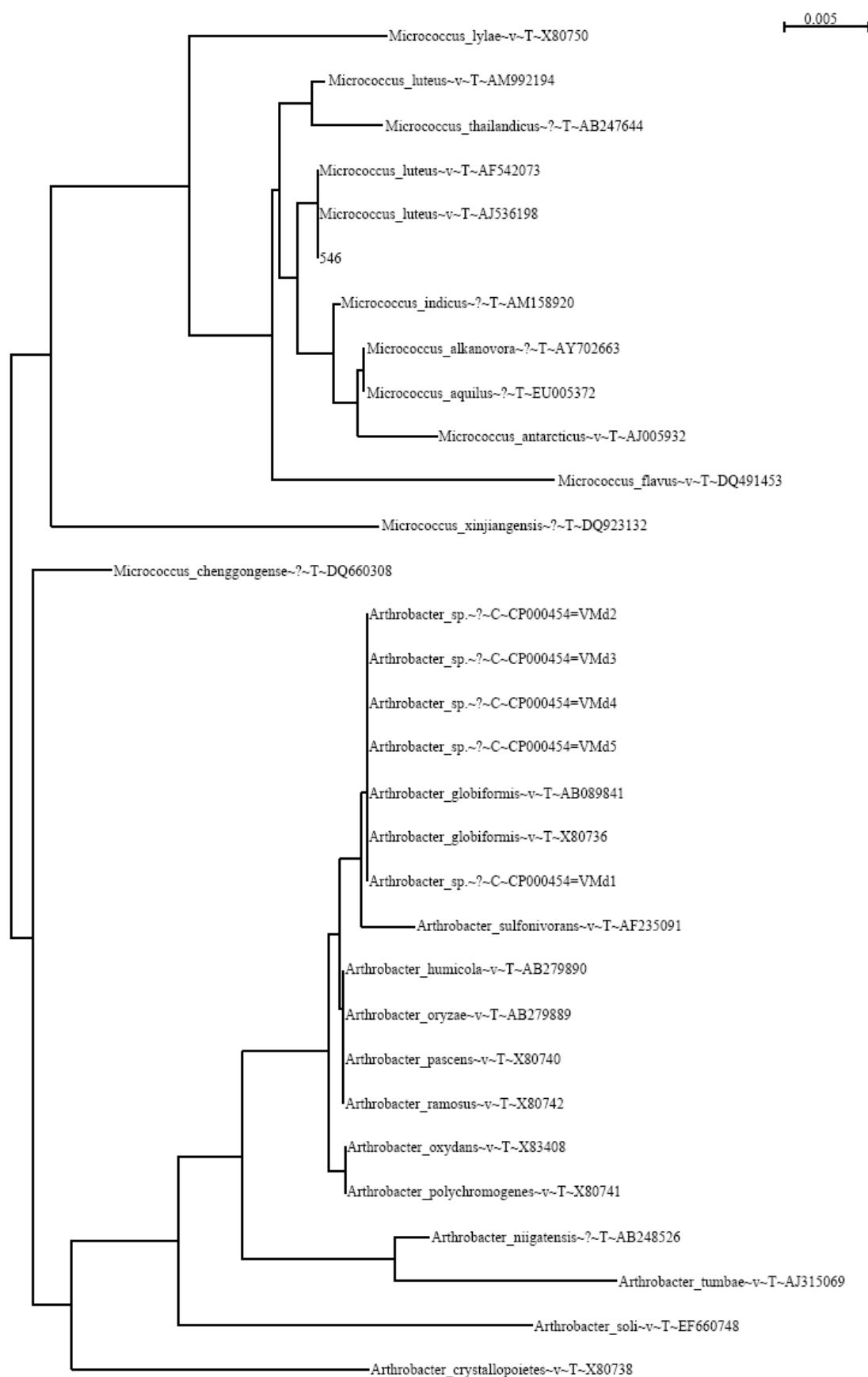


Figura 13 – Árvore filogenética gerada pela base de dados BIBI, com amostra da placa número 31, colônia número 60 (designada como 546 na figura) e estirpes tipo de espécies de bactérias próximas. Espécies identificadas com indicação de: nome válido (v), nome ainda não presente na base de dados nomenclatural (?), estirpe tipo (T), espécie com genoma completamente sequenciado (C), e número de acesso no *GenBank*.

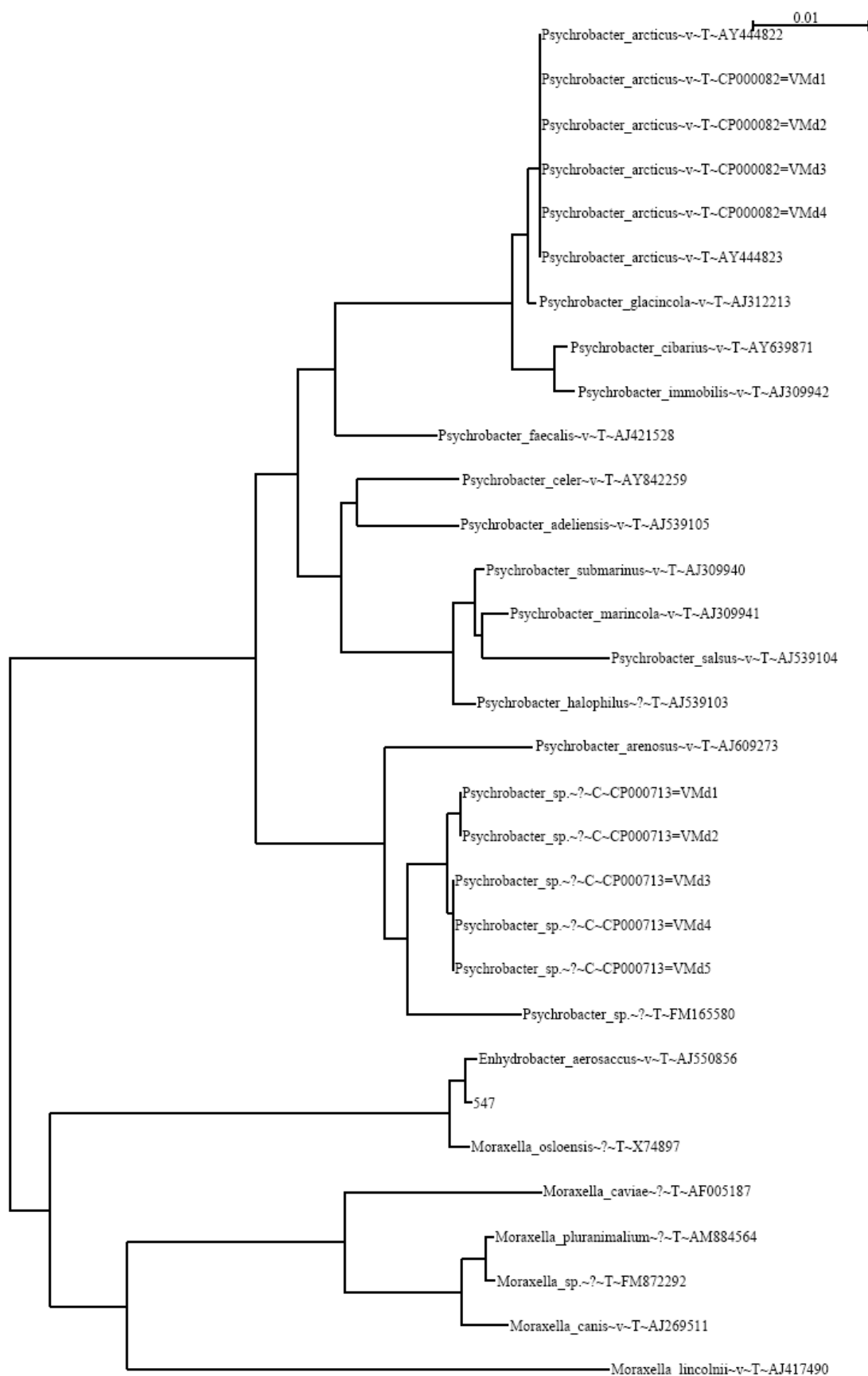


Figura 14 – Árvore filogenética gerada pela base de dados BIBI, com amostra da placa número 9, colônia número 40 (designada como 547 na figura) e estirpes tipo de espécies de bactérias próximas. Espécies identificadas com indicação de: nome válido (v), nome ainda não presente na base de dados nomenclatural (?), estirpe tipo (T), espécie com genoma completamente sequenciado (C), e número de acesso no *GenBank*.

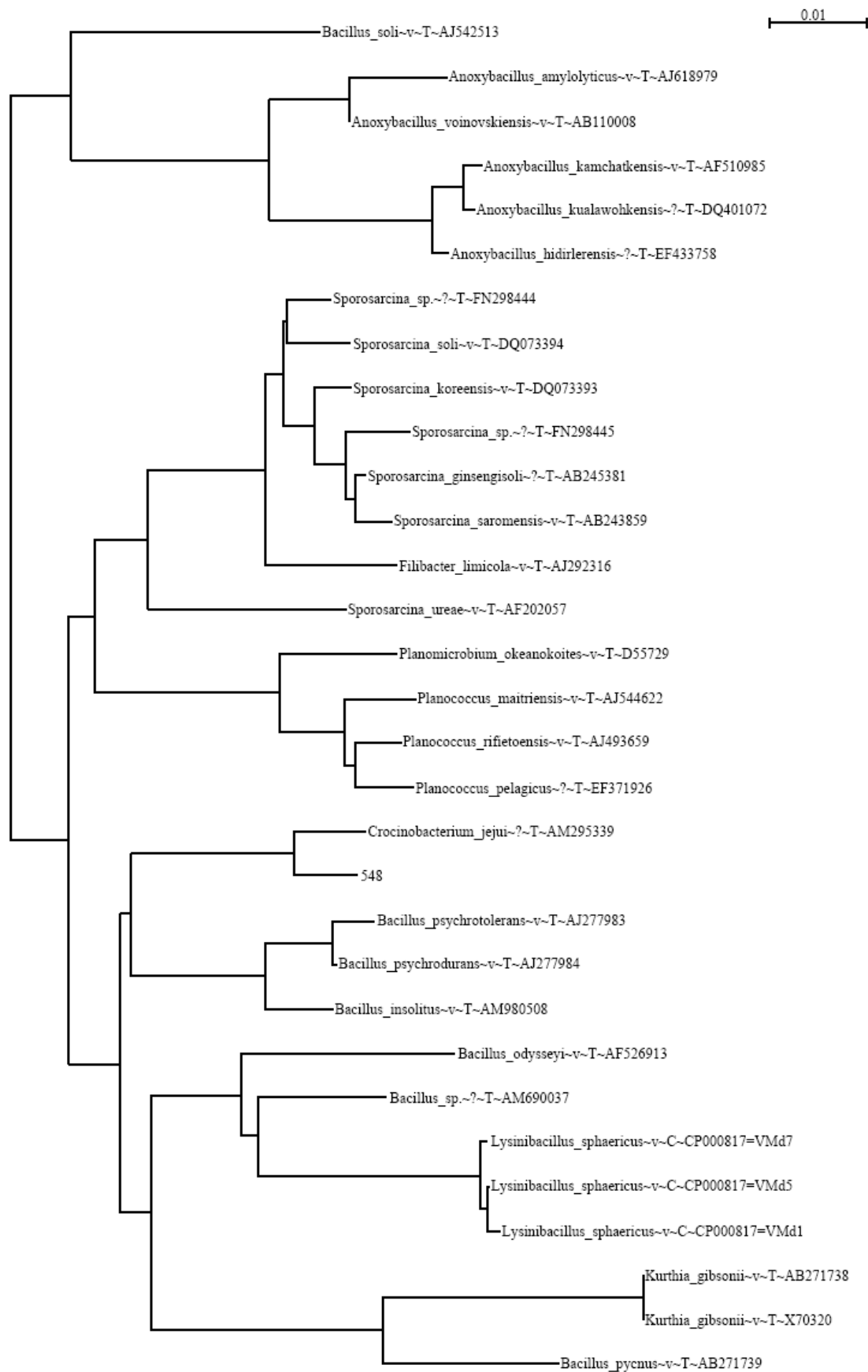


Figura 15 – Árvore filogenética gerada pela base de dados BIBI, com amostra da placa número 30, colônia número 11 (designada como 548 na figura) e estirpes tipo de espécies de bactérias próximas. Espécies identificadas com indicação de: nome válido (v), nome ainda não presente na base de dados nomenclatural (?), estirpe tipo (T), espécie com genoma completamente sequenciado (C), e número de acesso no *GenBank*.

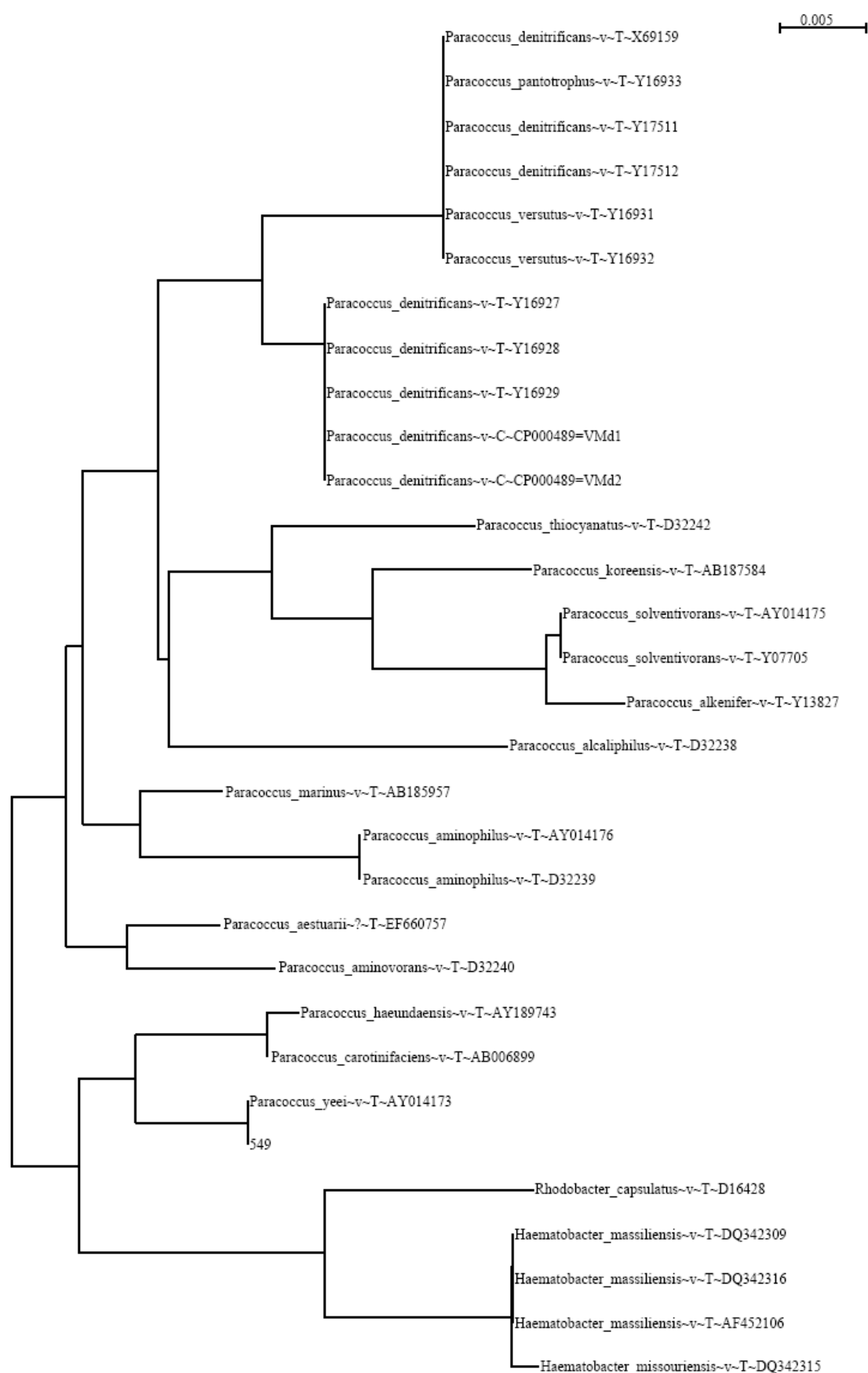


Figura 16 – Árvore filogenética gerada pela base de dados BIBI, com amostra da placa número 25, colônia número 15 (designada como 549 na figura) e estirpes tipo de espécies de bactérias próximas. Espécies identificadas com indicação de: nome válido (v), nome ainda não presente na base de dados nomenclatural (?), estirpe tipo (T), espécie com genoma completamente sequenciado (C), e número de acesso no *GenBank*.

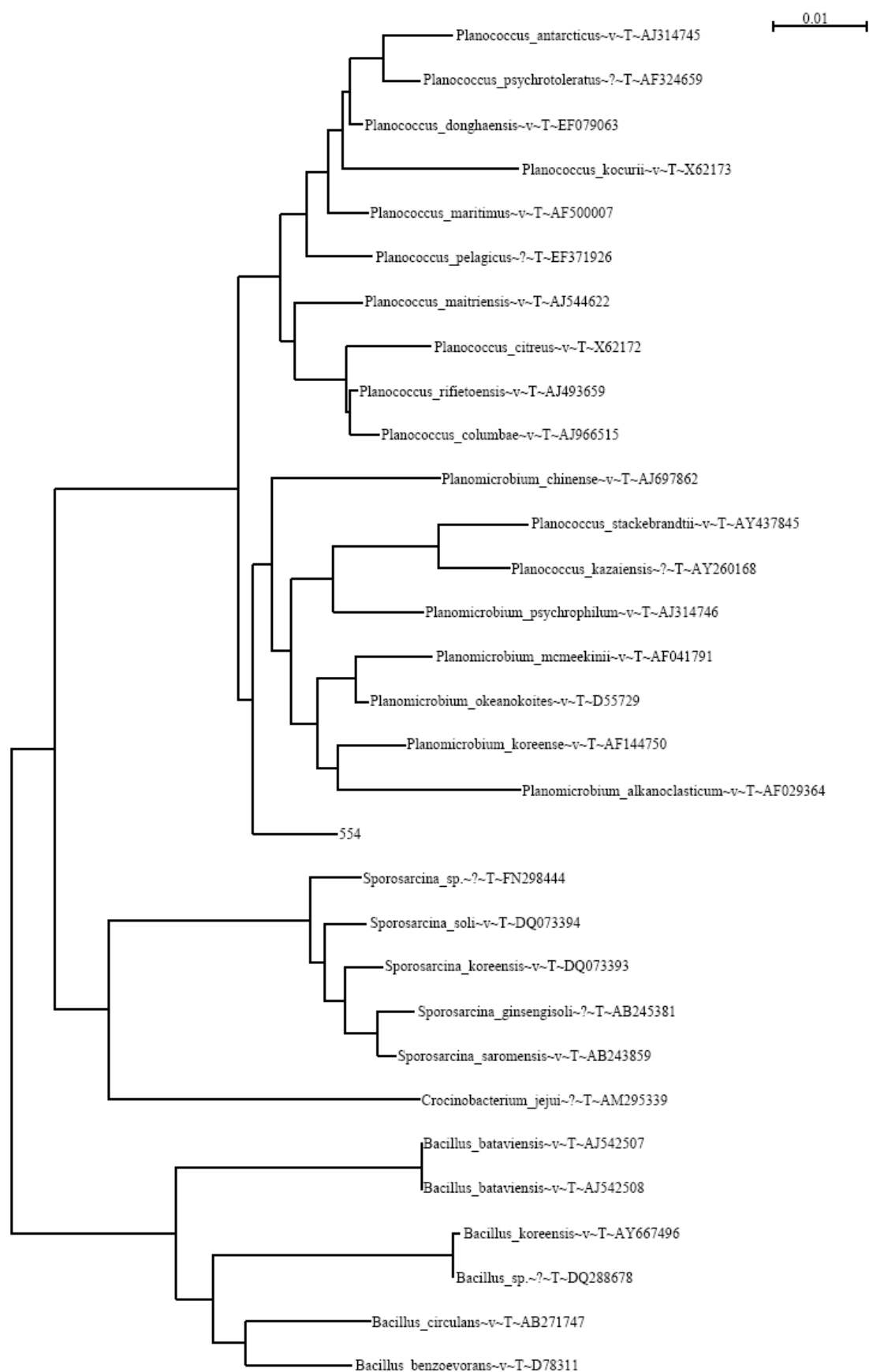


Figura 17 – Árvore filogenética gerada pela base de dados BIBI, com amostra da placa número 23, colônia número 14 (designada como 554 na figura) e estirpes tipo de espécies de bactérias próximas. Espécies identificadas com indicação de: nome válido (v), nome ainda não presente na base de dados nomenclatural (?), estirpe tipo (T), espécie com genoma completamente sequenciado (C), e número de acesso no *GenBank*.

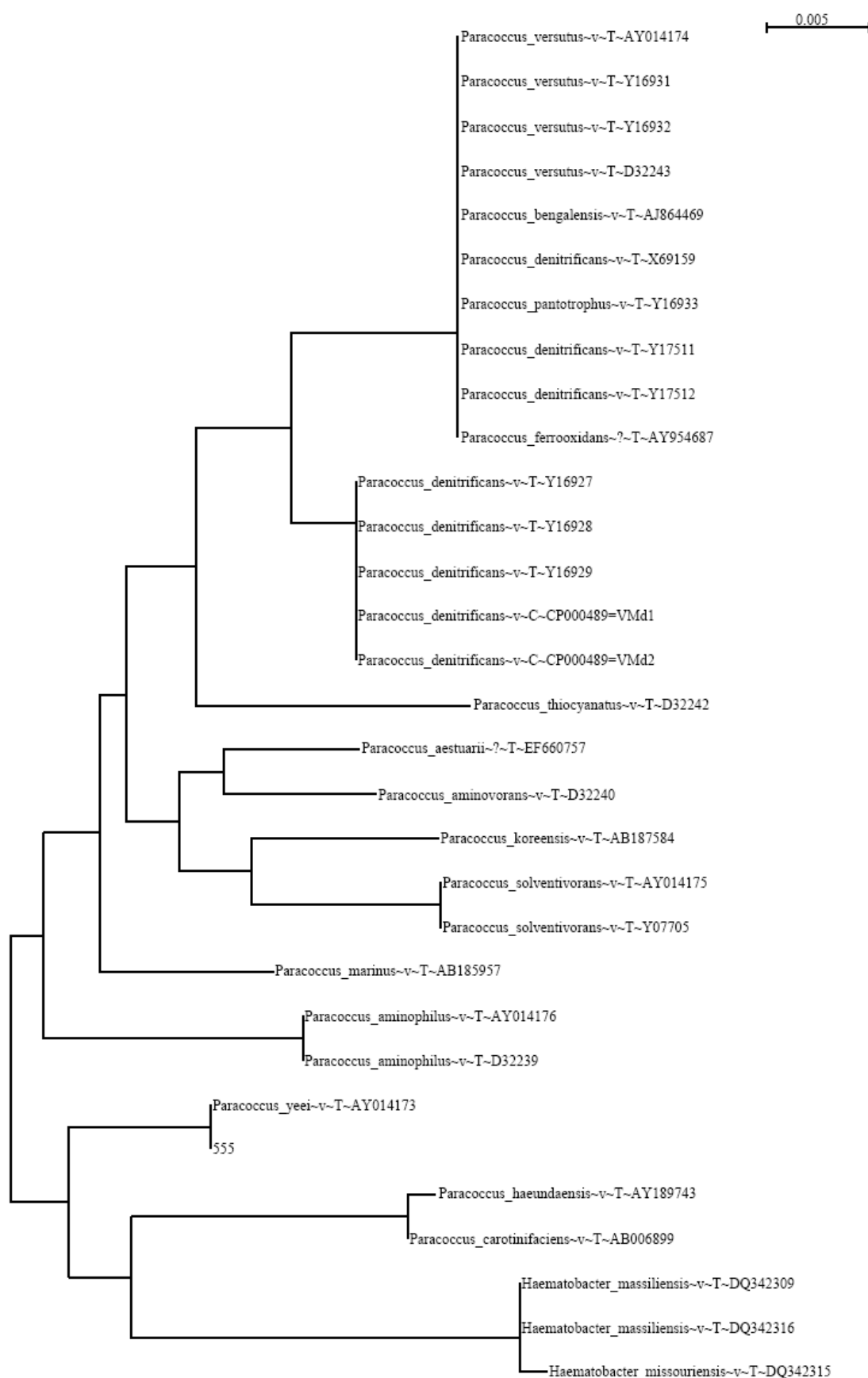


Figura 18 – Árvore filogenética gerada pela base de dados BIBI, com amostra da placa número 25, colônia número 57 (designada como 555 na figura) e estirpes tipo de espécies de bactérias próximas. Espécies identificadas com indicação de: nome válido (v), nome ainda não presente na base de dados nomenclatural (?), estirpe tipo (T), espécie com genoma completamente sequenciado (C), e número de acesso no *GenBank*.

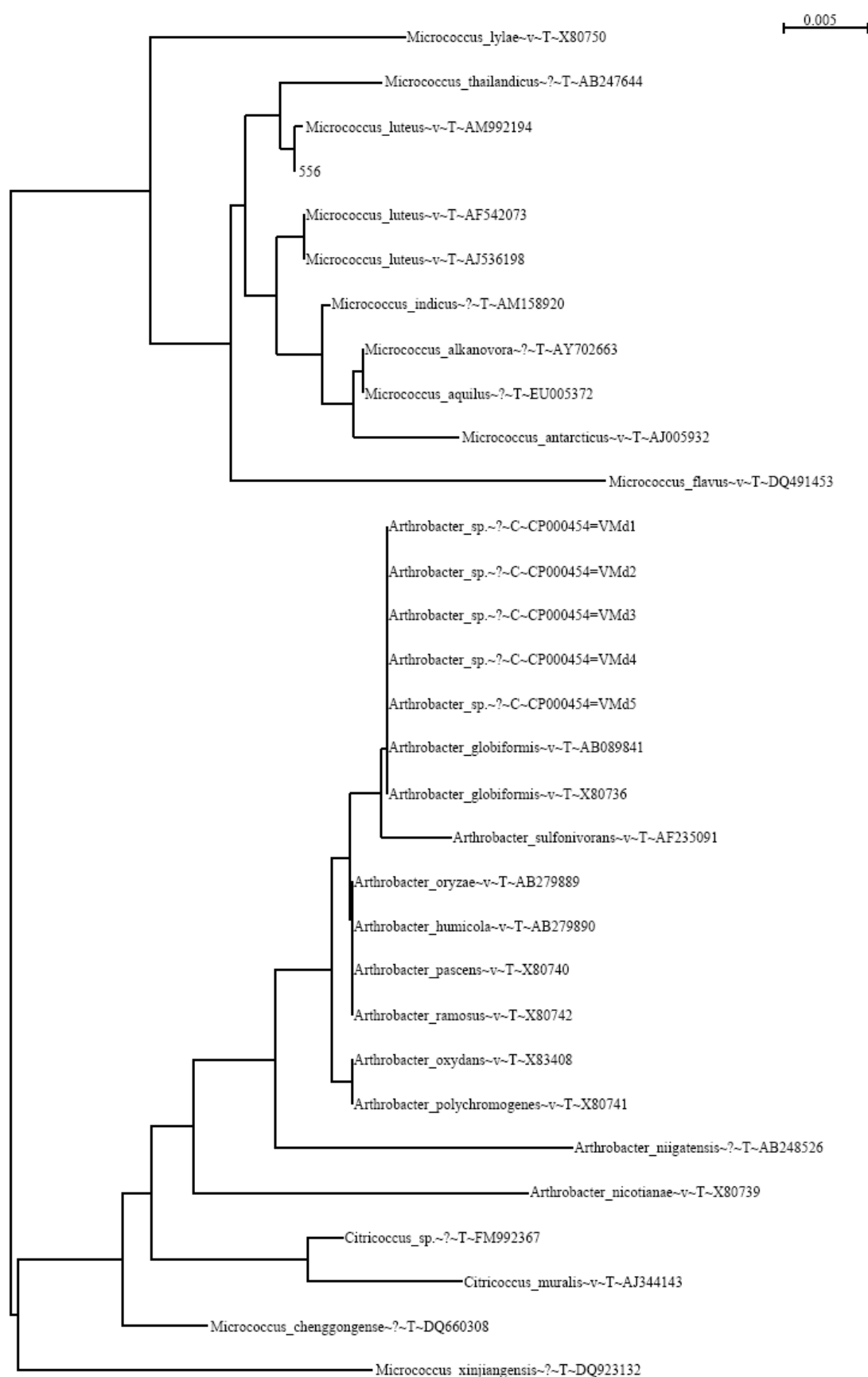


Figura 19 – Árvore filogenética gerada pela base de dados BIBI, com amostra da placa número 4, colônia número 10 (designada como 556 na figura) e estirpes tipo de espécies de bactérias próximas. Espécies identificadas com indicação de: nome válido (v), nome ainda não presente na base de dados nomenclatural (?), estirpe tipo (T), espécie com genoma completamente sequenciado (C), e número de acesso no *GenBank*.

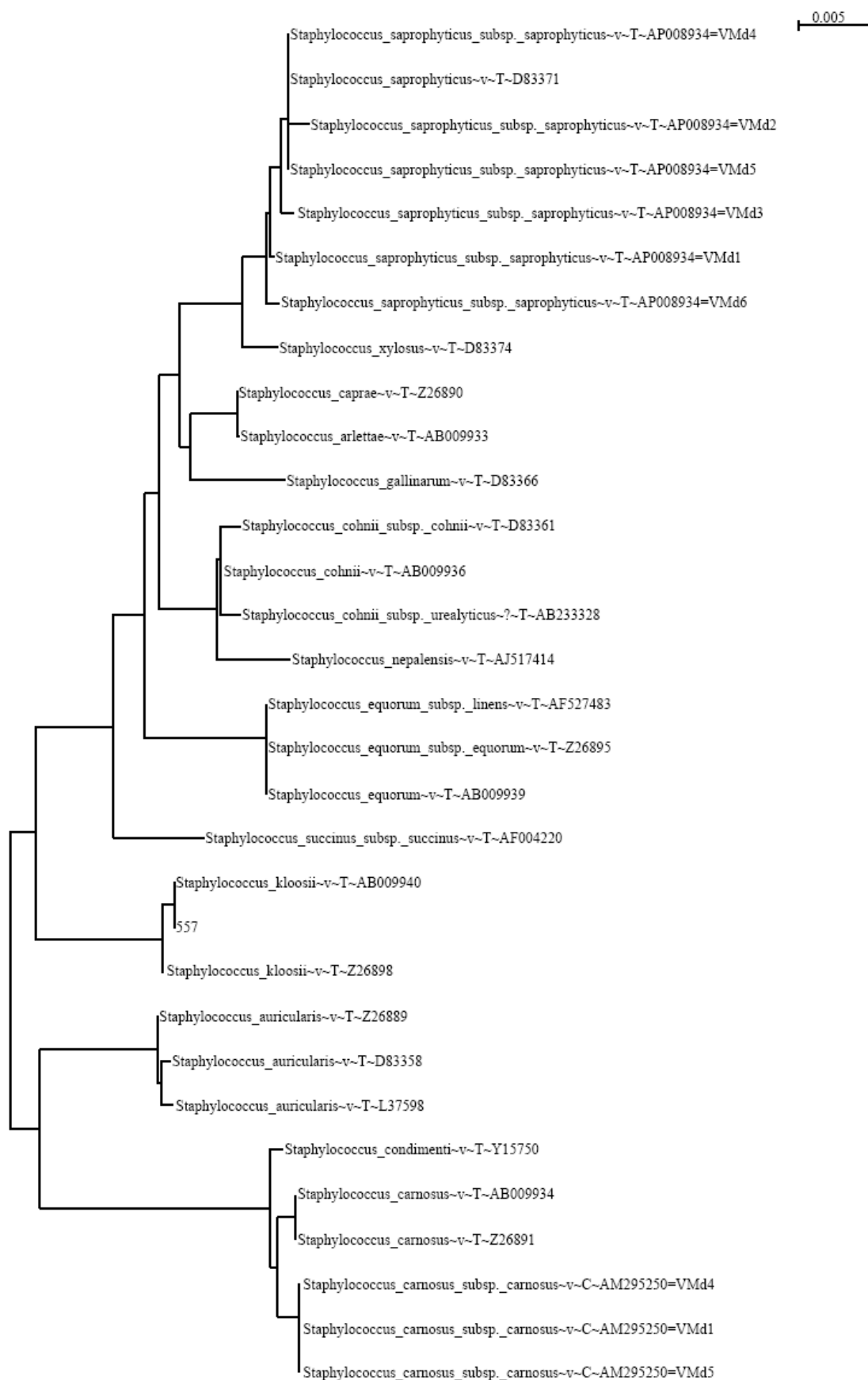


Figura 20 – Árvore filogenética gerada pela base de dados BIBI, com amostra da placa número 33, colônia número 38 (designada como 557 na figura) e estirpes tipo de espécies de bactérias próximas. Espécies identificadas com indicação de: nome válido (v), nome ainda não presente na base de dados nomenclatural (?), estirpe tipo (T), espécie com genoma completamente sequenciado (C), e número de acesso no *GenBank*.

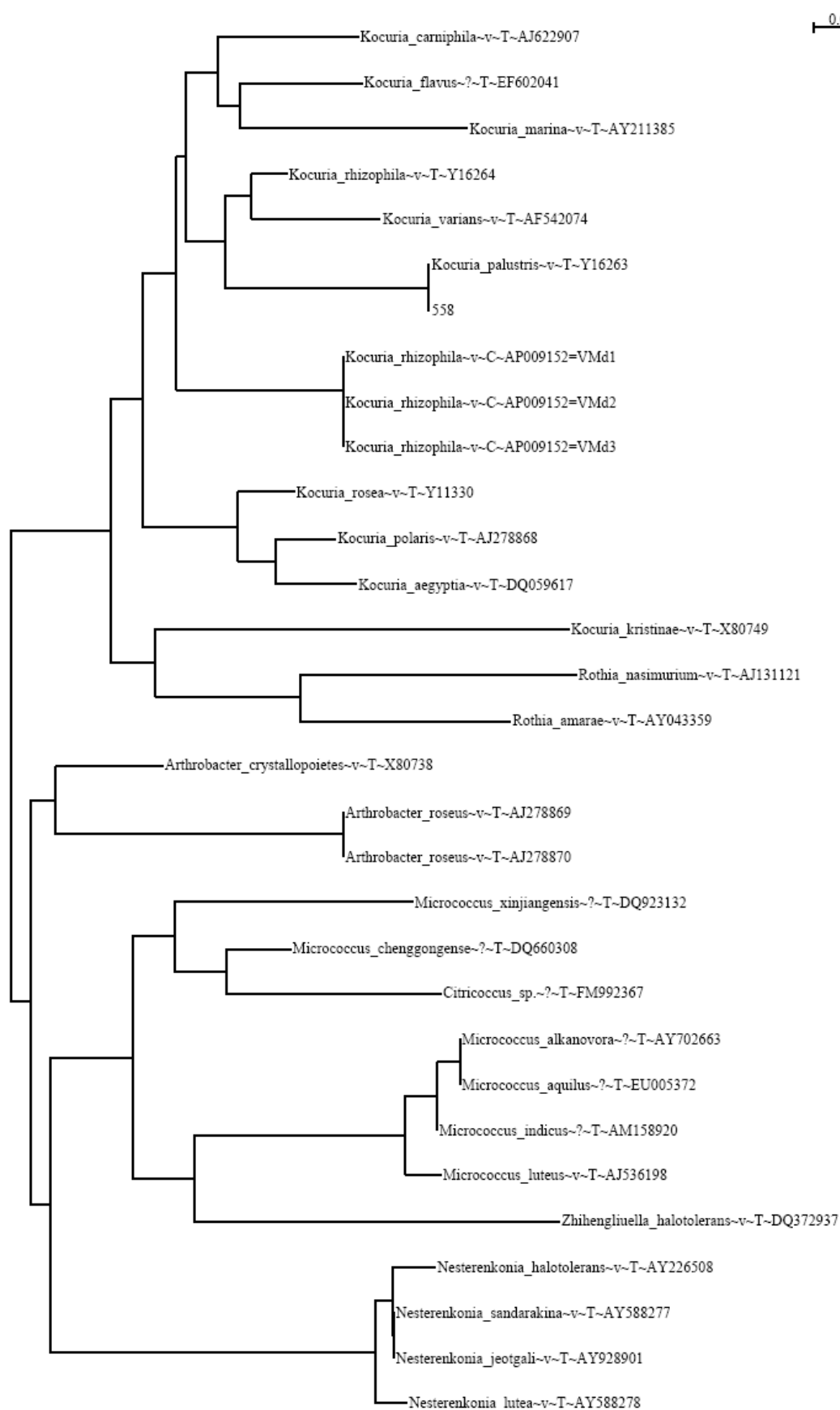


Figura 21 – Árvore filogenética gerada pela base de dados BIBI, com amostra da placa número 9, colônia número 77 (designada como 558 na figura) e estirpes tipo de espécies de bactérias próximas. Espécies identificadas com indicação de: nome válido (v), nome ainda não presente na base de dados nomenclatural (?), estirpe tipo (T), espécie com genoma completamente sequenciado (C), e número de acesso no *GenBank*.

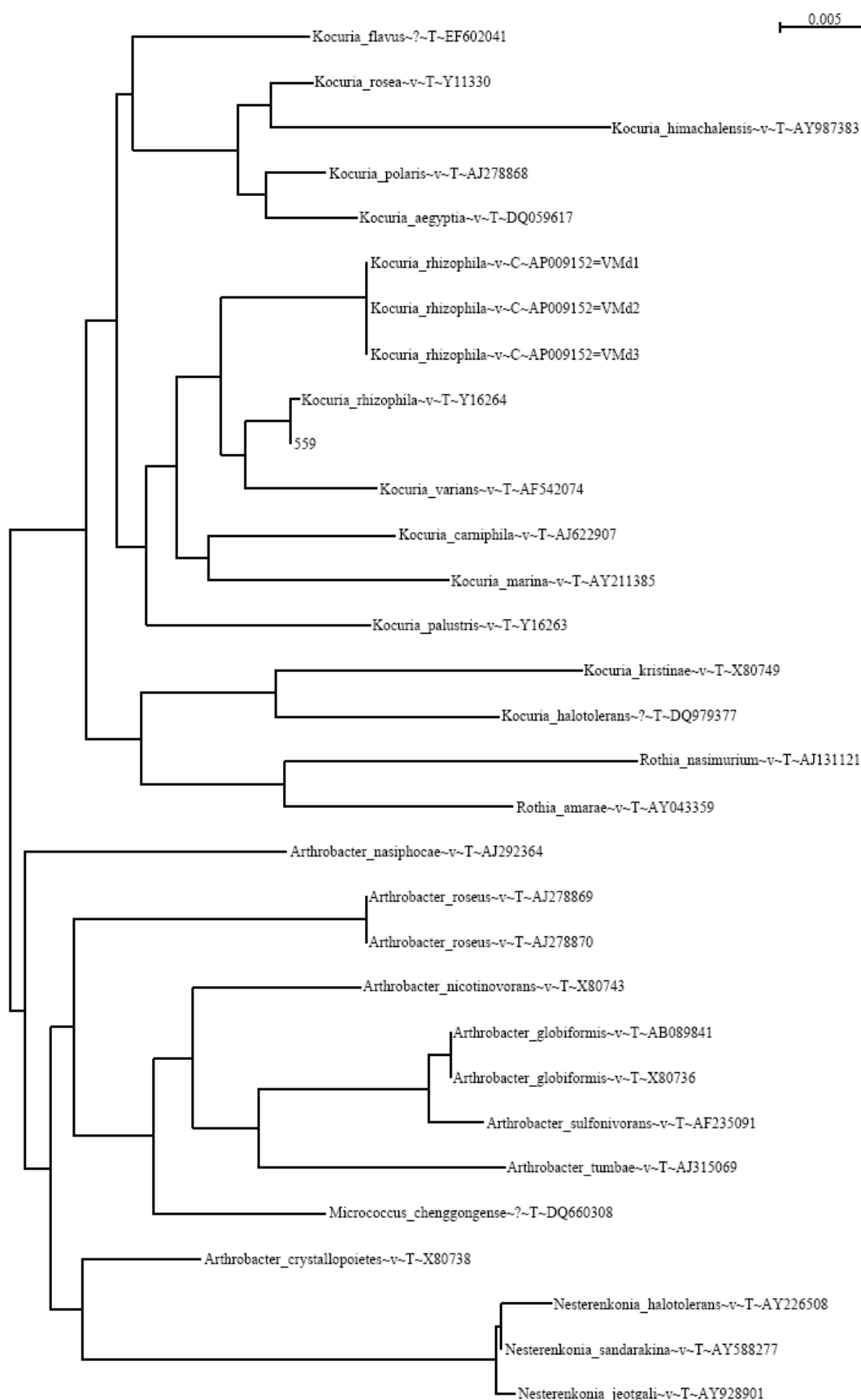


Figura 22 – Árvore filogenética gerada pela base de dados BIBI, com amostra da placa número 28, colônia número 61 (designada como 559 na figura) e estirpes tipo de espécies de bactérias próximas. Espécies identificadas com indicação de: nome válido (v), nome ainda não presente na base de dados nomenclatural (?), estirpe tipo (T), espécie com genoma completamente sequenciado (C), e número de acesso no *GenBank*.

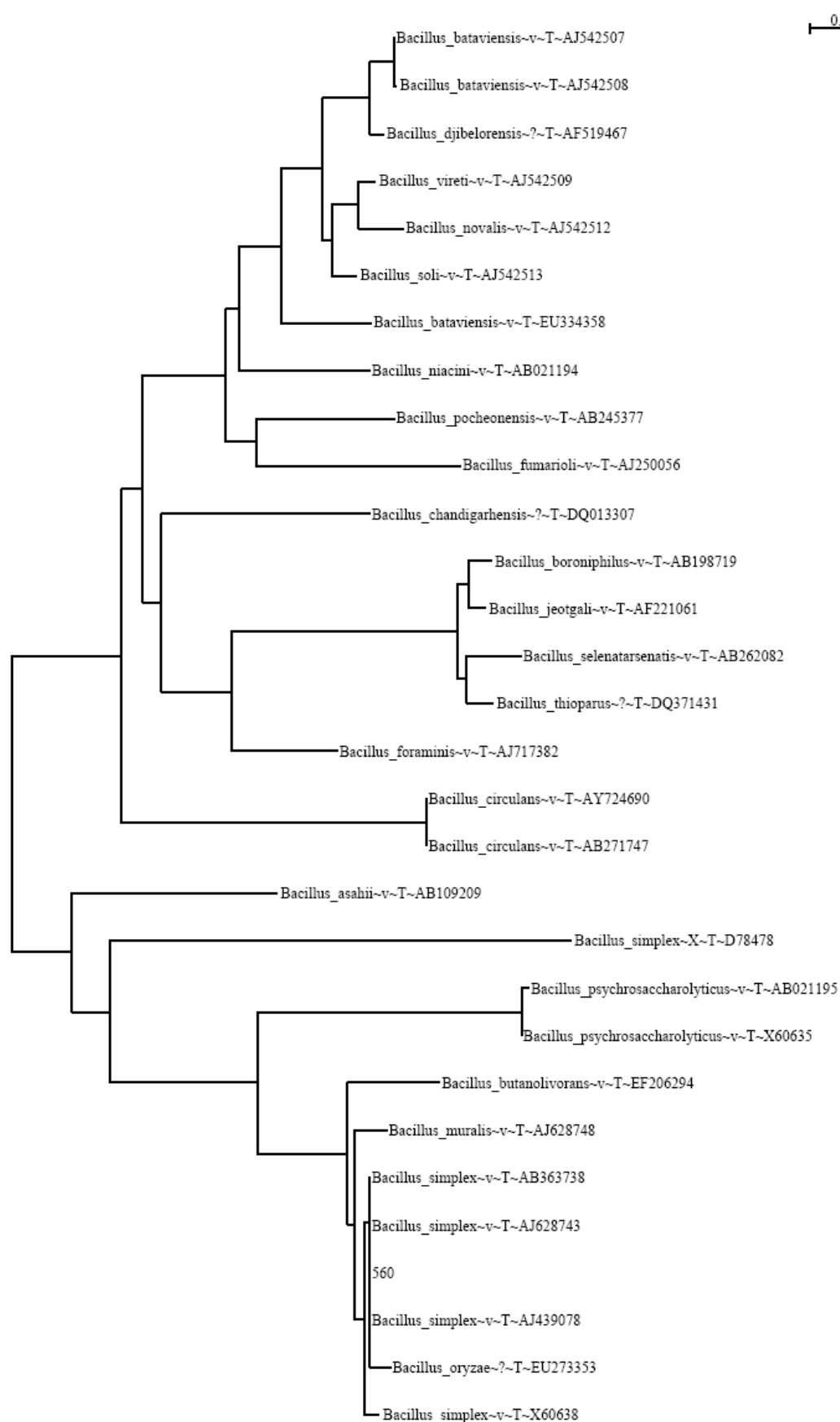


Figura 23 – Árvore filogenética gerada pela base de dados BIBI, com amostra da placa número 14, colônia número 10 (designada como 560 na figura) e estirpes tipo de espécies de bactérias próximas. Espécies identificadas com indicação de: nome válido (v), nome ainda não presente na base de dados nomenclatural (?), estirpe tipo (T), espécie com genoma completamente sequenciado (C), e número de acesso no *GenBank*.

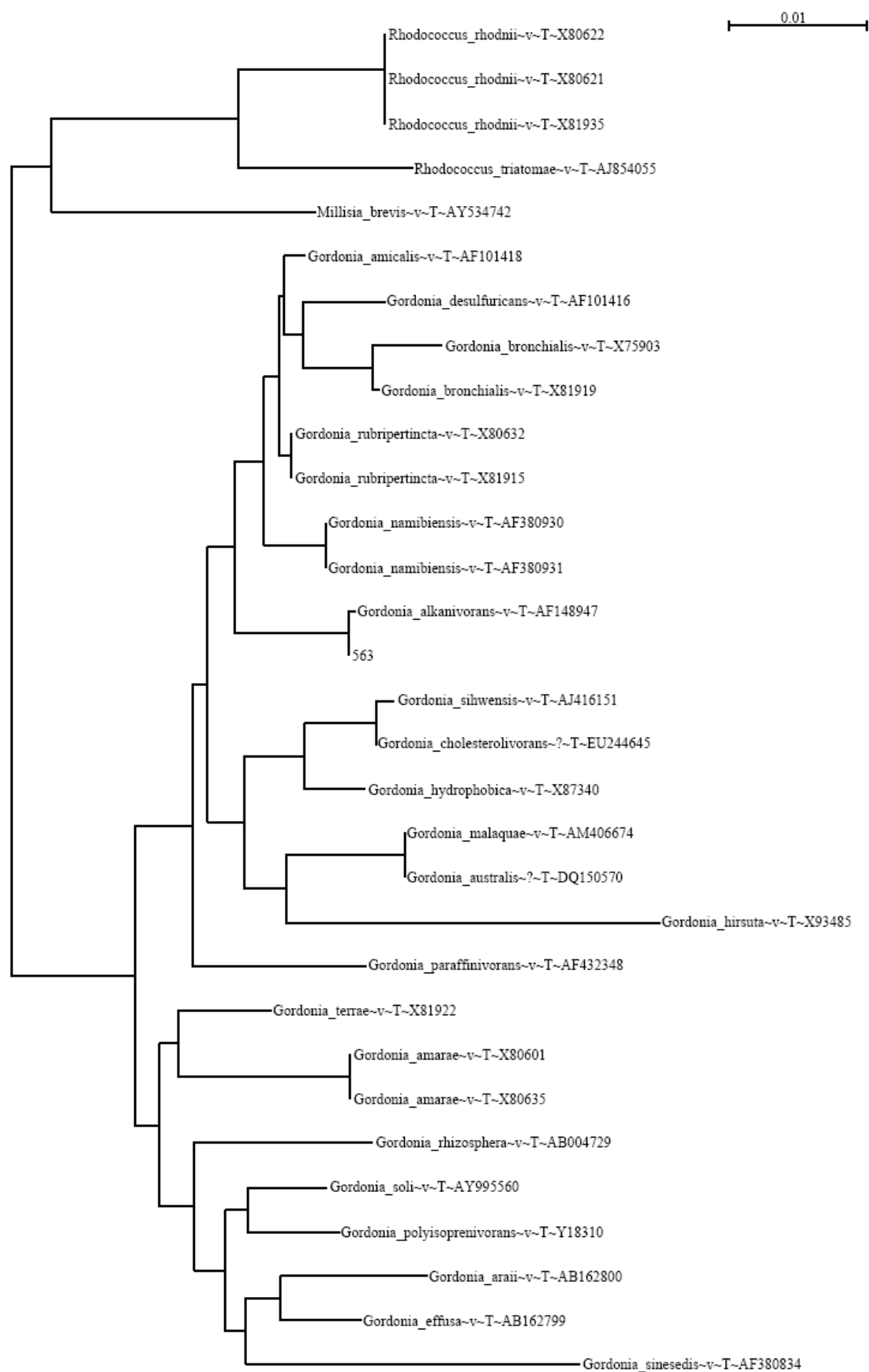


Figura 24 – Árvore filogenética gerada pela base de dados BIBI, com amostra da placa número 14, colônia número 15 (designada como 563 na figura) e estirpes tipo de espécies de bactérias próximas. Espécies identificadas com indicação de: nome válido (v), nome ainda não presente na base de dados nomenclatural (?), estirpe tipo (T), espécie com genoma completamente sequenciado (C), e número de acesso no *GenBank*.

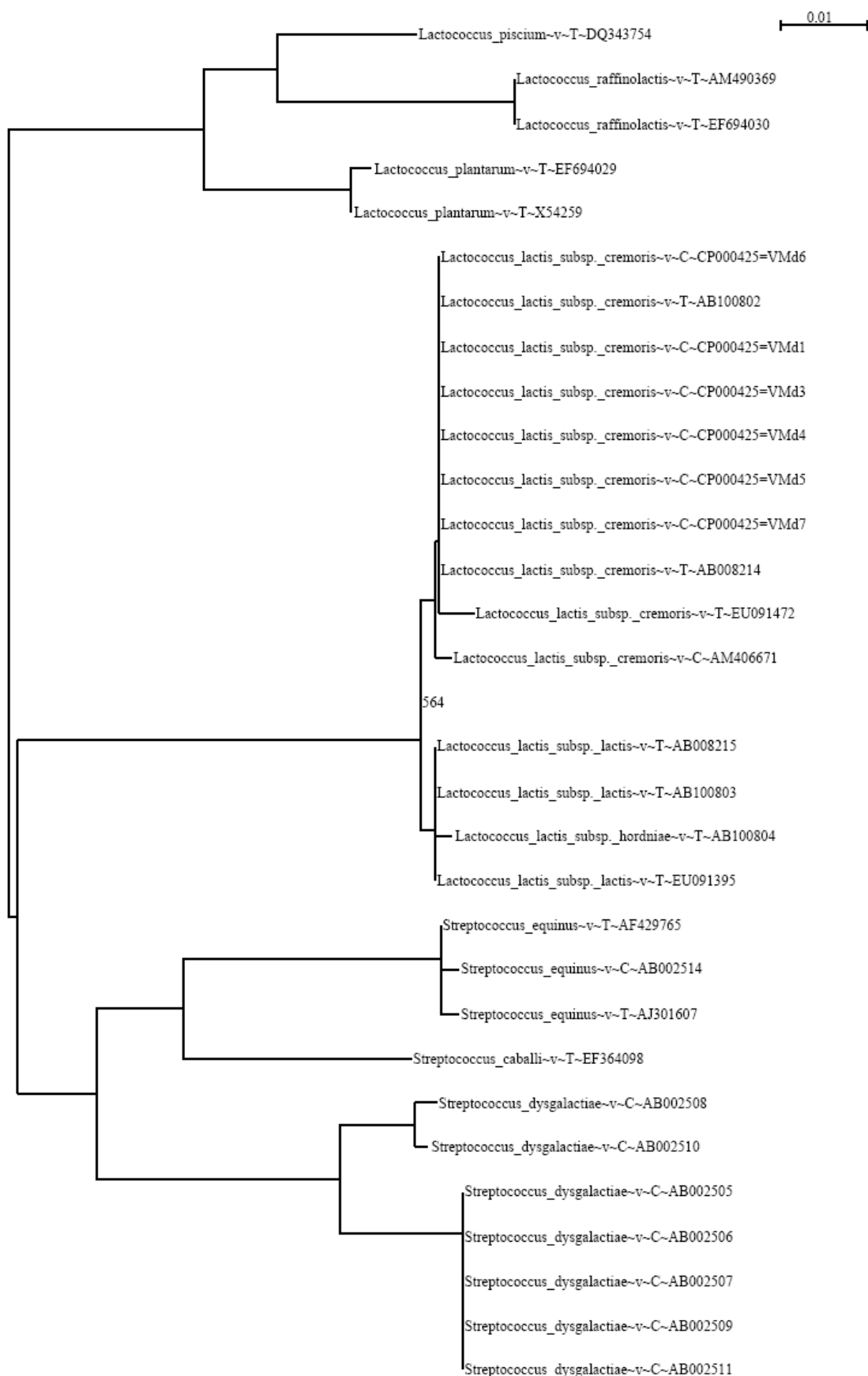


Figura 25 – Árvore filogenética gerada pela base de dados BIBI, com amostra da placa número 35, colônia número 10 (designada como 564 na figura) e estirpes tipo de espécies de bactérias próximas. Espécies identificadas com indicação de: nome válido (v), nome ainda não presente na base de dados nomenclatural (?), estirpe tipo (T), espécie com genoma completamente sequenciado (C), e número de acesso no *GenBank*.

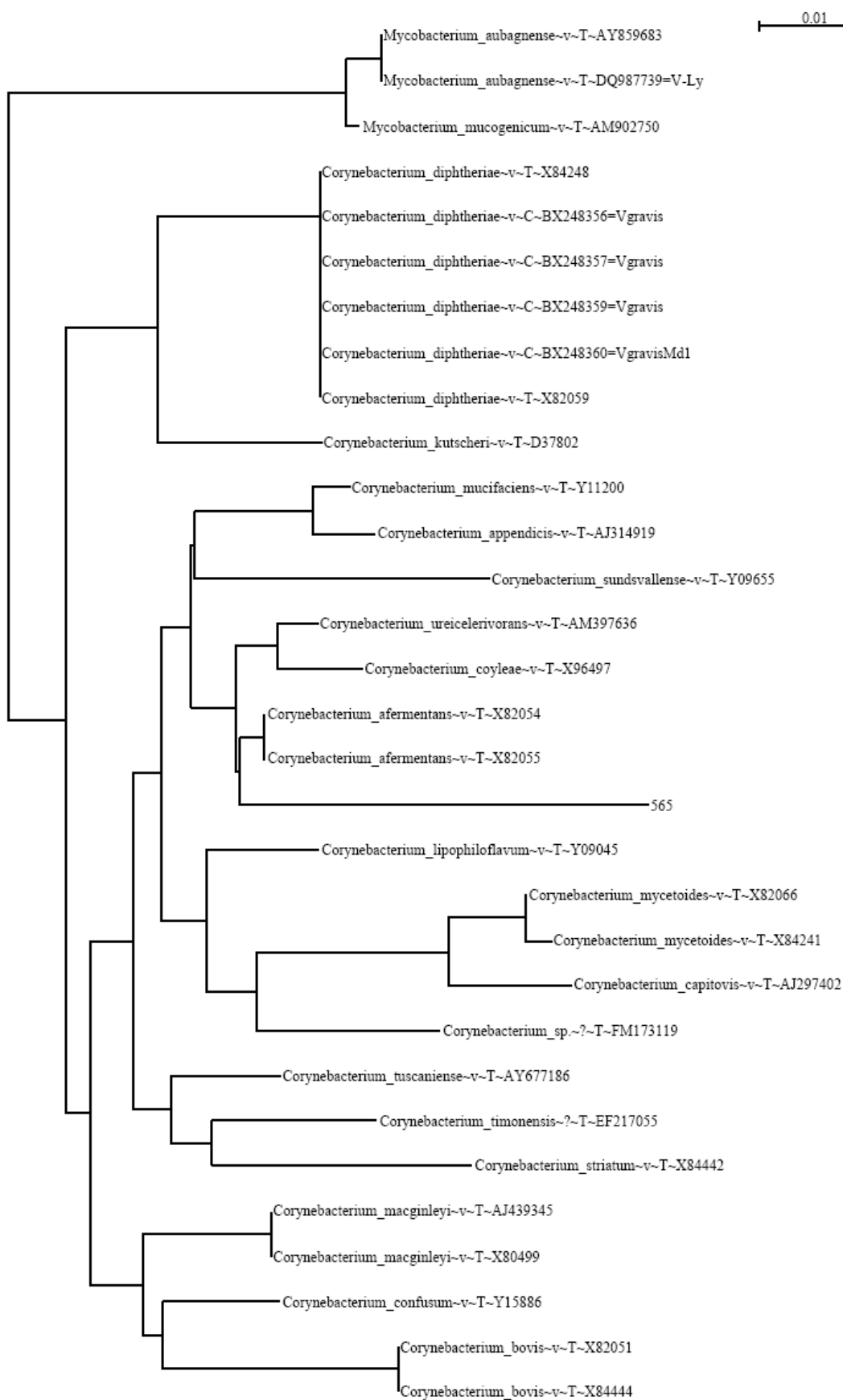


Figura 26 – Árvore filogenética gerada pela base de dados BIBI, com amostra da placa número 37, colônia número 16 (designada como 565 na figura) e estirpes tipo de espécies de bactérias próximas. Espécies identificadas com indicação de: nome válido (v), nome ainda não presente na base de dados nomenclatural (?), estirpe tipo (T), espécie com genoma completamente sequenciado (C), e número de acesso no *GenBank*.

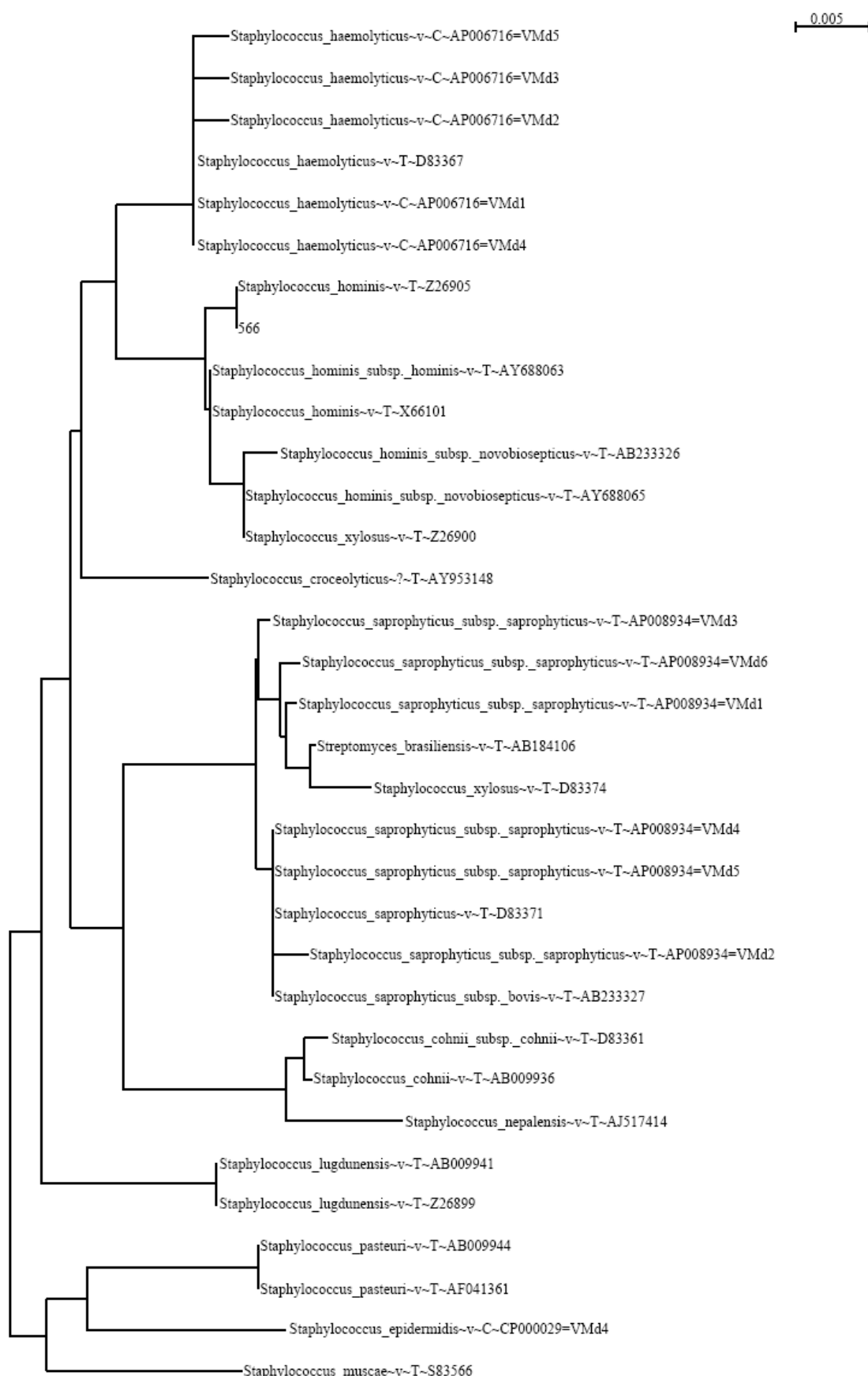


Figura 27 – Árvore filogenética gerada pela base de dados BIBI, com amostra da placa número 14, colônia número 18 (designada como 566 na figura) e estirpes tipo de espécies de bactérias próximas. Espécies identificadas com indicação de: nome válido (v), nome ainda não presente na base de dados nomenclatural (?), estirpe tipo (T), espécie com genoma completamente sequenciado (C), e número de acesso no *GenBank*.

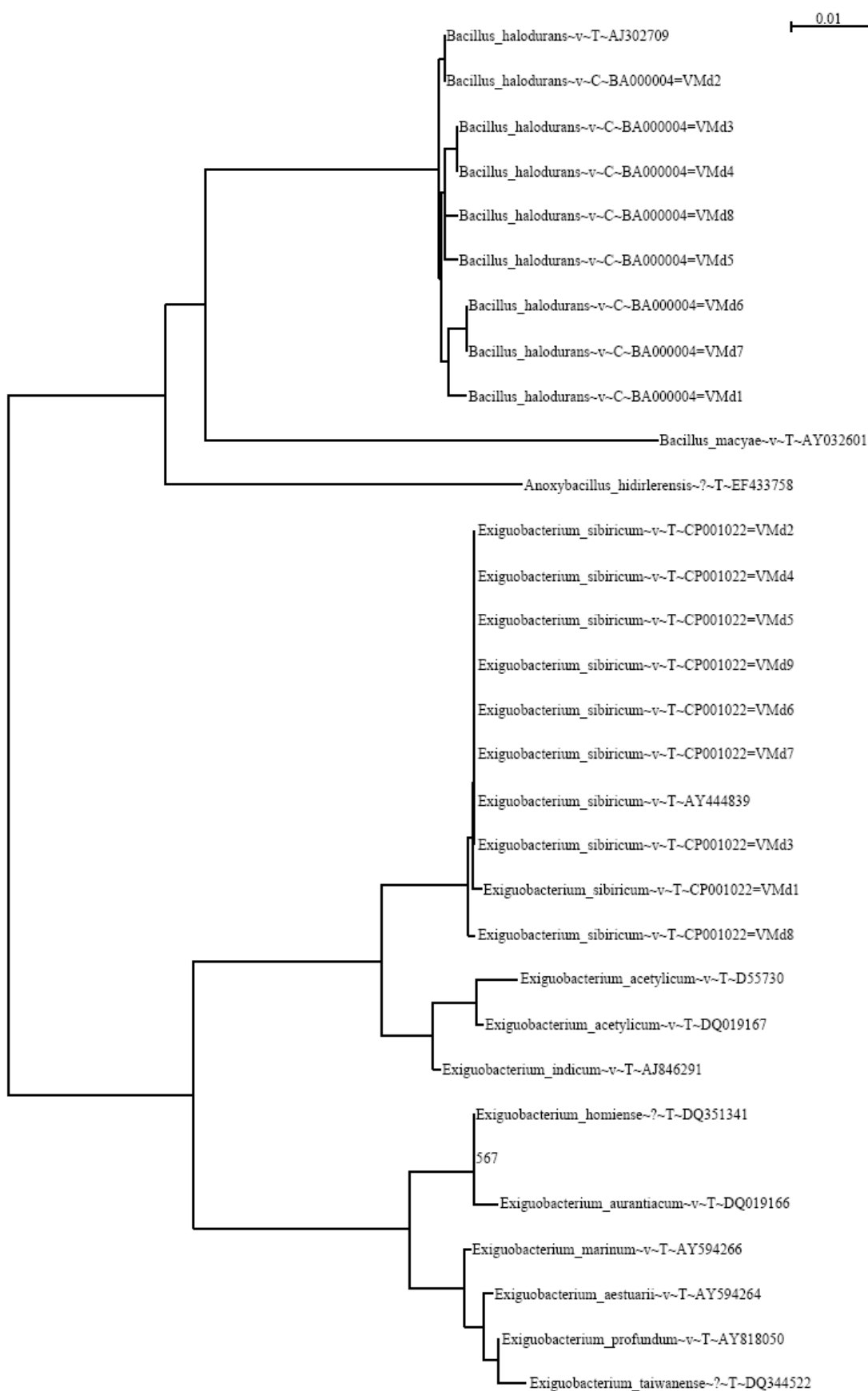


Figura 28 – Árvore filogenética gerada pela base de dados BIBI, com amostra da placa número 35, colônia número 73 (designada como 567 na figura) e estirpes tipo de espécies de bactérias próximas. Espécies identificadas com indicação de: nome válido (v), nome ainda não presente na base de dados nomenclatural (?), estirpe tipo (T), espécie com genoma completamente sequenciado (C), e número de acesso no *GenBank*.

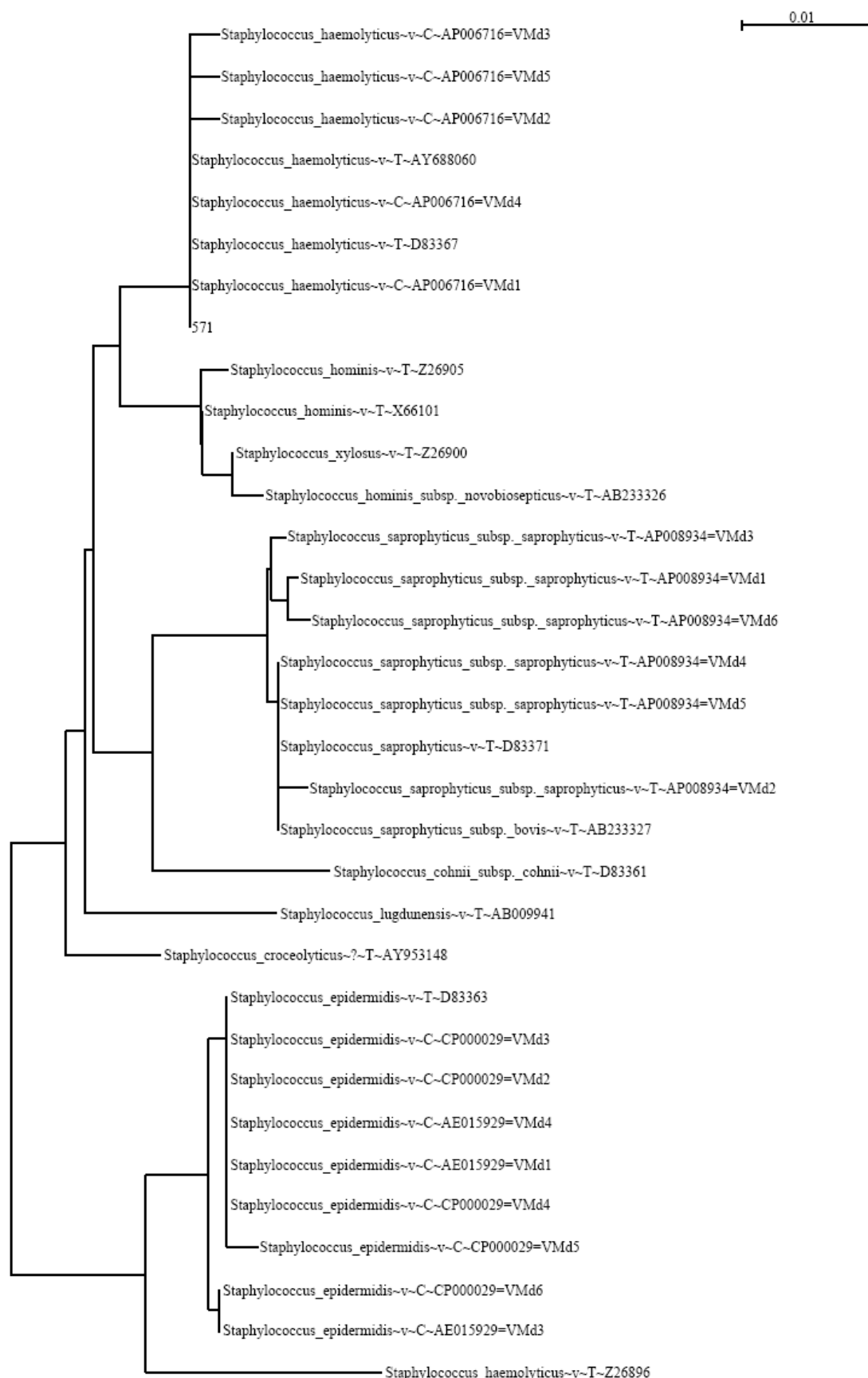


Figura 29 – Árvore filogenética gerada pela base de dados BIBI, com amostra da placa número 35, colônia número 67 (designada como 571 na figura) e estirpes tipo de espécies de bactérias próximas. Espécies identificadas com indicação de: nome válido (v), nome ainda não presente na base de dados nomenclatural (?), estirpe tipo (T), espécie com genoma completamente sequenciado (C), e número de acesso no *GenBank*.

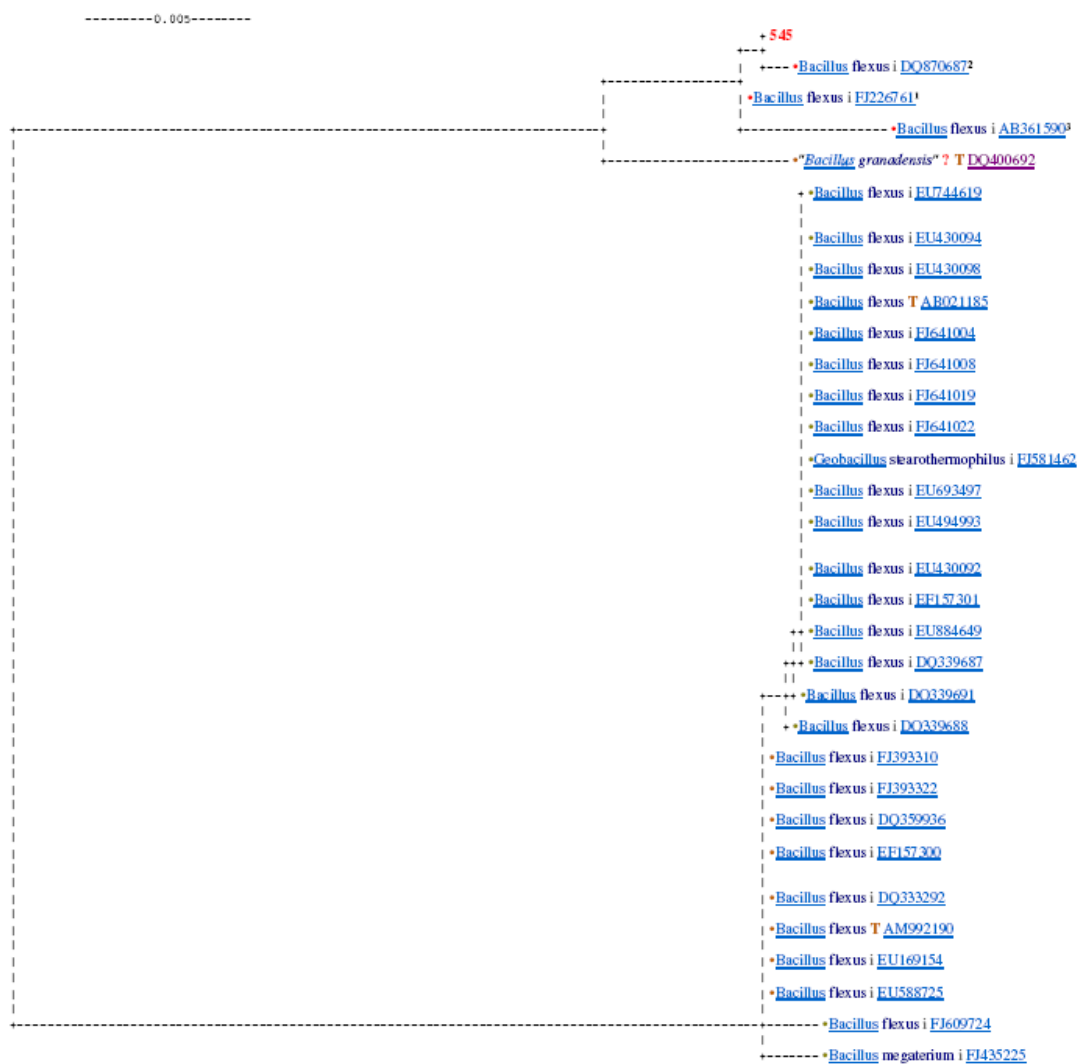


Figura 30 – Árvore filogenética gerada pela base de dados BIBI, com amostra da placa número 29, colónia número 45 (designada como 545 na figura) e estirpes tipo e não tipo de espécies de bactérias próximas. Espécies identificadas com indicação de: nome válido (v), nome ainda não presente na base de dados nomenclatural (?), estirpe tipo (T), estirpe não tipo (i), espécie com genoma completamente sequenciado (C), e número de acesso no *GenBank*.

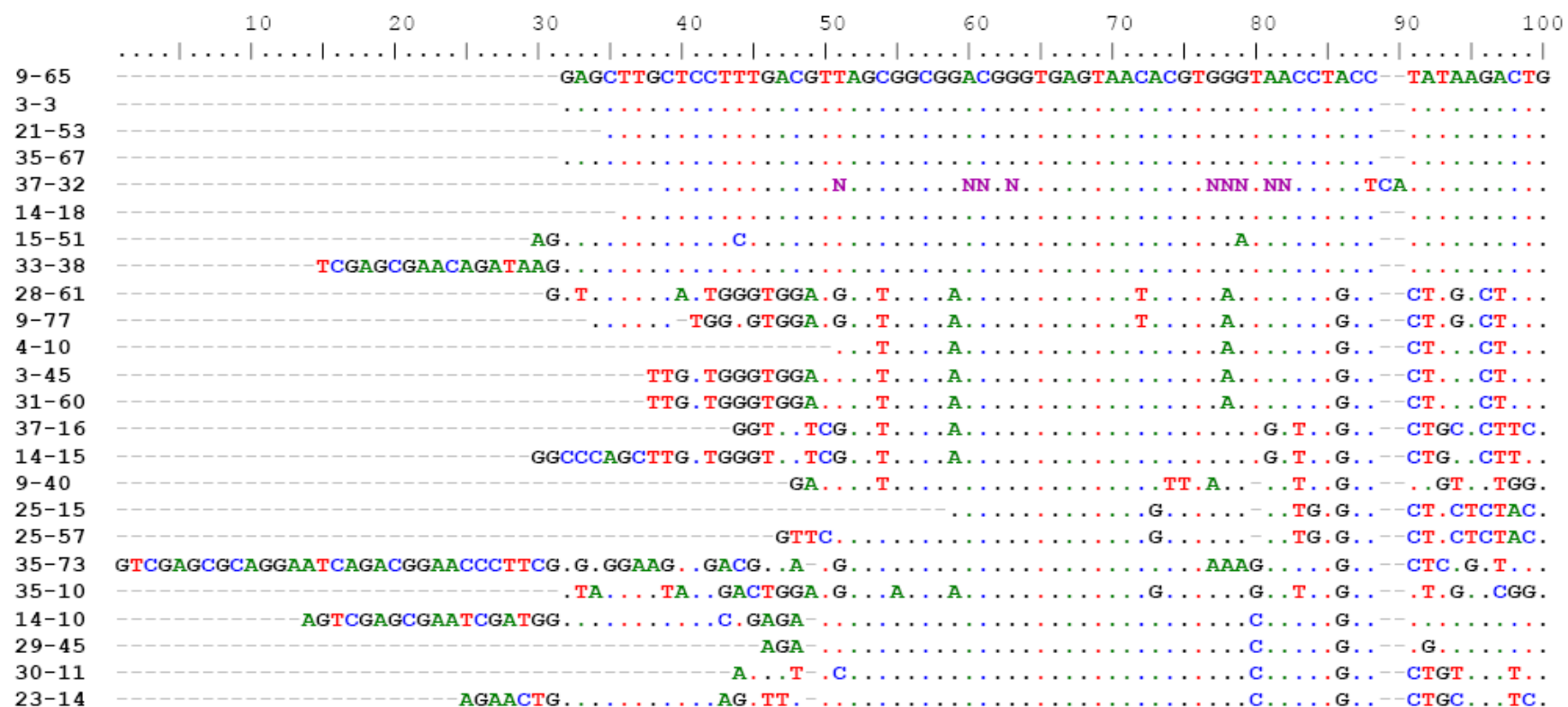


Figura 31 – Alinhamento das sequências de DNA do gene 16S rRNA das bactérias seleccionadas para sequenciação colhidas no HJA. Identificação das bactérias corresponde a: número da amostra - número da colônia. A posição nucleotídica está indicada no topo do alinhamento.

Figura 31 (continuação)

```

          110      120      130      140      150      160      170      180      190      200
9-65  GAATAACTCCGGGAAAC-CGGGGCTAATGCCGGATAACATTTAGAACCGCATGGTTCTAAAGTGAAAGATGGTTTT-GCTATCACTTATAGATGGACCCG
3-3  .....
21-53 .G.....T.....-...A.....A.....T...C.....G.T.....-.....
35-67 .G.....T.....-...A.....A.....T...C.....G.T.....-.....
37-32 .G..NN..T.....G..ANN.N..A.....T..N.N.....N..N.T.....N..N..-...N.....N.N.
14-18 .G.....T.....-...A.....A.....T...C.....G.T.....-...C.C.-.....T.
15-51 .G.....T.....-...A.....A.....G.T.....A.C.....C..C.-...G.....T...
33-38 .....T.....-...AA.....G.....C.....CC.-.....
28-61 .G...GC.T.....-T...T...A.T...CG.CA.GTC.....GG.GTGTG...GG-----CTGG..T.G...G.T.A
9-77  .G...GC.....-T...T...A.T...GCT.CA.GTC.....GG.GTGTG...GG-----CTGG.CT.G...G.T.A
4-10  .G...GC.T.....-T...T...A.....GG.GCGCCT.....GG-GTGT..G..AGA-----GG..T.G...T.
3-45  .G...GC.T.....-T...T...A.....GG.GCGTCC.....GG-GTGT..G..AGA-----GG..T.G...T.
31-60 .G...GC.T.....-T...T...A.....GG.GCGTCC.....GG-GTGT..G..AGA-----GG..T.G...T.
37-16 .G...GC.T.....-T...T...A.....GG.CCACRTTTT.G...GTGG-TG...T-----GGKKGKG...AG.T.S
14-15 .G...GC.T.....-T...T...A.....TG.CC.T.G.GT...C.CTGGGGTG...C-----G.GG..CAG...G...
9-40  .G...G...G.....-TC.AAT...A..C..CG.CC..CGGGT.A.A.GGG-----C.C..C-----C.TG..AT...AG..TA
25-15 .....G.C.T.....-T...AG...A..T..CGCCC..TTGGG.A.A.-----TT-----GGAG.AG...CAG....
25-57 .....G.C.T.....-T...AG...A..T..CGCCC..TTGGG.A.A.-----TT-----GGAG.AG...CAG....
35-73 .G...CA.A...T-.....A.....GGGTCA.C.G.....C.G.GGA.....GC.-C..CG..G..G.C.GGG...CTTT.
35-10 .G.C...ATTT.....GAAT.....A..C...AC.TT..A.A..A.T..TA.GTT.....CAA...-.....C.A...AT....
14-10 .G.....T.....-...A.....A.....CGT.C.TTTCT.....AGAGA.G.TG...C...AC..G.....G...
29-45 .G.....-.....A.....T..C..TTTATA..ATAAT..G.T.....C-T.....C.....G...
30-11 .G.....-.....A..A...TCCACCAG..A...C.GGTGT.....GC..C..CG..G...ACAG...G...
23-14 .G.....-...T.....A..A..GTT.GGNNCCN.T.C..NGNCC.CG...C...CG..G...GCAG...G...

```

Figura 31 (continuação)

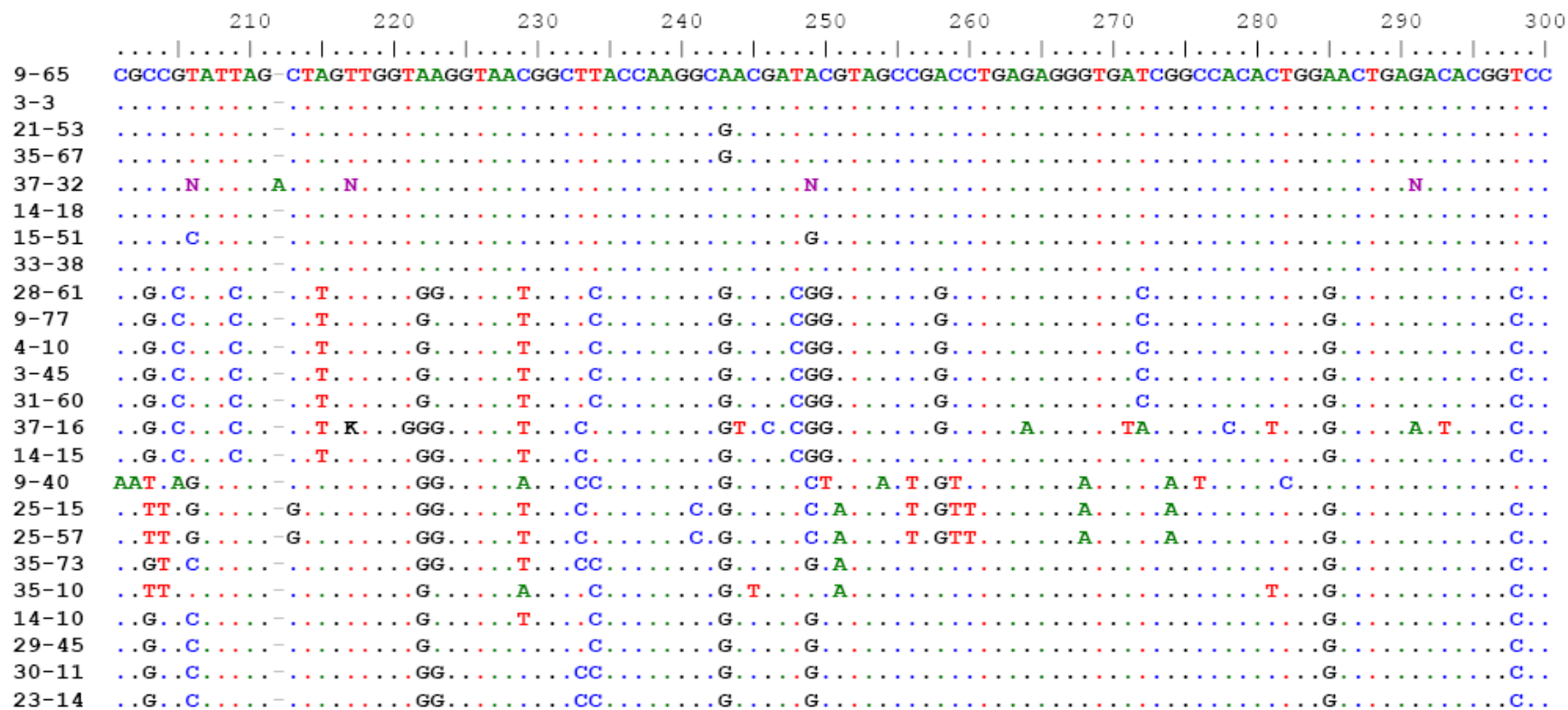


Figura 31 (continuação)

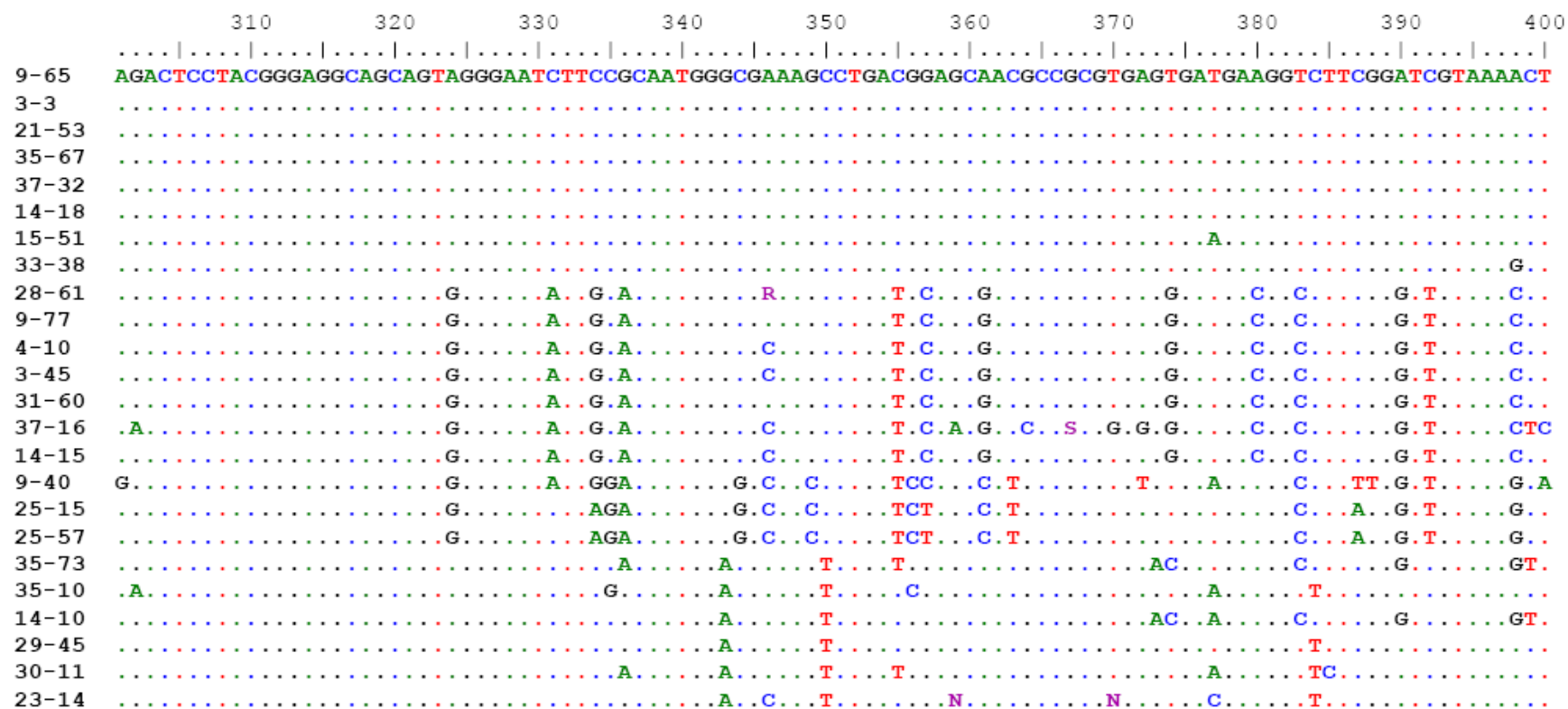


Figura 31 (continuação)

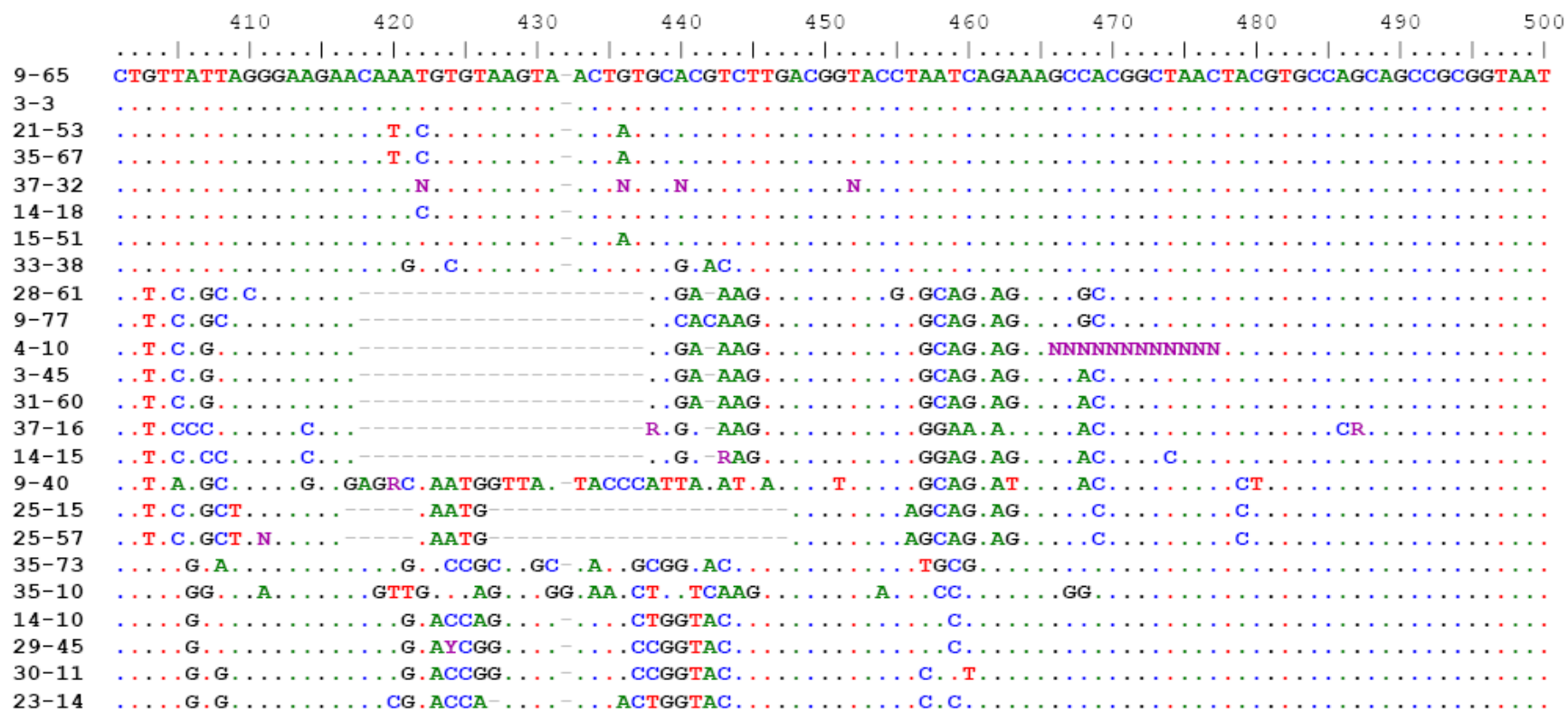


Figura 31 (continuação)

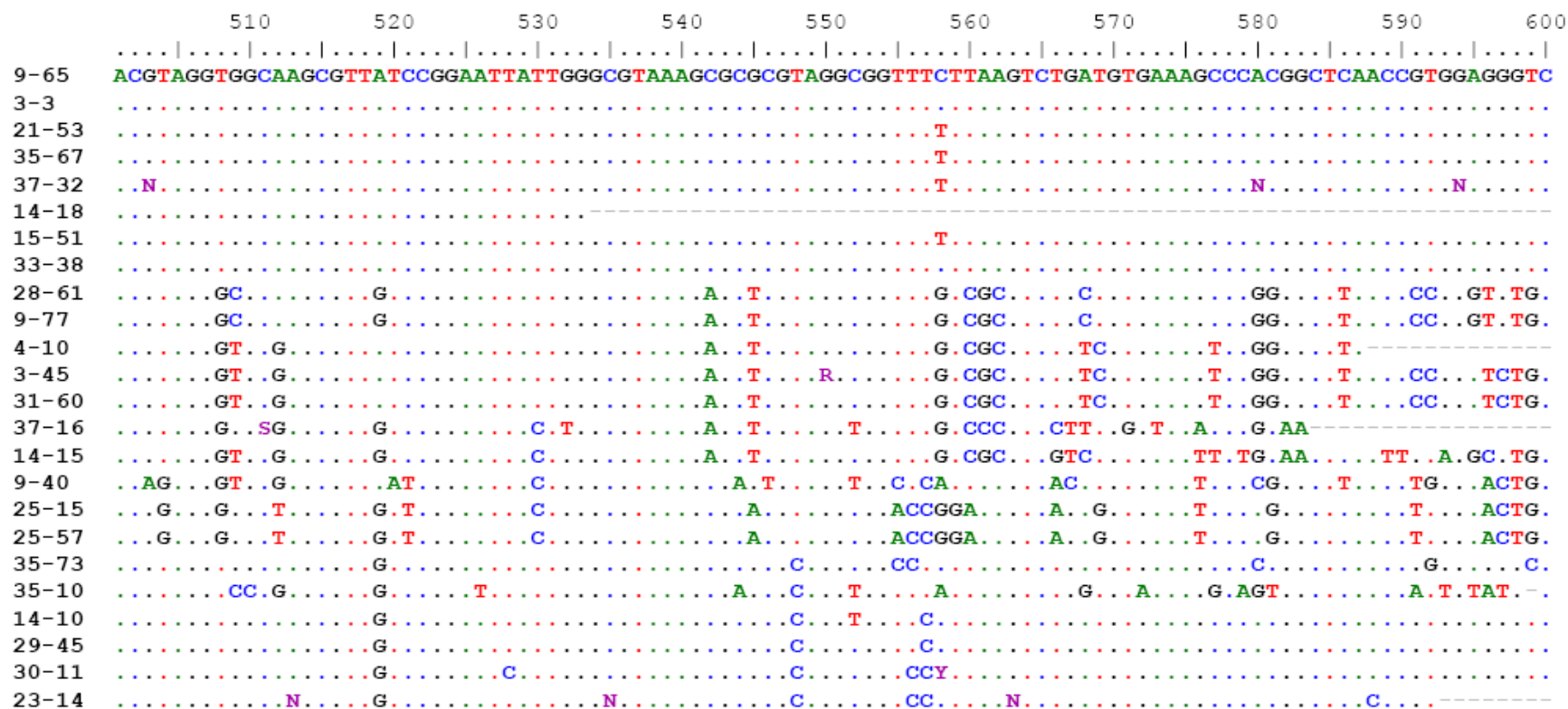


Figura 31 (continuação)

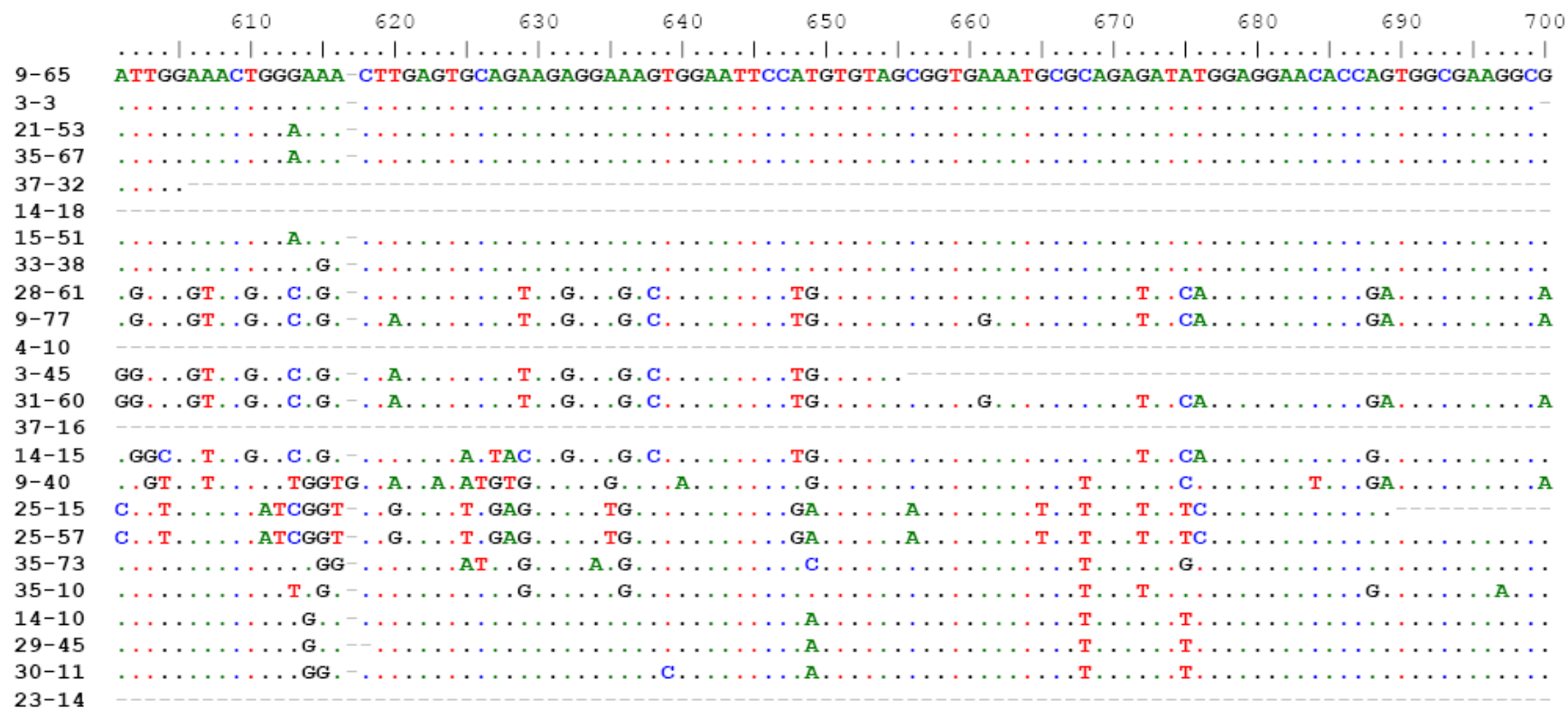




Figura 31 (continuação)

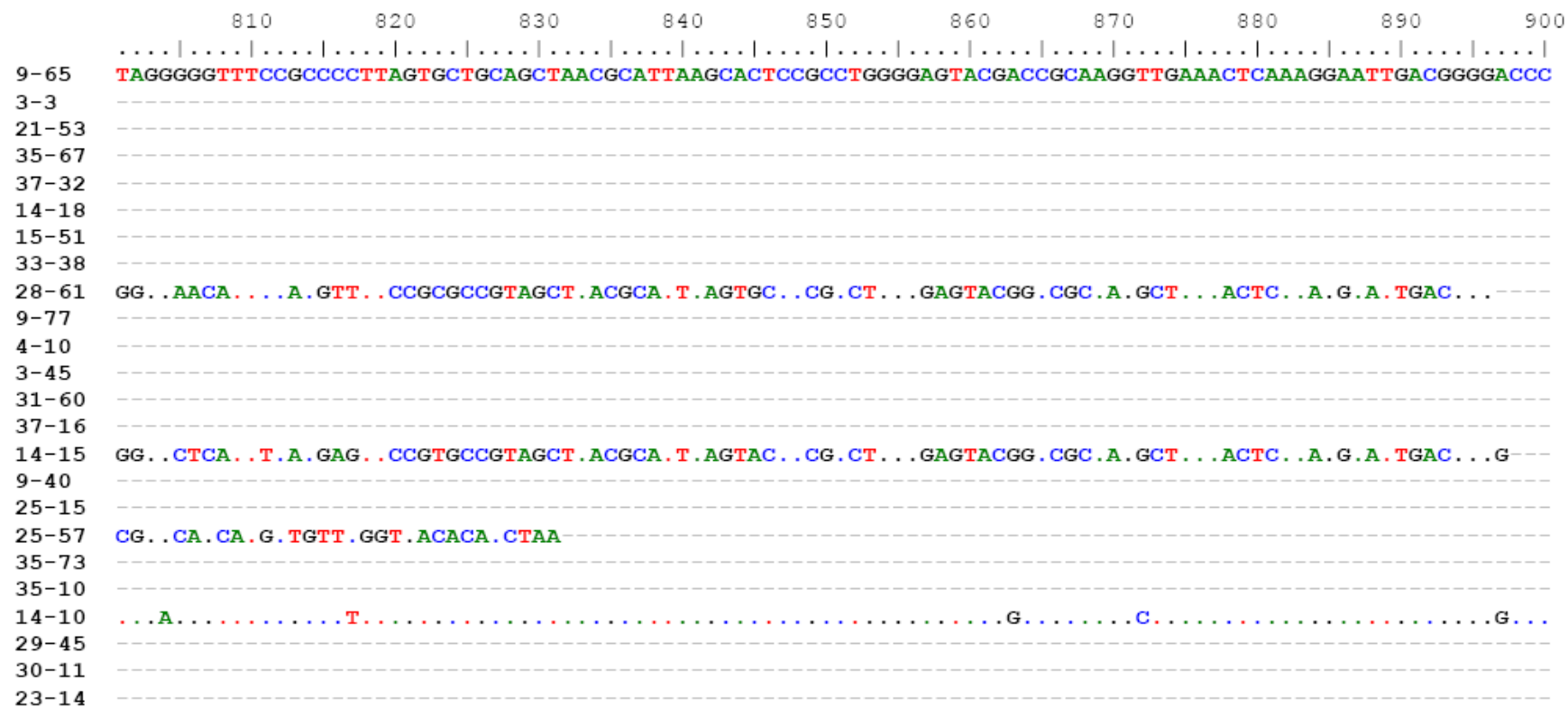




Figura 31 (continuação)

```

          1010      1020      1030      1040      1050      1060      1070      1080      1090      1100
9-65  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGCTTAGTTGCCA

          1110      1120      1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190      1200
9-65  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GCATTAAGTTGGGCACTCTAAGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGATTTGGGCTACACACG

          1210      1220      1230      1240      1250      1260      1270      1280      1290      1300
9-65  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TGCTACAATGGACAATACAAAGGGCAGCTAAACCGCGAGGTCATGCAAATCCCATAAAGTTGTTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATG

          1310      1320      1330      1340      1350      1360      1370      1380      1390      1400
9-65  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCC

          1410
9-65  ....|....|
GAAGCCGGTG

```

Tabela 1 – Características das amostragens de ar efectuadas no interior e exterior do HJA e dos respectivos locais. N/A – Não aplicável.

Número da amostra	Data da amostragem	Período do dia	Piso	Nome do local	Categoria de local	Tipo de local	Número de camas no local
1	23-04-2009	Manhã	3	Quarto Toutinegra	Interior	Quarto	3
2	23-04-2009	Manhã	3	Quarto Pardal da Terra	Interior	Quarto	2
3	23-04-2009	Manhã	3	Corredor Piso 3	Interior	Corredor	N/A
4	23-04-2009	Tarde	3	Quarto Toutinegra	Interior	Quarto	3
5	23-04-2009	Tarde	3	Quarto Pardal da Terra	Interior	Quarto	2
6	23-04-2009	Tarde	3	Corredor Piso 3	Interior	Corredor	N/A
7	23-04-2009	Tarde	3	Terraço Exterior do Piso 3	Exterior	Exterior	N/A
8	28-04-2009	Manhã	3	Quarto Toutinegra	Interior	Quarto	3
9	28-04-2009	Manhã	3	Quarto Pardal da Terra	Interior	Quarto	2
10	28-04-2009	Manhã	3	Corredor Piso 3	Interior	Corredor	N/A
11	28-04-2009	Tarde	3	Quarto Toutinegra	Interior	Quarto	3
12	28-04-2009	Tarde	3	Quarto Pardal da Terra	Interior	Quarto	2
13	28-04-2009	Tarde	3	Corredor Piso 3	Interior	Corredor	N/A
14	28-04-2009	Tarde	3	Terraço Exterior	Exterior	Exterior	N/A
15	07-05-2009	Manhã	2	Quarto Til	Interior	Quarto	2
16	07-05-2009	Manhã	2	Corredor Piso 2	Interior	Corredor	N/A
17	07-05-2009	Manhã	2	Sala estar (modificada para quarto)	Interior	Quarto	5
18	07-05-2009	Manhã	2	Quarto Papoila	Interior	Quarto	4
19	07-05-2009	Tarde	2	Quarto Til	Interior	Quarto	2
20	07-05-2009	Tarde	2	Corredor Piso 2	Interior	Corredor	N/A
21	07-05-2009	Tarde	2	Sala estar (modificada para quarto)	Interior	Quarto	5
22	07-05-2009	Tarde	2	Quarto Papoila	Interior	Quarto	4
23	07-05-2009	Tarde	2	Átrio entrada, junto portaria	Exterior	Exterior	N/A
24	21-05-2009	Manhã	0	Lavandaria	Interior	Lavandaria	N/A
25	21-05-2009	Manhã	0	Sala convívio (sem nome)	Interior	Sala	N/A
26	21-05-2009	Manhã	0	Sala fisioterapia (sem nome)	Interior	Sala	N/A
27	21-05-2009	Manhã	0	Corredor Piso 0	Interior	Corredor	N/A
28	21-05-2009	Tarde	0	Lavandaria	Interior	Lavandaria	N/A
29	21-05-2009	Tarde	0	Sala convívio (sem nome)	Interior	Sala	N/A
30	21-05-2009	Tarde	0	Sala fisioterapia (sem nome)	Interior	Sala	N/A
31	21-05-2009	Tarde	0	Corredor Piso 0	Interior	Corredor	N/A
32	21-05-2009	Tarde	0	Átrio entrada, junto porta principal	Exterior	Exterior	N/A
33	04-06-2009	Manhã	1	Corredor Piso 1	Interior	Corredor	N/A
34	04-06-2009	Manhã	1	Cozinha	Interior	Alimentar	N/A
35	04-06-2009	Manhã	1	Bar pessoal	Interior	Alimentar	N/A
36	04-06-2009	Manhã	1	Quarto Castanholas	Interior	Quarto	1
37	04-06-2009	Tarde	1	Corredor Piso 1	Interior	Corredor	N/A
38	04-06-2009	Tarde	1	Cozinha	Interior	Alimentar	N/A
39	04-06-2009	Tarde	1	Bar pessoal	Interior	Alimentar	N/A
40	04-06-2009	Tarde	1	Quarto Castanholas	Interior	Quarto	1
41	04-06-2009	Tarde	1	Átrio entrada, junto porta principal	Exterior	Exterior	N/A

Tabela 2 – Dados obtidos durante as amostragens do ar interior e exterior do HJA e resultados laboratoriais do cálculo da concentração de microorganismos no ar. N/A – Não aplicável; Campos vazios indicam ausência de dados.

Número da amostra	Temperatura (°C)	Humidade relativa (%)	Concentração NO <sub>2</sub> (ppm)	Concentração CO <sub>2</sub> (ppm)	Número de pessoas no local	Limpeza do quarto	Ventilação prévia do local	Grau de movimentação de pessoas	Concentração bactérias totais (UFC/m <sup>3</sup> )	Concentração fungos totais (UFC/m <sup>3</sup> )
1	22,6	50,0%	0,0	280	2	Por fazer	Sim	0	318,8	275,0
2	21,4	52,0%	0,0	230	2	Feita	Sim	0	287,5	231,3
3	21,4	52,0%	0,0	260	Muitas	N/A	Sim	4	568,8	243,8
4	25,5	51,0%	0,0	260	4	Feita	Sim	1	287,5	243,8
5	23,9	53,0%	0,0	360	4	Feita	Não	1	443,8	150,0
6	22,8	55,0%	0,0	300	Muitas	N/A	Sim	3	550,0	200,0
7	22,8	45,0%	0,0	190	Muitas	N/A	N/A	0	93,8	237,5
8	22,2	51,0%	0,0	200	2	Por fazer	Não	0	243,8	106,3
9	21,1	55,0%	0,0	310	2	Feita	Não	0	487,5	131,3
10	20,6	55,0%	0,0	240	Muitas	N/A	Sim	3	575,0	106,3
11	23,4	48,0%	0,0	270	2	Feita	Não	0	350,0	118,8
12	22,2	51,0%	0,0	270	2	Feita	Sim	0	418,8	156,3
13	21,1	54,0%	0,0	230	Muitas	N/A	Sim	2	387,5	206,3
14	21,3	50,0%	0,0	250	Muitas	N/A	N/A	0	181,3	237,5
15	23,3	54,6%	0,0		2	Feita	Não	0	412,5	162,5
16	23,8	54,0%	0,0		Muitas	N/A	Sim	4	600,0	225,0
17	24,4	51,2%	0,0		8	Por fazer	Não	5	600,0	206,3
18	24,6	50,9%	0,0		6	Por fazer	Sim	0	400,0	181,3
19	25,6	42,2%	0,0		2	Feita	Não	0	193,8	193,8
20	25,2	43,8%	0,0		Muitas	N/A	Sim	3	337,5	293,8
21	24,9	44,3%	0,0		7	Por fazer	Não	1	493,8	225,0
22	25,1	47,7%	0,0		7	Por fazer	Não	1	475,0	168,8

Tabela 2 (continuação)

Número da amostra	Temperatura (°C)	Humidade relativa (%)	Concentração NO <sub>2</sub> (ppm)	Concentração CO <sub>2</sub> (ppm)	Número de pessoas no local	Limpeza do quarto	Ventilação prévia do local	Grau de movimentação de pessoas	Concentração bactérias totais (UFC/m <sup>3</sup> )	Concentração fungos totais (UFC/m <sup>3</sup> )
23	26,8	39,0%	0,0		Muitas	N/A	N/A	0	87,5	625,0
24	21,2	62,3%	0,1		6	N/A	Não	4	393,8	137,5
25	23,3	50,9%	0,0		23	N/A	Não	3	481,3	143,8
26	24	47,0%	0,0		14	N/A	Não	3	556,3	262,5
27	22,8	53,4%	0,0		Muitas	N/A	Não	2	375,0	156,3
28	22,3	47,2%	0,0		3	N/A	Não	0	381,3	281,3
29	23,6	45,2%	0,0		21	N/A	Não	3	418,8	206,3
30	22,3	48,6%	0,0		2	N/A	Não	0	218,8	100,0
31	22,7	45,0%	0,0		Muitas	N/A	Não	2	400,0	268,8
32	25,1	37,7%	0,0		Muitas	N/A	N/A	0	81,3	312,5
33	22,8	55,0%	0,0	290	Muitas	N/A	Sim	2	327,8	294,4
34	22,9	58,0%	0,0	270	8	N/A	Sim	4	211,1	433,3
35	23,3	55,0%	0,0	330	3	N/A	Não	2	416,7	250,0
36	23,6	54,0%	0,0	300	3	Por fazer	Não	0	481,3	156,3
37	23,6	50,0%	0,0	250	Muitas	N/A	Sim	3	531,3	575,0
38	23,9	62,0%	0,0	360	5	N/A	Sim	3	625,0	568,8
39	23,7	53,0%	0,0	320	8	N/A	Sim	3	375,0	575,0
40	24,2	50,0%	0,0	200	3	Por fazer	Não	0	250,0	543,8
41	24,9	49,0%	0,0	170	Muitas	N/A	N/A	0	131,3	612,5

Tabela 3 – Resultados relativos à identificação de colônias de bactérias amostradas no ar interior e exterior do HJA com recurso a testes bioquímicos. Não identificado – indica que a bactéria pertence a outro género que não o *Staphylococcus sp.*

Número da amostra	Número da colónia	Teste Gram	Forma celular	Tipo aglomeração celular	Teste Oxidase	Teste Catalase	Identificação bioquímica
1	4	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
1	5	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
1	8	Positivo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
1	11	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
1	12	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
1	20	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
1	26	Positivo	Cocobacilos	Não determinado	Positivo	Positivo	Não identificado
1	29	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
1	42	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
1	48	Negativo	Bacilos	Diplobacilos e Estreptobacilos	Positivo	Positivo	Não identificado
2	1	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
2	6	Positivo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
2	7	Negativo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
2	9	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
2	10	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
2	12	Negativo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
2	19	Positivo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
2	22	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
2	28	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
2	38	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
3	3	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
3	5	Positivo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
3	20	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
3	31	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
3	32	Positivo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
3	45	Positivo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
3	59	Negativo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Negativo	Não identificado
3	66	Negativo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
3	73	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
3	77	Positivo	Cocos	Não determinado	Positivo	Positivo	Não identificado
4	2	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
4	5	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
4	10	Positivo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
4	12	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
4	23	Positivo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
4	24	Negativo	Bacilos	Não determinado	Positivo	Negativo	Não identificado
4	27	Negativo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Negativo	Não identificado
4	28	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
4	30	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
4	36	Positivo	Cocos	Tétradas	Positivo	Positivo	Não identificado
5	2	Negativo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
5	14	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
5	34	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
5	46	Negativo	Cocobacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
5	48	Positivo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
5	51	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
5	58	Negativo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
5	61	Negativo	Cocos	Diplococos	Positivo	Positivo	Não identificado

Tabela 3 (continuação)

Número da amostra	Número da colônia	Teste Gram	Forma celular	Tipo aglomeração celular	Teste Oxidase	Teste Catalase	Identificação bioquímica
5	62	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
5	63	Positivo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
6	11	Positivo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
6	14	Negativo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
6	15	Positivo	Cocos	Tétradas	Negativo	Negativo	Não identificado
6	44	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
6	47	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
6	60	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
6	64	Positivo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Negativo	Não identificado
6	66	Positivo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
6	73	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
6	77	Positivo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
7	2	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
7	6	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
7	7	Negativo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
7	8	Negativo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
7	9	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
7	10	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
7	11	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
7	14	Negativo	Cocobacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
8	2	Positivo	Bacilos	Diplobacilos	Positivo	Positivo	Não identificado
8	3	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
8	9	Positivo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
8	14	Positivo	Cocos	Diplococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
8	20	Positivo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
8	24	Positivo	Cocobacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
8	26	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
8	29	Positivo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
8	34	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
8	38	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
9	17	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
9	23	Positivo	Cocos	Estafilococos	Positivo	Negativo	Não identificado
9	33	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
9	37	Positivo	Cocos	Diplococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
9	40	Positivo	Bacilos	Diplobacilos e Estreptobacilos	Positivo	Positivo	Não identificado
9	48	Positivo	Cocos	Estafilococos	Positivo	Negativo	Não identificado
9	53	Positivo	Bacilos	Diplobacilos e Estreptobacilos	Positivo	Negativo	Não identificado
9	57	Positivo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
9	65	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
9	77	Positivo	Cocos	Diplococos e tétradas	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
10	6	Positivo	Cocobacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
10	22	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
10	32	Positivo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
10	36	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
10	40	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
10	49	Positivo	Cocobacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
10	53	Positivo	Cocos	Agglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
10	64	Positivo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>

Tabela 3 (continuação)

Número da amostra	Número da colônia	Teste Gram	Forma celular	Tipo aglomeração celular	Teste Oxidase	Teste Catalase	Identificação bioquímica
10	74	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
10	92	Positivo	Cocobacilos	Não determinado	Positivo	Positivo	Não identificado
11	1	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
11	3	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
11	13	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
11	17	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
11	21	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
11	32	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
11	38	Positivo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
11	46	Positivo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
11	47	Positivo	Cocos	Estafilococos	Positivo	Positivo	Não identificado
11	50	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
12	1	Positivo	Cocos	Diplococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
12	3	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
12	20	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
12	22	Positivo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
12	25	Positivo	Cocos	Diplococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
12	36	Positivo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Negativo	Não identificado
12	48	Positivo	Cocos	Diplococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
12	49	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
12	51	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
12	65	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
13	1	Negativo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
13	5	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
13	16	Positivo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
13	30	Positivo	Cocobacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
13	34	Positivo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
13	41	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Negativo	Não identificado
13	42	Positivo	Cocos	Diplococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
13	50	Positivo	Cocobacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
13	53	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
13	55	Positivo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
14	6	Positivo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Negativo	Não identificado
14	7	Positivo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
14	10	Positivo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
14	14	Negativo	Bacilos	Diplobacilos e Estreptobacilos	Negativo	Positivo	Não identificado
14	15	Positivo	Cocobacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
14	18	Negativo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	Não identificado
14	23	Positivo	Cocobacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
14	26	Negativo	Bacilos	Diplobacilos	Negativo	Negativo	Não identificado
15	17	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
15	28	Positivo	Cocos	Diplococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
15	34	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
15	40	Negativo	Cocos e bacilos	Bacilos e tétradas	Positivo	Negativo	Não identificado
15	41	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
15	47	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
15	48	Positivo	Cocos	Diplococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
15	51	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
15	57	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>

Tabela 3 (continuação)

Número da amostra	Número da colônia	Teste Gram	Forma celular	Tipo aglomeração celular	Teste Oxidase	Teste Catalase	Identificação bioquímica
15	58	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
16	2	Positivo	Cocos	Diplococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
16	7	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
16	15	Positivo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
16	69	Positivo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
16	71	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
16	76	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Negativo	Não identificado
16	77	Positivo	Cocobacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
16	83	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
16	91	Negativo	Cocos	Não determinado	Negativo	Negativo	Não identificado
16	96	Negativo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
17	4	Positivo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
17	11	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
17	18	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
17	23	Negativo	Bacilos e cocobacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
17	38	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
17	39	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
17	42	Negativo	Bacilos e cocobacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
17	83	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
17	86	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Negativo	Não identificado
17	91	Negativo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
18	9	Negativo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
18	12	Negativo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
18	17	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
18	19	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
18	26	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
18	27	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
18	42	Negativo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
18	45	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
18	54	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
18	60	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
19	1	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
19	5	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
19	6	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
19	8	Negativo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
19	13	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
19	20	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
19	22	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
19	23	Positivo	Bacilos	Estreptobacilos	Negativo	Positivo	Não identificado
19	24	Positivo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
19	27	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
20	5	Positivo	Bacilos	Não determinado	Positivo	Positivo	Não identificado
20	10	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
20	14	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
20	40	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
20	41	Positivo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
20	45	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
20	47	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
20	48	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>

Tabela 3 (continuação)

Número da amostra	Número da colônia	Teste Gram	Forma celular	Tipo aglomeração celular	Teste Oxidase	Teste Catalase	Identificação bioquímica
20	50	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
20	53	Positivo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
21	2	Positivo	Cocos	Não determinado	Positivo	Positivo	Não identificado
21	8	Positivo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
21	10	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
21	18	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
21	50	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
21	53	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
21	61	Positivo	Bacilos	Diplobacilos	Negativo	Positivo	Não identificado
21	64	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
21	68	Negativo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
21	74	Positivo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
22	6	Positivo	Cocos	Diplococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
22	10	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
22	11	Positivo	Bacilos	Estreptobacilos	Positivo	Positivo	Não identificado
22	16	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
22	22	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
22	25	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
22	30	Negativo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	Não identificado
22	35	Positivo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
22	37	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
22	68	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
23	1	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
23	6	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
23	13	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
23	14	Positivo	Bacilos	Diplobacilos	Negativo	Positivo	Não identificado
24	15	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
24	20	Positivo	Cocos	Diplococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
24	25	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
24	36	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
24	42	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
24	44	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
24	57	Negativo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	Não identificado
24	60	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
24	61	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
24	63	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
25	1	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
25	9	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
25	14	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
25	15	Positivo	Cocos	Aglomerado	Positivo	Negativo	Não identificado
25	26	Positivo	Cocos	Diplococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
25	36	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
25	57	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
25	59	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
25	60	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
25	62	Positivo	Bacilos	Aglomerado	Negativo	Positivo	Não identificado
26	1	Positivo	Bacilos	Estreptobacilos	Negativo	Positivo	Não identificado
26	6	Negativo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
26	19	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
26	44	Positivo	Cocos	Aglomerado	Positivo	Positivo	Não identificado
26	68	Negativo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	Não identificado

Tabela 3 (continuação)

Número da amostra	Número da colônia	Teste Gram	Forma celular	Tipo aglomeração celular	Teste Oxidase	Teste Catalase	Identificação bioquímica
26	70	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
26	74	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
26	79	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
26	82	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
26	83	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
27	3	Positivo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
27	10	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
27	16	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
27	20	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
27	23	Positivo	Bacilos	Aglomerado	Positivo	Positivo	Não identificado
27	39	Positivo	Cocos e cocobacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
27	48	Positivo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
27	55	Positivo	Bacilos	Aglomerado	Negativo	Positivo	Não identificado
27	57	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
27	60	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
28	2	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
28	4	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
28	7	Negativo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Negativo	Não identificado
28	24	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
28	26	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
28	27	Positivo	Cocobacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
28	31	Positivo	Cocos e bacilos	Diplococos e diplobacilos	Positivo	Negativo	Não identificado
28	38	Negativo	Bacilos	Não determinado	Positivo	Positivo	Não identificado
28	53	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
28	61	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
29	2	Positivo	Bacilos	Estreptobacilos	Negativo	Positivo	Não identificado
29	6	Positivo	Bacilos	Aglomerado	Negativo	Positivo	Não identificado
29	15	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
29	28	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
29	42	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
29	43	Positivo	Bacilos	Aglomerado	Negativo	Positivo	Não identificado
29	45	Positivo	Bacilos	Estreptobacilos	Negativo	Negativo	Não identificado
29	52	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
29	59	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
29	66	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
30	1	Positivo	Bacilos	Estreptobacilos	Negativo	Negativo	Não identificado
30	6	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
30	7	Negativo	Cocos	Diplococos e tétradas	Negativo	Positivo	Não identificado
30	10	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
30	11	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
30	15	Negativo	Bacilos	Aglomerado	Negativo	Positivo	Não identificado
30	17	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
30	29	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
30	32	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Negativo	Não identificado
30	33	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
31	3	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Negativo	Não identificado
31	6	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
31	16	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>

Tabela 3 (continuação)

Número da amostra	Número da colônia	Teste Gram	Forma celular	Tipo aglomeração celular	Teste Oxidase	Teste Catalase	Identificação bioquímica
31	22	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
31	27	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
31	38	Negativo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	Não identificado
31	40	Negativo	Bacilos	Estreptobacilos	Positivo	Positivo	Não identificado
31	46	Positivo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
31	60	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
31	62	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
32	1	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
32	3	Negativo	Bacilos	Estreptobacilos	Negativo	Positivo	Não identificado
32	4	Negativo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Negativo	Não identificado
32	7	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
32	12	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
32	13	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
33	9	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
33	18	Positivo	Cocobacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
33	23	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
33	38	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
33	51	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Negativo	Não identificado
33	52	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
33	53	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
33	55	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
33	57	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
33	58	Positivo	Cocobacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
34	4	Positivo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
34	10	Positivo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Negativo	Não identificado
34	17	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
34	20	Positivo	Cocos	Aglomerado	Positivo	Positivo	Não identificado
34	21	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
34	24	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
34	25	Positivo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
34	27	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
34	33	Positivo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Negativo	Não identificado
34	37	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
35	9	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
35	10	Positivo	Bacilos	Diplobacilos	Negativo	Positivo	Não identificado
35	14	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
35	20	Negativo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	Não identificado
35	41	Negativo	Bacilos	Estreptobacilos	Negativo	Positivo	Não identificado
35	43	Positivo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
35	45	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
35	54	Positivo	Bacilos	Diplobacilos	Negativo	Positivo	Não identificado
35	67	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
35	73	Positivo	Bacilos	Diplobacilos	Negativo	Positivo	Não identificado
36	5	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
36	7	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
36	9	Negativo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Negativo	Não identificado
36	17	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
36	22	Positivo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
36	44	Negativo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
36	49	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
36	59	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>

Tabela 3 (continuação)

Número da amostra	Número da colônia	Teste Gram	Forma celular	Tipo aglomeração celular	Teste Oxidase	Teste Catalase	Identificação bioquímica
36	69	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
36	77	Positivo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
37	1	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
37	16	Positivo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
37	21	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
37	24	Negativo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Negativo	Não identificado
37	32	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
37	37	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
37	45	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
37	51	Negativo	Bacilos	Não determinado	Positivo	Positivo	Não identificado
37	62	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
37	85	Positivo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
38	1	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
38	2	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
38	3	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
38	4	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
38	5	Positivo	Bacilos	Estreptobacilos	Negativo	Positivo	Não identificado
38	7	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
38	8	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
38	11	Positivo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Negativo	Não identificado
38	15	Positivo	Bacilos	Estreptobacilos	Negativo	Positivo	Não identificado
38	16	Negativo	Bacilos	Estreptobacilos	Negativo	Negativo	Não identificado
39	6	Positivo	Cocos e bacilos	Não determinado	Negativo	Negativo	Não identificado
39	11	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
39	15	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
39	20	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
39	23	Positivo	Cocos	Diplococos	Positivo	Positivo	Não identificado
39	29	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
39	39	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
39	43	Negativo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	Não identificado
39	46	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
39	48	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
40	1	Negativo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
40	4	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
40	5	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
40	6	Positivo	Cocos	Tétradas	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
40	7	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
40	14	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
40	29	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
40	30	Positivo	Cocos e bacilos	Não determinado	Positivo	Positivo	Não identificado
40	36	Positivo	Cocos	Aglomerado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
40	39	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
41	1	Positivo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
41	5	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
41	6	Positivo	Cocos	Não determinado	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
41	7	Negativo	Bacilos	Não determinado	Negativo	Positivo	Não identificado
41	15	Positivo	Cocos	Estafilococos	Negativo	Positivo	<i>Staphylococcus sp.</i>
41	18	Negativo	Bacilos	Diplobacilos	Negativo	Positivo	Não identificado

Tabela 4 – Resultados relativos à identificação de colônias de bactérias amostradas no ar interior e exterior do HJA com recurso a técnicas moleculares, nomeadamente padrão de RFLP com as enzimas de restrição *HhaI* e *HaeIII* e sequenciação do gene 16S rRNA. Campos vazios indicam ausência de dados.

Número da amostra	Número da colônia	Padrão de RFLP combinado ( <i>HhaI-HaeIII</i> ) (=Nome da OTU)	Identificação genética	Origem da identificação genética
2	1	L-K		
2	6	AP-N		
2	7	W-M	<i>Moraxella osloensis</i> ou <i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	Homologia RFLP
2	9	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
2	10	E-A		
2	19	AB-H		
2	22	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
2	28	J-J		
2	38	Z-I		
3	3	A-B	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Sequenciação
3	5	Y-C		
3	20	A-B	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
3	31	A-B	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
3	32	A-B	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
3	45	P-D	<i>Micrococcus luteus</i>	Sequenciação
3	66	E-U		
3	73	A-B	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
3	77	A-AL		
4	2	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
4	5	R-C		
4	10	AN-D	<i>Micrococcus sp.</i>	Sequenciação
4	12	AR-AD		
4	23	AQ-AX		
4	24	AS-AO		
4	27	AE-Z	<i>Bacillus simplex</i>	Homologia RFLP
4	28	AD-C		
4	30	AD-C		
4	36	AK-B		
6	11	K-BD		
6	44	AC-C		
6	47	L-AN		
6	60	AD-A	<i>Staphylococcus caprae</i>	Homologia RFLP
6	64	T-A	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Homologia RFLP
6	73	AF-A		
9	17	AD-A	<i>Staphylococcus caprae</i>	Homologia RFLP
9	23	T-A	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Homologia RFLP
9	33	AK-C		
9	37	AK-AW		
9	40	W-M	<i>Moraxella osloensis</i> ou <i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	Sequenciação
9	48	AK-A	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Homologia RFLP
9	57	T-A	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Homologia RFLP
9	65	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Sequenciação
9	77	R-D	<i>Kocuria palustris</i>	Sequenciação
11	1	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
11	3	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
11	13	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
11	21	AB-AW		
11	32	Q-Q		

Tabela 4 (continuação)

Número da amostra	Número da colônia	Padrão de RFLP combinado ( <i>HhaI-HaeIII</i> ) (=Nome da OTU)	Identificação genética	Origem da identificação genética
11	38	P-P		
11	46	AG-C		
11	47	U-BA		
11	50	R-R		
14	10	AE-Z	<i>Bacillus simplex</i>	Sequenciação
14	15	AI-S	<i>Gordonia alkanivorans</i>	Sequenciação
14	18	J-V	<i>Staphylococcus hominis hominis</i>	Sequenciação
14	26	E-E		
15	17	K-AK		
15	28	C-C		
15	34	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
15	47	AG-P		
15	48	P-P		
15	51	AD-A	<i>Staphylococcus caprae</i>	Sequenciação
15	57	AG-AZ		
16	69	S-S		
16	71	AF-A		
16	76	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
16	83	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
17	11	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
17	18	T-A	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Homologia RFLP
17	23	O-O		
17	39	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
17	42	AP-AR		
17	83	F-AN		
17	86	AH-A		
17	91	AK-A	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Homologia RFLP
18	17	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
18	19	F-F		
18	26	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
18	27	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
18	45	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
18	54	AD-A	<i>Staphylococcus caprae</i>	Homologia RFLP
18	60	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
19	1	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
19	5	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
19	6	AD-A	<i>Staphylococcus caprae</i>	Homologia RFLP
19	8	AG-D	<i>Micrococcus luteus</i>	Homologia RFLP
19	13	N-Y	<i>Staphylococcus kloosii</i>	Homologia RFLP
19	20	T-A	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Homologia RFLP
19	22	A-AM		
20	5	T-AA		
20	10	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
20	14	AD-AK		
20	45	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
21	2	AT-M		
21	8	AG-D	<i>Micrococcus luteus</i>	Homologia RFLP
21	10	AP-BE		
21	18	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
21	50	X-AB		

Tabela 4 (continuação)

Número da amostra	Número da colônia	Padrão de RFLP combinado ( <i>HhaI-HaeIII</i> ) (=Nome da OTU)	Identificação genética	Origem da identificação genética
21	53	T-A	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Sequenciação
21	61	AO-C		
21	64	T-A	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Homologia RFLP
21	68	AE-AQ		
21	74	T-T		
22	6	R-D	<i>Kocuria palustris</i>	Homologia RFLP
22	10	A-B	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
22	11	AW-AF		
22	22	M-AY		
22	25	T-A	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Homologia RFLP
22	30	P-D	<i>Micrococcus luteus</i>	Homologia RFLP
22	35	AA-AV		
23	1	AD-A	<i>Staphylococcus caprae</i>	Homologia RFLP
23	6	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
23	14	AE-AE	<i>Planococcus sp.</i>	Sequenciação
24	15	AD-A	<i>Staphylococcus caprae</i>	Homologia RFLP
24	20	AD-A	<i>Staphylococcus caprae</i>	Homologia RFLP
24	36	A-AD		
24	44	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
24	57	AG-C		
24	63	D-D		
25	1	AD-B		
25	9	T-A	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Homologia RFLP
25	14	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
25	15	AU-AU	<i>Paracoccus yeei</i>	Sequenciação
25	26	AQ-AC		
25	36	AK-A	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Homologia RFLP
25	57	I-AH	<i>Paracoccus yeei</i>	Sequenciação
25	59	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
25	60	AV-D		
26	79	T-A	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Homologia RFLP
26	83	T-A	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Homologia RFLP
27	16	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
27	23	AU-L		
27	48	H-BB		
27	55	W-M	<i>Moraxella osloensis</i> ou <i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	Homologia RFLP
27	57	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
27	60	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
28	53	AD-A	<i>Staphylococcus caprae</i>	Homologia RFLP
28	61	R-AI	<i>Kocuria rhizophila</i>	Sequenciação
29	6	S-AG		
29	42	AD-Y		
29	45	AE-L	<i>Bacillus granadensis</i>	Sequenciação
29	52	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
29	66	K-AK		
30	1	AE-L	<i>Bacillus granadensis</i>	Homologia RFLP
30	11	AE-AS	<i>Crocinosbacterium jejui</i>	Sequenciação
30	17	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
30	32	T-A	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Homologia RFLP
30	33	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP

Tabela 4 (continuação)

Número da amostra	Número da colônia	Padrão de RFLP combinado ( <i>HhaI-HaeIII</i> ) (=Nome da OTU)	Identificação genética	Origem da identificação genética
31	3	T-B	<i>Staphylococcus sp.</i>	Homologia RFLP
31	46	AU-AU	<i>Paracoccus yeei</i>	Homologia RFLP
31	60	AG-D	<i>Micrococcus luteus</i>	Sequenciação
31	62	Q-Q		
32	1	P-D	<i>Micrococcus luteus</i>	Homologia RFLP
32	4	AP-W		
33	38	N-Y	<i>Staphylococcus kloosii</i>	Sequenciação
33	51	AJ-AJ		
33	52	R-AI	<i>Kocuria rhizophila</i>	Homologia RFLP
33	53	AN-D	<i>Micrococcus sp.</i>	Homologia RFLP
33	55	T-B	<i>Staphylococcus sp.</i>	Homologia RFLP
33	58	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
34	17	R-D	<i>Kocuria palustris</i>	Homologia RFLP
34	20	K-A		
34	21	R-P		
34	24	R-AI	<i>Kocuria rhizophila</i>	Homologia RFLP
34	25	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
34	27	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
34	33	AA-AT		
35	10	AL-AP	<i>Lactococcus lactis lactis</i>	Sequenciação
35	14	AM-Z		
35	41	I-C		
35	45	T-B	<i>Staphylococcus sp.</i>	Homologia RFLP
35	54	AE-X		
35	67	AK-A	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Sequenciação
35	73	AJ-K	<i>Exiguobacterium homiense</i>	Sequenciação
36	17	AD-A	<i>Staphylococcus caprae</i>	Homologia RFLP
36	44	AD-A	<i>Staphylococcus caprae</i>	Homologia RFLP
36	59	AK-A	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Homologia RFLP
36	77	AE-AS	<i>Crocobacterium jejui</i>	Homologia RFLP
37	16	AF-BC	<i>Corynebacterium sp.</i>	Sequenciação
37	21	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
37	32	T-B	<i>Staphylococcus sp.</i>	Sequenciação
37	37	T-AD		
37	45	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
37	62	P-C		
38	3	AE-AZ		
38	4	AE-V		
38	7	AE-AZ		
39	6	AE-L	<i>Bacillus granadensis</i>	Homologia RFLP
39	20	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP
39	43	L-E		
40	5	AD-A	<i>Staphylococcus caprae</i>	Homologia RFLP
41	5	A-A	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia RFLP

Tabela 5 – Listagem de colônias bacterianas amostradas no ar interior do HJA pertencentes a cada OTU e respectiva quantidade de amostras identificadas por sequenciação do gene 16s rRNA, por similaridade de padrão de RFLP ou não identificadas.

Nome da OTU (padrão de RFLP)	Número de bactérias pertencentes à OTU	Porcentagem do total de bactérias analisadas %	Número de bactérias da OTU identificadas por sequenciação	Número de bactérias da OTU identificadas por similaridade de padrão de RFLP	Número de bactérias da OTU não identificadas
A-A	37	10%	1	36	
T-A	12	3%	1	11	
AD-A	11	3%	1	10	
A-B	6	2%	1	5	
AK-A	5	1%	1	4	
T-B	4	1%	1	3	
AE-L	3	1%	1	2	
AG-D	3	1%	1	2	
R-AI	3	1%	1	2	
R-D	3	1%	1	2	
W-M	3	1%	1	2	
AD-C	2	1%			2
AE-AS	2	1%	1	1	
AE-AZ	2	1%			2
AF-A	2	1%			2
AG-C	2	1%			2
AN-D	2	1%	1	1	
AU-AU	2	1%	1	1	
K-AK	2	1%			2
N-Y	2	1%	1	1	
P-D	2	1%	1	1	
P-P	2	1%			2
Q-Q	2	1%			2
AA-AT	1	0%			1
AA-AV	1	0%			1
A-AD	1	0%			1
A-AL	1	0%			1
A-AM	1	0%			1
AB-AW	1	0%			1
AB-H	1	0%			1
AC-C	1	0%			1
AD-AK	1	0%			1
AD-B	1	0%			1
AD-Y	1	0%			1
AE-AQ	1	0%			1
AE-V	1	0%			1
AE-X	1	0%			1
AE-Z	1	0%		1	
AF-BC	1	0%	1		
AG-AZ	1	0%			1
AG-P	1	0%			1
AH-A	1	0%			1
AJ-AJ	1	0%			1
AJ-K	1	0%	1		
AK-AW	1	0%			1
AK-B	1	0%			1
AK-C	1	0%			1
AL-AP	1	0%	1		

Tabela 5 (continuação)

Nome da OTU (padrão de RFLP)	Número de bactérias pertencentes à OTU	Porcentagem do total de bactérias analisadas %	Número de bactérias da OTU identificadas por sequenciação	Número de bactérias da OTU identificadas por similaridade de padrão de RFLP	Número de bactérias da OTU não identificadas
AM-Z	1	0%			1
AO-C	1	0%			1
AP-AR	1	0%			1
AP-BE	1	0%			1
AP-N	1	0%			1
AQ-AC	1	0%			1
AQ-AX	1	0%			1
AR-AD	1	0%			1
AS-AO	1	0%			1
AT-M	1	0%			1
AU-L	1	0%			1
AV-D	1	0%			1
AW-AF	1	0%			1
C-C	1	0%			1
D-D	1	0%			1
E-A	1	0%			1
E-U	1	0%			1
F-AN	1	0%			1
F-F	1	0%			1
H-BB	1	0%			1
I-AH	1	0%	1		
I-C	1	0%			1
J-J	1	0%			1
K-A	1	0%			1
K-BD	1	0%			1
L-AN	1	0%			1
L-E	1	0%			1
L-K	1	0%			1
M-AY	1	0%			1
O-O	1	0%			1
P-C	1	0%			1
R-C	1	0%			1
R-P	1	0%			1
R-R	1	0%			1
S-AG	1	0%			1
S-S	1	0%			1
T-AA	1	0%			1
T-AD	1	0%			1
T-T	1	0%			1
U-BA	1	0%			1
X-AB	1	0%			1
Y-C	1	0%			1
Z-I	1	0%			1
Não identificado	178	49%			178
Total Geral	360	100%	20	85	255

Tabela 6 – Listagem de colônias bacterianas amostradas no ar exterior do HJA pertencentes a cada OTU e respectiva quantidade de amostras identificadas por sequenciação do gene 16s rRNA, por similaridade de padrão de RFLP ou não identificadas.

Nome da OTU (padrão de RFLP)	Número de bactérias pertencentes à OTU	Porcentagem do total de bactérias analisadas %	Número de bactérias da OTU identificadas por sequenciação	Número de bactérias da OTU identificadas por similaridade de padrão de RFLP	Número de bactérias da OTU não identificadas
A-A	2	6%		2	
AD-A	1	3%		1	
AE-AE	1	3%	1		
AE-Z	1	3%	1		
AI-S	1	3%	1		
AP-W	1	3%			1
E-E	1	3%			1
J-V	1	3%	1		
P-D	1	3%		1	
Não identificado	22	69%			22
Total Geral	32	100%	4	4	24

Tabela 7 – Resultados da identificação das amostras sequenciadas pela base de dados *Bio Informatic Bacteria Identification* (BIBI). Homologia (N) - número de nucleótidos iguais entre sequências / número de nucleótidos totais da sequência da amostra; Gaps (N) – número de espaços introduzidos nas sequências para obtenção do melhor alinhamento possível; Score (bits) – Pontuação atribuída à qualidade do alinhamento. Referências bibliográficas relativas às sinonímias: 1-Sneath (1992), 2-Arenskötter *et al* (2005), 3-IJSEM (2003), 4-CCUG

Número da amostra	Número da colónia	Identificação final da base de dados BIBI	Crítérios para identificação final	Identificação original automática da base de dados BIBI	Sequência(s) com maior homologia e número de acesso no GenBank	Homologia (N)	Homologia (%)	Gaps (N)	Gaps (%)	Score (bits)
3	3	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia máxima	<i>Staphylococcus cohnii</i> , <i>S. cohnii urealyticus</i> , <i>S. cohnii cohnii</i> , <i>S. nepalensis</i>	<i>Staphylococcus cohnii urealyticum</i> (AB009936) ( <i>syn. S. cohnii urealyticus</i> ) <sup>1</sup>	661/661	100%	0	0%	1310
3	45	<i>Micrococcus luteus</i>	Sem dúvidas	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i> (AJ536198), <i>Micrococcus luteus</i> (AF542073)	582/584	99,66%	0	0%	1147
4	10	<i>Micrococcus sp.</i>	Taxon comum	<i>Micrococcus luteus</i> , <i>M. thailandicus</i>	<i>Micrococcus luteus</i> (AJ536198), <i>Micrococcus luteus</i> (AF542073) <i>Micrococcus thailandicus</i> (AB247644)	489/504	97,02%	0	0%	904
9	40	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i> ou <i>Moraxella osloensis</i>	Sem dúvidas	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i> (AJ550856) (= <i>Moraxella osloensis</i> ) <sup>4</sup>	724/727	99,59%	0	0%	1427
9	65	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Homologia máxima	<i>Staphylococcus cohnii</i> , <i>S. cohnii urealyticus</i> , <i>S. cohnii cohnii</i>	<i>Staphylococcus cohnii urealyticum</i> (AB009936) ( <i>syn. S. cohnii urealyticus</i> ) <sup>1</sup>	1372/1372	100%	0	0%	2720
9	77	<i>Kocuria palustris</i>	Sem dúvidas	<i>Kocuria palustris</i>	<i>Kocuria palustris</i> (Y16263)	669/669	100%	0	0%	1326
14	10	<i>Bacillus simplex</i>	Sem dúvidas	<i>Bacillus simplex</i>	<i>Bacillus simplex</i> (AJ628743), <i>Bacillus simplex</i> (AB363738)	906/906	100%	0	0%	1796
14	15	<i>Gordonia alkanivorans</i>	Sem dúvidas	<i>Gordonia alkanivorans</i>	<i>Gordonia nitida</i> (AF148947) ( <i>syn. G. alkanivorans</i> ) <sup>2</sup>	833/834	99,88%	0	0%	1651
14	18	<i>Staphylococcus hominis hominis</i>	Homologia máxima	<i>Staphylococcus hominis</i> , <i>S. hominis hominis</i>	<i>Staphylococcus hominis hominis</i> (Z26905)	492/492	100%	0	0%	975
15	51	<i>Staphylococcus capitis</i> ou <i>S. caprae</i>	Homologia máxima	<i>Staphylococcus caprae</i> , <i>S. capitis</i> , <i>S. capitis urealyticus</i> , <i>S. capitis capitis</i>	<i>Staphylococcus capitis urealyticus</i> (AB233325), <i>S. caprae</i> (AB009935)	730/730	100%	0	0%	1447
21	53	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Sem dúvidas	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (AP006716), <i>Staphylococcus haemolyticus</i> (D83367)	662/662	100%	0	0%	1312
23	14	<i>Planococcus sp.</i>	Árvore filogenética	Nenhuma identificação	<i>Planococcus rifitiensis</i> (AJ493659)	532/556	95,68%	0	0%	934

Tabela 7 (continuação)

Número da amostra	Número da colônia	Identificação final da base de dados BIBI	Critérios para identificação final	Identificação original automática da base de dados BIBI	Sequência(s) com maior homologia e número de acesso no GenBank	Homologia (N)	Homologia (%)	Gaps (N)	Gaps (%)	Score (bits)
25	15	<i>Paracoccus yeei</i>	Homologia máxima	<i>Paracoccus yeei</i> , <i>P. carotinifaciens</i>	<i>Paracoccus yeeii</i> (AY014173) (syn. <i>Paracoccus yeei</i> ) <sup>3</sup>	576/576	100%	0	0%	1142
25	57	<i>Paracoccus yeei</i>	Sem dúvidas	<i>Paracoccus yeei</i>	<i>Paracoccus yeeii</i> (AY014173) (syn. <i>Paracoccus yeei</i> ) <sup>3</sup>	729/730	99,86%	0	0%	1441
28	61	<i>Kocuria rhizophila</i>	Homologia máxima	<i>Kocuria rhizophila</i> , <i>K. varians</i>	<i>Kocuria rhizophila</i> (Y16264)	833/834	99,88%	0	0%	1651
29	45	<i>Bacillus granadensis</i>	Baixa homologia e árvore filogenética	<i>Bacillus granadensis</i>	<i>Bacillus granadensis</i> (DQ400692)	644/657	98,02%	6	0,91 %	1167
30	11	<i>Crocino bacterium jejui</i>	Baixa homologia e árvore filogenética	<i>Crocino bacterium jejui</i>	<i>Crocino bacterium jejui</i> (AM295339)	653/664	98,34%	1	0,15 %	1226
31	60	<i>Micrococcus luteus</i>	Sem dúvidas	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i> (AJ536198), <i>Micrococcus luteus</i> (AF542073)	671/671	100%	0	0%	1330
33	38	<i>Staphylococcus kloosii</i>	Sem dúvidas	<i>Staphylococcus kloosii</i>	<i>Staphylococcus kloosii</i> (AB009940)	727/727	100%	0	0%	1441
35	10	<i>Lactococcus lactis lactis</i>	Sem dúvidas	<i>Lactococcus lactis lactis</i>	<i>Lactococcus lactis lactis</i> (AB100803), <i>Lactococcus lactis lactis</i> (AB008215)	739/740	99,86%	0	0%	1459
35	67	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Sem dúvidas	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (AP006716), <i>Staphylococcus haemolyticus</i> (D83367)	735/735	100%	0	0%	1457
35	73	<i>Exiguobacterium homiense</i>	Homologia máxima	<i>Exiguobacterium homiense</i> , <i>E. aurantiacum</i>	<i>Exiguobacterium homiense</i> (DQ351341)	736/739	99,59%	0	0%	1441
37	16	<i>Corynebacterium sp.</i>	Baixa homologia e árvore filogenética	<i>Corynebacterium afermentans</i>	<i>Corynebacterium afermentans</i> (X82055), <i>Corynebacterium afermentans</i> (X82054)	467/498	93,78%	2	0,40 %	780
37	32	<i>Staphylococcus sp.</i>	Árvore filogenética	Nenhuma identificação	<i>Staphylococcus hominis</i> (X66101)	526/565	93,10%	4	0,71 %	856

Tabela 8 – Resultados da identificação das amostras sequenciadas pela base de dados *GenBank* do NCBI. Homologia (N) - número de nucleótidos iguais entre sequências / número de nucleótidos totais da sequência da amostra; *Gaps* (N) – número de espaços introduzidos nas sequências para obtenção do melhor alinhamento possível; *Score* (*bits*) – Pontuação atribuída à qualidade do alinhamento.

Número da amostra	Número da colônia	Identificação final pela base de dados <i>GenBank</i>	Critérios para identificação final	Identificação taxonômica das sequências com homologia máxima no <i>GenBank</i> ( <i>nucleotide collection</i> ) e número de ocorrências	Número de sequências com homologia máxima	Homologia (N)	Homologia (%)	<i>Gaps</i> (N)	<i>Gaps</i> (%)	<i>Score</i> ( <i>bits</i> )	Número de acesso no <i>GenBank</i> (sequência do primeiro taxon listado)
3	3	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Sem dúvidas	(1x) <i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i> , (4x) <i>Staphylococcus cohnii</i> , (5x) <i>Staphylococcus sp.</i> , (2x) Não identificado	12	661/661	100%	0	0%	1221	GQ169065
3	45	<i>Micrococcus luteus</i>	Sem dúvidas	(38x) <i>Micrococcus luteus</i> , (27x) <i>Micrococcus sp.</i> , (2x) Não identificado	67	583/584	99,83%	0	0%	1075	HM163485
4	10	<i>Micrococcus luteus</i>	Sem dúvidas	(14x) <i>Micrococcus luteus</i> , (18x) <i>Micrococcus sp.</i> , (1x) Não identificado	33	492/504	97,62%	0	0%	887	AF057289
9	40	Família Moraxellaceae	Taxon comum	(7x) <i>Moraxella osloensis</i> , (9x) <i>Moraxella sp.</i> , (1x) <i>Enhydrobacter sp.</i> , (2x) Não identificado	19	726/727	99,86%	0	0%	1339	AY730714
9	65	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Sem dúvidas	(1x) <i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i> , (2x) <i>Staphylococcus cohnii</i> , (2x) <i>Staphylococcus sp.</i> , (1x) Não identificado	6	1372/1372	100%	0	0%	2534	GQ169065
9	77	<i>Kocuria palustris</i>	Sem dúvidas	(6x) <i>Kocuria palustris</i> , (24x) <i>Kocuria sp.</i> , (2x) Não identificado	32	669/669	100%	0	0%	1236	EU333883
14	10	<i>Bacillus sp.</i>	Taxon comum mais provável	(18x) <i>Bacillus simplex</i> , (59x) <i>Bacillus sp.</i> , (1x) <i>Bacillus muralis</i> , (5x) <i>Brevibacterium sp.</i> , (2x) <i>Brevibacterium frigoritolerans</i> , (9x) Não identificado	94	906/906	100%	0	0%	1674	HM032850

Tabela 8 (continuação)

Número da amostra	Número da colônia	Identificação final pela base de dados GenBank	Crítérios para identificação final	Identificação taxonômica das sequências com homologia máxima no GenBank (nucleotide collection) e número de ocorrências	Número de sequências com homologia máxima	Homologia (N)	Homologia (%)	Gaps (N)	Gaps (%)	Score (bits)	Número de acesso no GenBank (sequência do primeiro taxon listado)
14	15	<i>Gordonia alkanivorans</i> (syn. <i>G. nitida</i> )	Sem dúvidas	(6x) <i>Gordonia alkanivorans</i> , (1x) <i>Gordonia nitida</i> , (8x) <i>Gordonia sp.</i>	15	833/834	99,88%	0	0%	1537	AB065369
14	18	<i>Staphylococcus hominis hominis</i>	Sem dúvidas	(1x) <i>Staphylococcus hominis hominis</i> , (4x) <i>Staphylococcus hominis</i> , (7x) <i>Staphylococcus sp.</i>	12	492/492	100%	0	0%	909	GQ222404
15	51	<i>Staphylococcus sp.</i>	Taxon comum	(9x) <i>Staphylococcus capitis</i> , (5x) <i>Staphylococcus epidermidis</i> , (1x) <i>Staphylococcus caprae</i> , (1x) <i>Staphylococcus sp.</i> (1x) Não identificado	18	730/730	100%	0	0%	1349	FJ380964
21	53	<i>Staphylococcus sp.</i>	Taxon comum mais provável	(9x) <i>Staphylococcus haemolyticus</i> , (1x) <i>Staphylococcus auricularis</i> , (1x) <i>Staphylococcus warneri</i> , (4x) <i>Staphylococcus sp.</i> , (1x) <i>Pseudomonas sp.</i> , (2x) Não identificado	18	662/662	100%	0	0%	1223	FJ999931
23	14	Família Planococcaceae	Taxon comum	(1x) <i>Planococcus sp.</i> , (1x) <i>Planomicrobium sp.</i>	2	536/556	96,40%	0	0%	937	DQ667107 e AM403524
25	15	<i>Paracoccus yeei</i>	Sem dúvidas	(7x) <i>Paracoccus yeei</i> , (1x) <i>Paracoccus sp.</i>	8	576/576	100%	0	0%	1064	GU083584
25	57	<i>Paracoccus yeei</i>	Sem dúvidas	(7x) <i>Paracoccus yeei</i> , (1x) <i>Paracoccus sp.</i>	8	729/730	99,86%	0	0%	1345	GU083584
28	61	<i>Kocuria rhizophila</i>	Sem dúvidas	(4x) <i>Kocuria rhizophila</i> , (1x) <i>Kocuria sp.</i>	5	833/834	99,9%	0	0%	1537	EU934094
29	45	<i>Bacillus sp.</i>	Taxon comum	(2x) <i>Bacillus flexus</i> , (1x) <i>Bacillus bataviensis</i> , (11x) <i>Bacillus sp.</i> , (1x) Não identificado	15	658/659	99,85%	0	0%	1214	DQ870687

Tabela 8 (continuação)

Número da amostra	Número da colônia	Identificação final pela base de dados GenBank	CrITÉrios para identificação final	Identificação taxonômica das sequências com homologia máxima no GenBank ( <i>nucleotide collection</i> ) e número de ocorrências	Número de sequências com homologia máxima	Homologia (N)	Homologia (%)	Gaps (N)	Gaps (%)	Score (bits)	Número de acesso no GenBank (sequência do primeiro taxon listado)
30	11	<i>Bacillus sp.</i>	Sem dúvidas	(1x) <i>Bacillus sp.</i>	1	660/662	99,70%	0	0%	1214	EU784649
31	60	<i>Micrococcus sp.</i>	Taxon comum mais provável	(9x) <i>Micrococcus luteus</i> , (8x) <i>Micrococcus sp.</i> , (2x) <i>Micrococcus yunnanensis</i> , (1x) <i>Variovorax sp.</i> , (3x) Não identificado	23	671/671	100%	0	0%	1240	AJ536198
33	38	<i>Staphylococcus kloosii</i>	Sem dúvidas	(2x) <i>Staphylococcus kloosii</i>	2	727/727	100%	0	0%	1343	AB009940
35	10	<i>Lactococcus lactis lactis</i>	Sem dúvidas	(3x) <i>Lactococcus lactis lactis</i>	3	740/740	100%	0	0%	1367	AB278680
35	67	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Taxon comum mais provável	(7x) <i>Staphylococcus haemolyticus</i> , (2x) <i>Staphylococcus sp.</i> , (1x) <i>Pseudomonas</i> , (2x) Não identificado	12	735/735	100%	0	0%	1358	EU373517
35	73	<i>Exiguobacterium sp.</i>	Sem dúvidas	(2x) <i>Exiguobacterium sp.</i>	2	738/739	99,86%	1	0,14%	1358	GU933587
37	16	<i>Corynebacterium sp.</i>	Sem dúvidas	(1x) <i>Corynebacterium sp.</i>	1	473/504	93,85%	1/504	0,20%	774	FN295567
37	32	<i>Staphylococcus sp.</i>	Taxon comum mais provável	(1x) <i>Staphylococcus hominis hominis</i> , (21x) <i>Staphylococcus hominis</i> , (16x) <i>Staphylococcus sp.</i> , (1x) <i>Staphylococcus warneri</i> , (1x) <i>Staphylococcus hyicus</i> , (1x) <i>Lysinibacillus sphaericus</i> , (3x) Não identificado	44	527/565	93,27%	4/565	0,71%	893	HM163532

Tabela 9 – Resultados da identificação das amostras sequenciadas pela base de dados *Ribosomal Database Project* (RDP).

Número da amostra	Número da colónia	Identificação da base de dados <i>Ribosomal Database Project</i> (RDP)	Probabilidade de pertencer ao género (nível confiança 95%)
3	3	<i>Staphylococcus sp.</i>	100%
3	45	<i>Micrococcus sp.</i>	100%
4	10	<i>Micrococcus sp.</i>	98%
9	40	<i>Enhydrobacter sp.</i>	100%
9	65	<i>Staphylococcus sp.</i>	100%
9	77	<i>Kocuria sp.</i>	100%
14	10	<i>Bacillus sp.</i>	100%
14	15	<i>Gordonia sp.</i>	100%
14	18	<i>Staphylococcus sp.</i>	100%
15	51	<i>Staphylococcus sp.</i>	100%
21	53	<i>Staphylococcus sp.</i>	100%
23	14	<i>Planomicrobium sp.</i>	43%
25	15	<i>Paracoccus sp.</i>	100%
25	57	<i>Paracoccus sp.</i>	100%
28	61	<i>Kocuria sp.</i>	100%
29	45	<i>Bacillus sp.</i>	99%
30	11	<i>Bacillus sp.</i>	44%
31	60	<i>Micrococcus sp.</i>	100%
33	38	<i>Staphylococcus sp.</i>	100%
35	10	<i>Lactococcus sp.</i>	100%
35	67	<i>Staphylococcus sp.</i>	100%
35	73	<i>Exiguobacterium sp.</i>	100%
37	16	<i>Corynebacterium sp.</i>	58%
37	32	<i>Staphylococcus sp.</i>	100%

Tabela 10 – Resultados da identificação das amostras sequenciadas pela base de dados *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) e respectivas fontes ambientais de recolha de bactérias com homologia máxima às amostras deste trabalho. No campo relativo à “Identificação das sequências com homologia máxima na base de dados EMBL” é apresentado o número de acesso da sequência no *GenBank* e respectiva identificação original completa, sendo apresentada apenas a descrição da sequência com maior grau de identificação taxonómico possível de entre as sequências com homologia máxima.

Número da amostra	Número da colónia	Identificação pela base de dados EMBL	Identificação taxonómica máxima das sequências com homologia máxima na base de dados EMBL	Homologia (%)	Smith-Waterman Score	Número de sequências com homologia máxima	Fontes de recolha das bactérias com homologia máxima na base de dados EMBL
3	3	<i>Staphylococcus sp.</i>	AF467419 Uncultured <i>Staphylococcus sp.</i> clone Gpanamen9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	100%	3305	38	Pó do chão de casa de humanos (Rintala et al, 2008), Pele do corpo humano (Grice et al, 2009); Comunidades bacterianas associadas a malófagos ectoparasitas de roedores da família Geomyidae (Reed e Hafner, 2002)
3	45	Não identificado	FM872920 Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone FB04F07	99,8%	2917	44	Pele humana e pó do chão (Täubel et al, 2009); Pele do corpo humano (Grice et al, 2008, 2009)
4	10	Não identificado	EU652037 Uncultured bacterium clone M3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	97,6%	2448	18	Pele de humanos (Täubel et al, 2009 e Grice et al, 2009);
9	40	Gama proteobactérias	FM994667 Uncultured gamma proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone B-G-4	99.9%	3632	mais de 50	Pele humana e pó do chão da casa de humanos (Täubel et al, 2009); Pele do corpo humano (Grice et al, 2009); Guelras de lapas (Zbinden et al, não publicado)
9	65	<i>Staphylococcus sp.</i>	AF467419 Uncultured <i>Staphylococcus sp.</i> clone Gpanamen9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	100%	6860	1	Comunidades bacterianas associadas a malófagos ectoparasitas de roedores da família Geomyidae (Reed e Hafner, 2002)
9	77	<i>Kocuria sp.</i>	GU458920 Uncultured <i>Kocuria sp.</i> clone T0305 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	100%	3345	mais de 50	Pó do chão da casa de humanos (Täubel et al, 2009); Pele de humanos (Grice et al, 2008, 2009); Salas limpas de laboratório de aeronáutica (Moissl-Eichinger, Não publicado)
14	10	<i>Bacillus sp.</i>	FJ601652 <i>Bacillus sp.</i> enrichment culture clone SYW22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	100%	4335	5	Aerossóis urbanos (Brodie et al, 2007)
14	15	<i>Gordonia sp.</i>	DQ422886 Uncultured <i>Gordonia sp.</i> clone CC-WWC2-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	98,1%	4032	1	Espuma de águas residuais (Shen et al, 2007)

Tabela 10 (continuação)

Número da amostra	Número da colônia	Identificação pela base de dados EMBL	Identificação taxonômica máxima das sequências com homologia máxima na base de dados EMBL	Homologia (%)	Smith-Waterman Score	Número de sequências com homologia máxima	Fontes de recolha das bactérias com homologia máxima na base de dados EMBL
14	18	<i>Staphylococcus sp.</i>	EU341212 Uncultured <i>Staphylococcus sp.</i> clone AV_5N-C12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	100%	2460	mais de 50	Pele do corpo humano (Grice et al, 2009); Pele humana, pó do chão e pó do colchão da cama de humanos (Täubel et al, 2009); Ar da cabine de aviões comerciais (Osman et al, 2008)
15	51	Não identificado	DQ532155 Uncultured bacterium clone JPL2-44 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	100%	3650	mais de 50	Pele humana, pó do chão e pó do colchão da cama de humanos (Täubel et al, 2009); Pele do corpo humano (Grice et al, 2009)
21	53	Não identificado	FM873823 Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone MB01C10	100%	3310	22	Pó do colchão da cama de humanos (Täubel et al, 2009); Pele do corpo humano (Grice et al, 2009)
23	14	<i>Planococcus sp.</i>	EU175912 Uncultured <i>Planococcus sp.</i> clone cln8_3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	96,9%	2660	3	Lago minúsculo em árvore do deserto segregadora de sal (Qvit-Raz et al, 2008)
25	15	Alfa proteobactérias	AJ964943 Uncultured alpha proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone MTAD35	100%	2880	3	Pó do colchão da cama de humanos (Täubel et al, 2009);
25	57	Não identificado	FM873761 Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone MA04C04	99,9%	3644	1	Pó do colchão da cama de humanos (Täubel et al, 2009);
28	61	Não identificado	FJ873670 Uncultured bacterium clone butcher_F36 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	99,9%	4167	30	Pele de humanos (Grice et al, 2008, 2009);
29	45	<i>Bacillus sp.</i>	EF705146 Uncultured Bacilli bacterium clone MS158A1_A05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	99,8%	3292	1	Sistema gastrointestinal do ser humano (Frank et al, 2007)
30	11	Não identificado	DQ266896 Uncultured bacterium clone pGXAR4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	99,7%	3298	2	Solo alcalino (Jiang et al, não publicado)
31	60	Não identificado	EU491141 Uncultured bacterium clone P9X2b3F08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	100%	3355	8	Pele do corpo humano (Grice et al, 2008, 2009), Crosta oceânica (Santelli et al, 2008)
33	38	Não identificado	GQ422769 Uncultured bacterium clone B37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	99,7%	3617	1	Carne de porco refrigerada (Yun, não publicado); Pó do chão da casa de humanos (Täubel et al, 2009) com homologia a 99,3%

Tabela 10 (continuação)

Número da amostra	Número da colônia	Identificação pela base de dados EMBL	Identificação taxonômica máxima das sequências com homologia máxima na base de dados EMBL	Homologia (%)	Smith-Waterman Score	Número de sequências com homologia máxima	Fontes de recolha das bactérias com homologia máxima na base de dados EMBL
35	10	<i>Lactococcus sp.</i>	EU029536 Uncultured <i>Lactococcus sp.</i> clone T4377 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	99,9%	3691	43	Pó do chão da casa de humanos (Täubel et al, 2009 e Rintala et al, 2008); Pele do corpo humano (Grice et al, 2009), Sistema gastrointestinal humano (Ley et al, 2006 e Eckburg et al, 2005)
35	67	Não identificado	FM873823 Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone MB01C10	100%	3675	22	Pele do corpo humano (Grice et al, 2009); Pó do colchão da cama de humanos (Täubel et al, 2009)
35	73	Não identificado	AF029046 Benzene mineralizing consortium clone SB-22 16S small subunit ribosomal RNA gene, complete sequence.	99,6%	3668	13	Pele do corpo humano (Grice et al, 2009)
37	16	Não identificado	GQ062514 Uncultured bacterium clone nbw33e06c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	94,6%	2326	1	Pele do corpo humano (Grice et al, 2009)
37	32	<i>Staphylococcus sp.</i>	EU341223 Uncultured <i>Staphylococcus sp.</i> clone AV_5R-N-C11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	93,1%	2542	mais de 50	Pele humana, pó do chão e pó do colchão da cama de humanos (Täubel et al, 2009); Ar da cabine de aviões comerciais (Osman et al, 2008); Salas limpas de laboratório de aeronáutica (Moissl-Eichinger, Não publicado);

Tabela 11 – Lista da origem provável das bactérias detectadas neste trabalho com base nos resultados da pesquisa das sequências das amostras na base de dados *Bio Informatic Bacteria Identification* (BIBI), informação geral acerca do taxon disponibilizada pela *Culture Collection, University of Göteborg, Sweden* (CCUG) e detecção do taxon no trabalho de Täubel *et al* (2009) acerca da flora bacteriana do interior de edifícios associada à ocupação humana. Informação adicional acerca provável origem das bactérias presente na tabela 10 dos anexos, no campo “Fontes de recolha das bactérias com homologia máxima na base de dados EMBL”.

Número da amostra	Número da colónia	Identificação final da amostra (segundo base de dados BIBI)	Fonte da amostra com homologia máxima na base de dados BIBI	Deteção do taxon no trabalho de Täubel <i>et al</i> (2009)	Ecologia do taxon segundo CCUG	Informação clínica do taxon segundo CCUG	Origem provável das bactérias detectadas neste trabalho
3	3	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Não indicada	Detectado no pó da casa apenas, origem não humana provável	Pele de humanos e outros primatas	Isolado em humanos e outros primatas	Flora bacteriana de humanos
3	45	<i>Micrococcus luteus</i>	Não indicada	Detectado e partilhado entre pele humana e pó da casa	Pele de mamíferos. Habitat secundário: carne, produtos lácteos, solo, água	Não patogénico	Flora bacteriana de humanos
4	10	<i>Micrococcus sp.</i>	<i>M. luteus</i> – Não indicada <i>M. thailandicus</i> - Solo	Detectado e partilhado entre pele humana e pó da casa	Omnipresente no ambiente e também encontrado em pele, carne, água, etc.	Geralmente não patogénicos, mas algumas estirpes podem ser patogénicos oportunistas	Flora bacteriana de humanos
9	40	<i>Moraxella osloensis</i> ou <i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	Não indicada	Detectados e partilhados entre pele humana e pó da casa	<i>M. osloensis</i> : Omnipresente no ambiente e também encontrado em amostras clínicas de humanos <i>E. aerosaccus</i> : Lagos eutróficos	<i>M. osloensis</i> : Frequentemente isolado de amostras clínicas de humanos. Baixa patogenicidade <i>E. aerosaccus</i> : Sem informação	Flora bacteriana de humanos
9	65	<i>Staphylococcus cohnii urealyticus</i>	Não indicada	Detectado no pó da casa apenas, origem não humana provável	Pele de humanos e outros primatas	Isolado em humanos e outros primatas	Flora bacteriana de humanos
9	77	<i>Kocuria palustris</i>	Raiz de <i>Typha angustifolia</i>	Detectado no pó da casa apenas, origem não humana provável	Raiz de <i>Typha angustifolia</i> , Género: Omnipresente	Não disponível	Flora bacteriana de humanos ou ambiental
14	10	<i>Bacillus simplex</i>	Pinturas murais	Género apenas: Detectado no pó da casa apenas, origem não humana provável	Omnipresente	Raramente significativa em amostras clínicas humanas	Flora bacteriana ambiental
14	15	<i>Gordonia alkanivorans</i> (syn. <i>G nitida</i> )	Água residual industrial	Género apenas: Detectado no pó da casa apenas, origem não humana provável	Não disponível	Não disponível	Flora bacteriana ambiental

Tabela 11 (continuação)

Número da amostra	Número da colónia	Identificação final da amostra (segundo base de dados BIBI)	Fonte da amostra com homologia máxima na base de dados BIBI	Deteção do taxon no trabalho de Täubel <i>et al</i> (2009)	Ecologia do taxon segundo CCUG	Informação clínica do taxon segundo CCUG	Origem provável das bactérias detectadas neste trabalho
14	18	<i>Staphylococcus hominis hominis</i>	Não indicada	Detectado e partilhado entre pele humana e pó da casa	Pele de humanos	Pode ser associado a uma variedade de infeções humanas	Flora bacteriana de humanos
15	51	<i>Staphylococcus capitis</i> ou <i>S. caprae</i>	Não indicada para ambas as espécies	Não detectada para ambas as espécies	<i>S. capitis</i> – Pele humana e de alguns primatas <i>S. caprae</i> - Humanos, cabras	<i>S. capitis</i> – Pode causar endocardite <i>S. caprae</i> - Poucos casos de infeção humana	Flora bacteriana de humanos
21	53	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Pele humana	Detectado no pó da casa apenas, origem humana provável	Humanos, primatas e animais domésticos	Associado a uma variedade de infeções humanas.	Flora bacteriana de humanos
23	14	<i>Planococcus sp.</i>	Água sulfurosa com algas verdes e vermelhas	Detectado no pó da casa apenas, origem humana provável	Não disponível	Não disponível	Flora bacteriana ambiental
25	15	<i>Paracoccus yeei</i>	Amostra clínica de humanos	Detectado no pó da casa apenas, origem humana provável	Humanos	Frequentemente isolado de amostras clínicas de humanos.	Flora bacteriana de humanos
25	57	<i>Paracoccus yeei</i>	Amostra clínica de humanos	Detectado no pó da casa apenas, origem humana provável	Humanos	Frequentemente isolado de amostras clínicas de humanos.	Flora bacteriana de humanos
28	61	<i>Kocuria rhizophila</i>	Raiz de <i>Typha angustifolia</i>	Género apenas: Detectado no pó da casa apenas, origem não humana provável	Raiz de <i>Typha angustifolia</i> , Género: Omnipresente	Não disponível	Flora bacteriana de humanos ou ambiental
29	45	<i>Bacillus granadensis</i>	Água residual de lavagem de azeitonas	Detectado no pó da casa apenas, origem não humana provável	Não disponível. Género: Omnipresente	Não disponível. Género: patogenicidade muito variável	Flora bacteriana de humanos ou ambiental
30	11	<i>Crocino bacterium jejui</i>	Algas secas	Não detectado	Não disponível	Não disponível	Flora bacteriana ambiental

Tabela 11 (continuação)

Número da amostra	Número da colónia	Identificação final da amostra (segundo base de dados BIBI)	Fonte da amostra com homologia máxima na base de dados BIBI	Deteção do taxon no trabalho de Täubel <i>et al</i> (2009)	Ecologia do taxon segundo CCUG	Informação clínica do taxon segundo CCUG	Origem provável das bactérias detectadas neste trabalho
31	60	<i>Micrococcus luteus</i>	Não indicada	Detectado e partilhado entre pele humana e pó da casa	Pele de mamíferos. Habitat secundário: carne, produtos lácteos, solo, água	Não patogénico	Flora bacteriana de humanos
33	38	<i>Staphylococcus kloosii</i>	Não indicada	Detectado no pó da casa apenas, origem não humana provável	Mamíferos	Não disponível	Flora bacteriana ambiental
35	10	<i>Lactococcus lactis lactis</i>	Não indicada	Detectado no pó da casa apenas, origem não humana provável	Produtos lácteos	Geralmente não detectado em amostras clínicas e solo	Flora bacteriana ambiental ou de humanos
35	67	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Pele humana	Detectado no pó da casa apenas, origem humana provável	Humanos, primatas e animais domésticos	Associado a uma variedade de infecções humanas.	Flora bacteriana de humanos
35	73	<i>Exiguobacterium homiense</i>	Areia do mar	Género apenas: Detectado no pó da casa apenas, origem não humana provável	Ambiente alcalino	Raramente significativa em amostras clínicas humanas	Flora bacteriana de humanos ou ambiental
37	16	<i>Corynebacterium sp.</i>	Não indicada	Detectado e partilhado entre pele humana e pó da casa	Omnipresente	Patogenicidade muito variável, C. afermentans presente em amostras clínicas humanas	Flora bacteriana de humanos
37	32	<i>Staphylococcus sp.</i>	Não indicada	Detectado e partilhado entre pele humana e pó da casa	Pele, glândulas da pele e membranas mucosas de animais de sangue quente	Algumas espécies são patogénicos oportunistas de humanos e outros animais	Flora bacteriana de humanos

Tabela 12 – Número de amostras com determinação de OTU, número de OTU distintas detectadas e índice de diversidade de OTU para os locais amostrados no HJA. Índice de diversidade de OTU = número de OTU distintas no local / número de amostras com determinação de OTU.

Local de amostragem	Número de amostras com determinação de OTU (N)	Número de OTU distintas (S)	Índice de diversidade de OTU (S/N)
Exterior	10	9	90%
Bar pessoal	10	10	100%
Corredor Piso 0	10	8	80%
Corredor Piso 1	12	9	75%
Corredor Piso 2	8	5	63%
Corredor Piso 3	15	11	73%
Cozinha	10	8	80%
Lavandaria	8	6	75%
Quarto Castanholas	5	3	60%
Quarto Papoila	14	10	71%
Quarto Pardal da Terra	18	14	78%
Quarto Til	14	11	79%
Quarto Toutinegra	19	15	79%
Sala convívio	14	12	86%
Sala estar (modificada para quarto)	18	14	78%
Sala fisioterapia	7	4	57%

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADENE – Agência para a Energia (2008). *Regulamento dos Sistemas Energéticos e de Climatização dos Edifícios - QAI (RSECE-QAI): Perguntas e respostas frequentes* (Versão 1.1 de 14/05/2008). Acedido em 12 de Agosto de 2010, em <http://www.adene.pt/>.
- ADENE – Agência para a Energia (2009). *Nota Técnica NT-SCE-02 - Metodologia para auditorias periódicas de QAI em edifícios de serviços existentes no âmbito do RSECE*. Acedido em 15 de Julho de 2010 em <http://www.adene.pt/>.
- Albuquerque P, Mendes MV, Santos CL, Moradas-Ferreira P, Tavares F. (2009) DNA signature-based approaches for bacterial detection and identification. *Sci Total Environ*, 407(12), 3641-3651.
- Ali AM, Abbasi SA, Arif S, Mirza IA. (2007). Nosocomial infections due to methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in hospitalized patients. *Park J Med Sci*, 2(4), 593-596.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, Ministério da Saúde) (2003a). Consulta Pública CP nº 109, de 11 de Dezembro de 2003 (Proposta de Resolução que dispõe sobre Indicadores de Qualidade do Ar Ambiental Interior em Serviços de Saúde). Acedido em 15 de Agosto de 2010 em <http://www.anvisa.gov.br/>.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, Ministério da Saúde) (2003b). Resolução RE nº 9, de 16 de Janeiro de 2003 (Determina a publicação de orientação técnica elaborada por grupo técnico assessor, sobre padrões referenciais de qualidade do ar interior, em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo). Acedido em 15 de Agosto de 2010 em <http://www.anvisa.gov.br/>.
- Arenskötter M, Linos A, Schumann P, Kroppenstedt RM, Steinbüchel A. (2005). *Gordonia nitida* Yoon *et al.* 2000 is a later synonym of *Gordonia alkanivorans* Kummer *et al.* 1999. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55(2), 695-697.
- Aydogdu H, Asan AE, Otkun MT. (2009) Indoor and outdoor airborne bacteria in child-care centres in Edirne City (Turkey), seasonal distribution and influence of meteorological factors. *Environ Monit Assess*, 147, 423-444.
- Barenfanger J, Drake C, Kacich G. (1999). Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol*, 37(5), 1415-1418.
- Barrow GI e Feltham RKA (1993). *Cowan and Steel's Manual for the identification of Medical Bacteria* (3ª ed.). Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press.
- Beggs, CB (2004). *The use of engineering measures to control airborne pathogens in hospital buildings*. Acedido em 22 de Junho de 2010 de <http://www.efm.leeds.ac.uk/CIVE/MTB/CBB-Nov8.pdf>.
- Bej AK, Mahbubani MH, Atlas RM (1991) Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by polymerase chain reaction and gene probe methods. *Appl Environ Microbiol* 57, 597–600.
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL (2008). GenBank. *Nucleic Acids Res*, 36, (Database issue) D25-30.

- Bosshard PP, Abels S, Zbinden R, Bottger EC, Altwegg M (2003). Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation). *J Clin Microbiol*, 41, 4134–4140.
- Boudewijns M, Bakkens JM, Sturm PD, Melchers WJ (2006). 16S rRNA gene sequencing and the routine clinical microbiology laboratory: a perfect marriage? *J Clin Microbiol*, 44(9):3469-3470.
- Bövre K e Henriksen SD (1967). A new *Moraxella* species, *Moraxella osloensis*, and a revised description of *Moraxella nonliquefaciens*. *Int J Syst Bacteriol*, 17, 127-135.
- Brachman, PS e Abrutyn E (Ed.) (2009). *Bacterial Infections of Humans - Epidemiology and Control* (4ª ed). New York, E.U.A.: Springer.
- Brodie EL, DeSantis TZ, Parker JP, Zubieta IX, Piceno YM, Andersen GL (2007). Urban aerosols harbor diverse and dynamic bacterial populations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(1), 299-304.
- Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC (1991). Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Gene*, 48(1), 137-144.
- Cai H, Archambault M, Prescott JF (2003). 16S ribosomal RNA sequence-based identification of veterinary clinical bacteria. *J Vet Diagn Invest*, 15(5), 465-469.
- Câmara IG (2007) *Estudo Aerobiológico da Cidade do Funchal. Detecção Bioquímica dos Principais Aeroalergénios Polínicos*. Tese de Doutoramento, Universidade da Madeira, Departamento de Biologia, Funchal.
- CCUG - Culture Collection, University of Göteborg (Suécia). Acedido em 20 de Julho de 2010, em <http://www.ccug.se/>.
- Chan PL, Yu PHF, Cheng YW, Chan CY, Wong PK (2009). Comprehensive characterization of indoor airborne bacterial profile. *J Environ Sci*. 2009, 21, 1148-1152.
- Clark RP e Calcina-Goff ML (2009). Some aspects of airborne transmission of infection. *JR Soc Interface*, 6, S767-S782.
- Clarridge JE 3rd. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*, 17(4), 840-862.
- Clayton RA, Sutton G, Hinkle P S Jr., Bult C, Fields C (1995). Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa. *Int J Syst Bacteriol*, 45, 595–599.
- Serviço Regional de Saúde, EPE (2009). *Relatório do inquérito de prevalência de infecção de 2009*. Relatório elaborado pela Comissão de Controlo de Infecção do Hospital Central do Funchal.
- Collee JG, Duddid JP, Fraser AG, Marmion BP (1993). *Microbiologia Médica* (6ª Ed.). Lisboa, Portugal: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Cook VJ, Turenne CY, Wolfe J, Pauls R, Kabani A (2003). Conventional methods versus 16S ribosomal DNA sequencing for identification of nontuberculous mycobacteria: cost analysis. *J Clin Microbiol*, 41(3), 1010-1015.
- Cooley JD, Wong WC, Jumper CA, Straus DC (1998). Correlation between the prevalence of certain fungi and sick building syndrome. *Occup Environ Med*, 55(9), 579-584.

- Crocomo T (2005). *Caracterização da variabilidade genética de bactérias causadoras de infecção hospitalar e comunitária, isoladas no Hospital Regional Hans Dieter Schmidt de Joinville – S.C. – Brasil*. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Florianópolis.
- Curtis C (2008). Prevention of hospital-acquired infection: review of non-pharmacological interventions. *J Hosp Infect*, 69, 204-219.
- D'Azevedo, PA, Antunes ALS, Martino MDV, Pignatari ACC (2008). *Staphylococcus cohnii* spp *urealyticus*: relato de caso de um patógeno incomum. *Rev Soc Bras Med Trop*, 41(2), 197-199.
- Daneshvar MI, Hollis DG, Weyant RS, Steigerwalt AG, Whitney AM, Douglas MP, Macgregor JP, Jordan JG, Mayer LW, Rassouli SM, Barchet W, Munro C, Shuttleworth L, Bernard K (2003). *Paracoccus yeeii* sp. nov. (formerly CDC group EO-2), a novel bacterial species associated with human infection. *J Clin Microbiol*, 41(3), 1289-1294.
- Decreto-lei n.º 77/2006, de 4 de Abril (Sistema Nacional de Certificação Energética e da Qualidade do Ar Interior nos Edifícios).
- Decreto-lei n.º 79/2006, de 4 de Abril (Regulamento dos Sistemas Energéticos de Climatização em Edifícios).
- Decreto-lei n.º 80/2006, de 4 de Abril (Regulamento das Características de Comportamento Térmico dos Edifícios).
- Devulder G, Perrière G, Baty F, Flandrois JP (2003). BIBI, a bioinformatics bacterial identification tool. *J Clin Microbiol*, 41(4), 1785-1787.
- Ding J, Sun Q, Li K, Zheng M, Miao X, Ni W, Hong L, Yang J, Ruan Z, Zhou R, Zhou H, He W (2009). Retrospective analysis of nosocomial infections in intensive care unit of a tertiary hospital in China during 2003 and 2007. *BMC Infectious Diseases*, 9, 115-121.
- Doern GV, Vautour R, Gaudet M, Levy B (1994). Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification. *J Clin Microbiol*, 32(7), 1757-1762.
- Drancourt M, Bollet C, Carlouz A, Martelin R, Gayral JP, Raoult D (2000). 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol*, 38(10), 3623-3630.
- Drozenova J e Petras P (2000). Characteristics of coagulase-negative staphylococci isolated from hemocultures. *Epidemiologie Mikrobiologie Immunologie*, 49, 51-58.
- Dufour P, Jarraud S, Vandenesch F, Greenland T, Novick RP, Bes M, Etienne J, Lina G (2002). High Genetic Variability of the agr Locus in *Staphylococcus* Species. *J Bacteriol*, 184(4), 1180–1186.
- Dungan RS e Leytem AB (2009). Qualitative and quantitative methodologies for determination of airborne microorganisms at concentrated animal-feeding operations. *World J Microbiol Biotechnol*, 25, 1505-1518.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308(5728):1635-1638.
- Eklaise FO, Ighosewe OU, Ajakpovi OD (2008). Hospital indoor airborne microflora in private and government owned hospitals in Benin City, Nigeria. *World J Med Sci*, 3(1), 19-23.

- Escombe AR, Oeser CC, Gilman RH, Navincopa M, Ticona E, Pan W, Martínez C, Chacaltana J, Rodríguez R, Moore DAJ, Friedland JS, Evans CA (2007). Natural ventilation for the prevention of airborne contagion. *PLoS Medicine*, 4(2), e68-e77.
- Fang M, Lau APS, Chan CK, Hung CT, Lee TW (2008). Aerodynamic properties of biohazardous aerosols in hospitals. *Hong Kong Med J*, 14(1), S26-S28.
- Fierer N, Liu Z, Rodríguez-Hernández M, Knight R, Henn M, Hernández MT (2008). Short-term temporal variability in airborne bacterial and fungal populations. *Appl. Environ Microbiol*, 74(1), 200-207.
- Fontana C, Favaro M, Pelliccioni M, Pistoia ES, Favalli C (2005). Use of the MicroSeq 500 16S rRNA gene-based sequencing for identification of bacterial isolates that commercial automated systems failed to identify correctly. *J Clin Microbiol*, 43(2), 615-619.
- Fournier PE, Dumler JS, Greub G, Zhang J, Wu Y, Raoult D (2003). Gene sequence-based criteria for identification of new *Rickettsia* isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov. *J Clin Microbiol* 41(12), 5456–5465.
- Fox G E, Wisotzkey JD, Jurtshuk P Jr. (1992). How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int J Syst Bacteriol*, 42(1), 166–170.
- Foxman B (2002). Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am J Med*, 113(Suppl 1a), 5S-13S.
- Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(34):13780-13785.
- Fredricks DN e Relman DA (1996). Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. *Clin. Microbiol Rev*, 9, 18–33.
- Fridkin S e Jarvis R (1996). Epidemiology of Nosocomial Fungal Infections. *Clin Microb Rev*, 9(4), 499–511.
- Gao Z, Tseng C, Pei Z, Blaser MJ (2007). Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104, 2927-2932.
- Geyik MF, Hosoglu S, Ayas C, Çelen MK, Üstün C (2008). Surveillance of nosocomial infections in Dicle University Hospital: a ten-year experience. *Turk J Med Sci*, 38(6), 587-593.
- Goldenberger D, Künzli A, P. Vogt R, Zbinden R, Altwegg M (1997). Molecular diagnosis of bacterial endocarditis by broad-range PCR amplification and direct sequencing. *J Clin Microbiol*, 35, 2733–2739.
- Górny RL e Dutkiewicz J (2002) Bacterial and fungal aerosols in indoor environment in Central and Eastern European countries. *Ann Agric Environ Med*, 9, 17–23.
- Grice EA, Kong HH, Renaud G, Young AC, NISC Comparative Sequencing Program, Bouffard GG, Blakesley RW, Wolfsberg TG, Turner ML, Segre JA (2008). A diversity profile of the human skin microbiota. *Genome Res*, 18(7), 1043-1050.
- Grice EA, Kong, HH, Conlan S, Deming CB, Davis J, Young AC, NISC Comparative Sequencing Program, Bouffard GG, Blakesley RW, Murray PR, Green ED, Turner ML, Segre JA (2009).

- Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science*, 324(5931), 1190-1192.
- Gupta K e Stamm W (2005). Urinary tract infections. *ACP Medicine*, 23, 1-12.
- Gupta S e Maiden MC (2001). Exploring the evolution of diversity in pathogen populations. *Trends Microbiol*, 9, 181–185.
- Harmsen D e Karch H (2004). 16S rDNA for diagnosing pathogens: a living tree. *ASM News*, 70, 19–24.
- Hellgren U, Palomäki E, Lahtinen M, Riuttala H, Rejula K (2008). Complaints and symptoms among hospital staff in relation to indoor air and the condition and need for repairs in hospital buildings. *Scand J Work Environ Health, Suppl. 4*, 58-63.
- Heyrman J, Logan NA, Rodríguez-Díaz M, Scheldeman P, Lebbe L, Swings J, Heyndrickx M, De Vos P (2005). Study of mural painting isolates, leading to the transfer of '*Bacillus maroccanus*' and '*Bacillus carotarum*' to *Bacillus simplex*, emended description of *Bacillus simplex*, re-examination of the strains previously attributed to '*Bacillus macroides*' and description of *Bacillus muralis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55, 119-131.
- Horn, M e Wagner M (2001). Evidence for additional genus-level diversity of *Chlamydiales* in the environment. *FEMS Microbiol Lett*, 204(1) 71–74.
- IJSEM - International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. (2003). Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSEM. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53, 935-937.
- Jaffal AA, Nsanze H, Bener A, Ameen AS, Banat IM, Mogheth AA (1997) Hospital airborne microbial pollution in a desert country. *Environ Int* 23, 167–72.
- Jalava J, Kotilainen P, S Nikkari, Skurnik M, Vänttinen E, Lehtonen OP, Eerola E, Toivanen P (1995). Use of the polymerase chain reaction and DNA sequencing for detection of *Bartonella quintana* in the aortic valve of a patient with culture-negative infective endocarditis. *Clin Infect Dis*, 21(4), 891–896.
- Janda JM e Abbott SL (2002). Bacterial identification for publication: when is enough enough?. *J Clin Microbiol*, 40(6), 1887-1891.
- Janda JM e Abbott SL (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol*, 45(9), 2761-2764.
- Järvinen A, Laakso S, Piiparinen P, Aittakorpi A, Lindfords M, Houpaniemi L, Piiparinen H, Mäki M (2009). Rapid identification of bacterial pathogens using a PCR-and microarray-based assay. *BMC Microbiology*, 9, 161.
- Jeffus L (2004). *Refrigeration and Air Conditioning: An introduction to HVAC/R* (4ª ed.). New Jersey, E.U.A.: Pearson Princeton Hall.
- Jenks PJ (1998). Sequencing microbial genomes—what will it do for microbiology? *J Med Microbiol*, 47(5), 375–382.
- Jiang CJ, Hu TT, Wu B (Não publicado). Cloning and diversity analysis of microorganism genes from alkaline soil.

- Kim KY, Kim YS, Kim D (2010). Distribution characteristics of airborne bacteria and fungi in the general hospitals of Korea. *Ind Health*, 48(2), 236-243.
- Kimura M (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Mol Evol*, 16, 111–120.
- Kolbert CP e Persing DH (1999). Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol*, 2, 299–305.
- Kovács G, Burghardt J, Pradella S, Schumann P, Stackebrandt E, Máriaiget K (1999). *Kocuria palustris* sp. nov. and *Kocuria rhizophila* sp. nov., isolated from the rhizoplane of the narrow-leaved cattail (*Typha angustifolia*). *Int J Syst Bacteriol*, 49(1), 167-173.
- Kramer A, Schwebke I, Kampf G (2006). How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis*, 6, 130.
- Krieg NR e Holt JG (Ed.) (1984). *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2ª ed.). Baltimore, E.U.A.: The Williams & Wilkins Co.
- Kummer C, Schumann P, Stackebrandt E (1999). *Gordonia alkanivorans* sp. nov., isolated from tar-contaminated soil. *Int J Syst Bacteriol*, 49, 1513-1522.
- Kwon SW (Não publicado). *Exiguobacterium homiense* sp. nov., isolated from sea sand in Korea.
- Lee C, Chen P, Huang F, Lin C (2009). Microbiologic spectrum and susceptibility pattern of clinical isolates from pediatric intensive care unit in a single medical center-6 year's experience. *J Microbiol Immunol Infect*, 42, 160-165.
- Lee SD (Não publicado). *Crocino bacterium jeju* gen. nov., sp. nov., a novel member of the order Bacillales, isolated from dried seaweed.
- Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444(7122), 1022-1023.
- Li CS e Hou PA (2003). Bioaerosol characteristics in hospital clean rooms. *Sci Total Environ*, 305, 169–76.
- Lucchini S, Thompson A, Hinton JCD (2001) Microarrays for microbiologists. *Microbiol*, 147, 1403–1414
- Łukaszuk C, Krajewska-Kułak E, Baran E, Szepietowski J, Białyński-Birula R, Kułak W, Rolka H, Oksiejczuk E (2007). Analysis of the incidence of fungal pathogens in air of the Department of Dermatology, Venereology and Allergology of Medical University in Wrocław. *Adv Med Sci*, 52(1), 15-17.
- Markland AD, Goode PS, Burgio KL, Redden DT, Richter HE, Sawyer P, Allman RM (2008). Correlates of urinary, fecal, and dual incontinence in older African-American and white men and women. *J Am Geriatr Soc*, 56(2), 285-290.
- Maron PA, Lejon DPH, Carvalho E, Bizet K, Lemanceau P, Ranjard L, Mougél C (2005). Assessing genetic structure and diversity of airborne bacterial communities by DNA fingerprinting and 16S rDNA clone library. *Atmos Environ*, 39(20), 3687-3695.
- Mignard S e Flandrois JP (2006). 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. *J Microbiol Methods*, 67(3), 574-581.

- Mittman SA, Huard RC, Della-Latta P, Whittier S (2009). Comparison of BD phoenix to vitek 2, microscan MICroSTREP, and Etest for antimicrobial susceptibility testing of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol*, 47(11):3557-3561.
- Moissl-Eichinger CG (Não publicado). *Molecular microbial diversity in spacecraft-associated clean rooms*.
- Mohr, A.J. (2002). Microorganisms fate and transport. Em Hurst, C.J., Crawford, R.L., Knudsen, G., McInerney, M., Stetzenbach, L.D. (Ed.), *Manual of Environmental Microbiology* (2ª ed.). Whashington DC, E.U.A.: ASM Press.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Pfaller, M.A. (2005). *Medical Microbiology* (5ª ed.). Philadelphia, E.U.A.: Elsevier Mosby
- Narui K, Noguchi N, Matsunaga M, Namiki Y, Yamanaka Y, Kumaki Y, Suwa J, Nasu Y, Koyama M, Okuyama, K, Utsumi K, Takazawa K, Wakasugi K, Sasatsu M (2009). Change in environmental bacterial flora in a new hospital building. *J Hosp Infect*, 73(1), 24-33.
- Ninet B, Monod M, Emler S, Pawlowski J, Metral C, Rohner P, Auckenthaler R, Hirschel B (1996). Two different 16S rRNA genes in a mycobacterial strain. *J Clin Microbiol* 34(10), 2531–2536.
- Nunes, Z.G. (2005). *Estudo da qualidade microbiológica do ar em ambientes internos climatizados*. Tese de doutoramento em Vigilância Sanitária, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro.
- O'Hara CM (2005). Manual and automated instrumentation for identification of *Enterobacteriaceae* and other aerobic gram-negative bacilli. *Clin Microbiol Rev*, 18(1),147-162.
- O'Hara CM, Rhoden DL, Miller JM (1992). Reevaluation of the API 20E identification system versus conventional biochemicals for identification of members of the family *Enterobacteriaceae*: a new look at an old product. *J Clin Microbiol*, 30(1), 123-125.
- Ortiz G, Yagüe G, Segovi M, Catalán V (2009). A study of air microbe levels in different areas of a hospital. *Curr Microbiol*, 59(1), 53-58.
- Osman S, La Duc MT, Dekas A, Newcombe D, Venkateswaran K (2008). Microbial burden and diversity of commercial airline cabin air during short and long durations of travel. *ISME J*, 2(5):482-497.
- Pace N (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 276(5313), 734–740.
- Palys T, Nakamura LK, Cohan FM (1997). Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. *Int J Syst Bacteriol* 47(4), 1145–1156.
- Parkes R e Taylor J (1985). Characterization of microbial populations in polluted marine sediments. *J Appl Microbiol*, 59(S14), 155S–173S.
- Pastuska JS, Marchwinska-Wyrwal E, Wlazlo A (2005). Bacterial aerosol in Silesian hospitals: preliminary results. *Polish Journal of Environmental Studies*, 14(6), 883-890.
- Pastuska JS, Paw UKT, Lis DO, Wlazlo A, Ulfing K (2000). Bacterial and fungal aerosol in indoor environment in Upper Silesia, Poland. *Atmos Environ*, 34, 3833–3842.

- Peccia J e Hernandez M (2006). Incorporating polymerase chain reaction-based identification, population characterization, and quantification of microorganisms into aerosol science: a review. *Atmos Environ*, 40, 3941-3961.
- Pepper IL e Gerba CP (2004). *Environmental Microbiology: A Laboratory Manual* (2ª ed.). Londres, Reino Unido: Elsevier Academic Press,.
- Piteira C (2007). *A Qualidade do Ar Interior em Instalações Hospitalares*. Portugal: Lidel.
- Polymenakou PN, Mandalakis M, Stephanou EG, Tselepides A (2008). Particle size distribution of airborne microorganisms and pathogens during an intense African dust event in the eastern Mediterranean. *Environ Health Perspect*, 116(3), 292-296.
- Qian Q, Tang YW, Kolbert CP, Torgerson CA, Hughes JG, Vetter EA, Harmsen WS, Montgomery SO, Cockerill III FR, Persing DH (2001). Direct identification of bacteria from positive blood cultures by amplification and sequencing of the 16S rRNA gene: evaluation of BACTEC 9240 instrument true-positive and false-positive results. *J Clin Microbiol*, 39(10):3578-3582
- Quadros ME, Lisboa HM, Oliveira VL, Schirmer WN (2009). Qualidade do ar em ambientes internos hospitalares: estudo de caso e análise crítica dos padrões atuais. *Eng. Sanit. Ambient*, 14(3), 431-438.
- Qudiesat K, Abu-Elteen K, Elkarmi A, Hamad M, Abussaud M (2009). Assessment of airborne pathogens in healthcare settings. *Afr J Microbiol Res*, 3(2), 66-76.
- Quesada T, Aguilera M, Morillo J, Ramos-Cormenzana A, Monteoliva-Sanchez M (Não publicado). *Bacillus granadensis* sp. nov., a new bacteria isolated from washing water of green olives processing.
- Qvit-Raz N, Jurkevitch E, Belkin S (2008). Drop-size soda lakes: transient microbial habitats on a salt-secreting desert tree. *Genetics*, 178(3), 1615-1622.
- Ranjard L, Poly F, Lata JC, Mougél C, Thioulouse J, Nazaret S (2001). Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. *Appl Environ Microbiol*, 67(10), 4479-4487
- Rantakokko-Jalava K, Nikkari S, Jalava J, Eerola E, Skurnik M, Meurman O, Ruuskanen O, Alanen A, Kotilainen E, Toivanen P, Kotilainen P (2000). Direct amplification of rRNA genes in diagnosis of bacterial infections. *J Clin Microbiol*, 38(1):32-39.
- Reed DL e Hafner MS (2002). Phylogenetic analysis of bacterial communities associated with ectoparasitic chewing lice of pocket gophers: a culture-independent approach. *Microb Ecol*, 44(1), 78-93.
- Relman DA, Schmidt TM, MacDermott RP, Falkow S (1992). Identification of the uncultured bacillus of Whipple's disease. *N Engl J Med*, 327(5), 293-301.
- Rintala H, Pitkäranta M, Toivola M, Paulin L, Nevalainen A (2008). Diversity and seasonal dynamics of bacterial community in indoor environment. *BMC Microbiol*, 8, 56.
- Rosselló-Mora R e Amann R (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Lett*, 25, 39-67.

- Roth A, Fischer M, Hamid ME, Michalke S, Ludwig W, Mauch H (1998). Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *J Clin Microbiol*, 36(1), 139-147.
- Roth A, Andrees S, Kroppenstedt RM, Harmsen D, Mauch H (2003). Phylogeny of the genus *Nocardia* based on reassessed 16S rRNA gene sequences reveals underspeciation and division of strains classified as *Nocardia asteroides* into three established species and two unnamed taxons. *J Clin Microbiol*, 41(2):851-856.
- Sachse K e Frey J (Ed.) (2003). *PCR Detection of Microbial Pathogens, Methods in Molecular Biology*. New Jersey, E.U.A.: Humana Press.
- Saitou N e Nei M (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4(4), 406-425.
- Santelli CM, Orcutt BN, Banning E, Bach W, Moyer CL, Sogin ML, Staudigel H, Edwards KJ (2008). Abundance and diversity of microbial life in ocean crust. *Nature* 453(7195), 653-656.
- Santos ACM (2008). *Microbiologia do ar: monitorização do ar em ambiente hospitalar*. Tese de mestrado, Universidade de Aveiro, Departamento de Biologia, Aveiro.
- Schleifer KH, Kilpper-Balz R, Devriese LA (1985). *Staphylococcus arlettae* sp. nov., *S. equorum* sp. nov. and *S. kloosii* sp. nov.: three new coagulase-negative, novobiocin-resistant species from animals. *Syst Appl Microbiol*, 5, 501-509.
- Schmalenberger A, Schwieger F, Tebbe CC (2001). Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. *Appl Environ Microbiol*, 67(8), 3557-3563.
- Shen FT, Huang HR, Arun AB, Lu HL, Lin TC, Rekha PD, Young CC (2007). Detection of filamentous genus *Gordonia* in foam samples using genus-specific primers combined with PCR-denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Can J Microbiol*, 53(6), 768-774.
- Shinn EA, Griffin DW, Seba DB (2003). Atmospheric transport of mold spores in clouds of desert dust. *Arch Environ Health*, 58(8), 498-504.
- Sneath PH (1992). Correction of orthography of epithets in *Pasteurella* and some problems with recommendations on latinization. *Int J Syst Bacteriol*, 42(4), 658-659.
- Sobotová L, Nosková T, Voleková J e Ághová L (2006). Practical training on nosocomial infections in a Hospital environment. *Indoor Built Environm*, 15(1), 73-76.
- Song J, Lee SC, Kang JW, Baek HJ, Suh JW (2004). Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. isolated from potato scab lesions in Korea on the basis of 16S rRNA gene and 16S-23S rDNA internally transcribed spacer sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54(1), 203-209.
- Song Y, Liu C, McTeague M, Finegold SM (2003). 16S ribosomal DNA sequence-based analysis of clinically significant gram-positive anaerobic cocci. *J Clin Microbiol*, 41(4), 1363-1369.
- Srikanth P, Sudharsanam S, Steinberg R (2008). Bio-aerosols in indoor environment: Composition, health effects and analysis. *Indian J Med Microbiol*, 26(4), 302-312.
- Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PA, Kämpfer P, Maiden MC, Nesme X, Rosselló-Mora R, Swings J, Trüper HG, Vauterin L, Ward AC, Whitman WB (2002). Report of the

- ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52(3), 1043-1047.
- Stackebrandt E e Goebel BM (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol*, 44(4), 846–849.
- Stager CE e Davis JR (1992). Automated systems for identification of microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 5(3), 302-327.
- Staley JT, Irgens RL, Brenner DJ (1987). *Enhydrobacter aerosaccus* gen. nov., sp. nov., a gas-vacuolated, facultatively anaerobic, heterotrophic rod. *Int J Syst Bacteriol* 37(3), 289-291.
- Stetzenbach LD, Buttner MP, Cruz P (2004). Detection and enumeration of airborne biocontaminants. *Curr Opin Biotechnol*, 15(3), 170-174.
- Stoesser G, Baker W, van den Broek A, Camon E, Garcia-Pastor M, Kanz C, Kulikova T, Leinonen R, Lin Q, Lombard V, Lopez R, Redaschi N, Stoehr P, Tuli MA, Tzouvara K, Vaughan R (2002). The EMBL Nucleotide Sequence Database. *Nucleic Acids Res*, 30(1), 21-26.
- Sudharsanam S, Srikanth P, Sheela M, Steinberg R (2008). Study of the indoor air quality in hospitals in South Chennai, India - Microbial Profile. *Indoor Built Environ*, 17(5), 435-441.
- Szewczyk EM, Różalska M (2000). *Staphylococcus cohnii*-resident of hospital environment: cell-surface features and resistance to antibiotics. *Acta Microbiol Pol*, 49(2), 121-133.
- Szewczyk EM, Różalska M, Cieślowski T, Nowak T (2004). Plasmids of *Staphylococcus cohnii* isolated from the intensive-care unit. *Folia Microbiol*, 49(2), 123-131.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 24(8), 1596-1599
- Tang CS, Chung FF, Lin MC, Wan GH (2009). Impact of patient visiting activities on indoor climate in a medical intensive care unit: a 1-year longitudinal study. *Am J Infect Control*, 37(3), 183-188.
- Tang JW (2009). The effect of environmental parameters on the survival of airborne infectious agents. *J R Soc Interface, Suppl 6*, S737-S746.
- Tang YW, Ellis NM, Hopkins MK, Smith DH, Dodge DE, Persing DH (1998). Comparison of phenotypic and genotypic technique for identification of unusual aerobic pathogenic gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol*, 36 (12), 3674–3679.
- Täubel M, Rintala H, Pitkäranta M, Paulin L, Laitinen S, Pekkanen J, Hyvärinen A, Nevalainen A (2009). The occupant as a source of house dust bacteria. *J Allergy Clin Immunol*, 124(4), 834-840.
- Thorne JL, Kishino H, Painter IS (1998). Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. *Mol Biol Evol*, 15(12), 1647-1657.
- Tortoli E (2003). Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev*, 16(2), 319-354.
- Tringe SG e Hugenholtz P (2008). A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Curr Opin Microbiol*, 11(5), 442-446.

- Tringe SG, Zhang T, Liu X, Yu Y, Lee WH, Yap J, Yao F, Suan ST, Ing SK, Haynes M, Rohwer F, Wei CL, Tan P, Bristow J, Rubin EM, Ruan Y (2008). The airborne metagenome in an indoor urban environment. *PLoS One* 3(4), e1862.
- Troesch A, Nguyen H, Miyada CG, Desvarenne S, Gingeras TR, Kaplan PM, Cros P, Mabilat C (1999). *Mycobacterium* species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. *J Clin Microbiol*, 37(1), 49-55.
- Ueda K, Seki T, Kudo T, Yoshida T, Kataoka M (1999). Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. *J Bacteriol*, 181(1), 78-82.
- Waldon E, Szewczyk EM (2002). Ability of *Staphylococcus cohnii* strains to adhere to epithelial cells and solid surfaces in the hospital environment. *Med Dosw Mikrobiol*, 54(2), 109-118.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007). Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol*, 73(16), 5261-5267.
- Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, Moore LH, Moore WEC, Murray RGE, Stackebrandt E, Starr MP, Trüper HG (1987). Report of the ad hoc committee on the reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol*, 37(4), 463-464.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*, 173(2), 697-703.
- Wilson KH (1995). Molecular biology as a tool for taxonomy. *Clin Infect Dis*, 20 (Suppl. 2), S117-S121.
- Wilson KH, Wilson WJ, Radosevich JL, DeSantis TZ, Viswanathan VS, Kuczumski TA, Anderson GL (2002). High-density microarray of small-subunit ribosomal DNA Probes. *Appl Environ Microbiol*, 68(5), 2535-2541
- Woese CR (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Rev*, 51(2), 221-271.
- Woese CR, Stackebrandt E, Macke TJ, Fox GE (1985). A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Syst Appl Microbiol*, 6, 143-151.
- Woo PC, Cheung EY, Leung K, Yuen K (2001). Identification by 16S ribosomal RNA gene sequencing of an Enterobacteriaceae species with ambiguous biochemical profile from a renal transplant recipient. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 39(2), 85-93.
- WHO - World Health Organization (2010). Programmes and projects: indoor air pollution. Acedido em 25 de Julho de 2010 em [www.who.int/indoorair/en/](http://www.who.int/indoorair/en/).
- Wu PC, Su HJ, Lin CY (2000). Characteristics of indoor and outdoor airborne fungi at suburban and urban homes in two seasons. *Sci Total Environ*, 253, 111-118.
- Xu J, Smyth CL, Buchanan JA, Dolan A, Rooney PJ, Millar BC, Goldsmith CE, Elnorn JS, Moore JE (2004). Employment of 16 rDNA gene sequencing techniques to identify culturable environmental eubacteria in a tertiary referral hospital. *J Hosp Infect*, 57(1), 52-58.
- Yang S, Ramachandran P, Hardick A, Hsieh Y, Quianzon C, Kuroki M, Hardick J, Kecojevic A, Abeygunawardena A, Zenilman J, Melendez J, Doshi V, Gaydos C, Rothman RE (2008). Rapid PCR-based diagnosis of septic arthritis by early Gram-type classification and pathogen identification. *J Clin Microbiol*, 46(4), 1386-1390.

Yoon JH, Lee JJ, Kang SS, Takeuchi M, Shin YK, Lee ST, Kang KH, Park YH (2000). *Gordonia nitida* sp. nov., a bacterium that degrades 3-ethylpyridine and 3-methylpyridine. *Int J Syst Evol Microbiol*, 50(Pt. 3), 1203-1210.

Yun J (Não publicado). Bacterial community change of tray-packed pork during chilled storage.

Zbinden M, Pailleret M, Gaudron SM, Ravaux J, Duperron S (Não publicado). Bacteria associated with the gill and digestive tract of the deep-sea limpet *Pectinodonta* sp. from sunken wood.