



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia

Ano 2017

**Tatiana Deolinda dos  
Santos Teixeira da Silva**

**Comunidade microbiana em casas de pacientes  
com doenças respiratórias crónicas em Estarreja**

## **DECLARAÇÃO**

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



**Tatiana Deolinda dos  
Santos Teixeira da Silva**

**Comunidade microbiana em casas de pacientes  
com doenças respiratórias crónicas em Estarreja**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Doutora Isabel da Silva Henriques, Investigadora auxiliar do CESAM da Universidade de Aveiro e coorientação da Doutora Ana Catarina Almeida Sousa, Estagiária em Pós-doutoramento do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Apoio financeiro do Labex DRIIHM (PIA), via OHMI Estarreja através do projeto MicroRESPIRA e GENIAL (ref. PTDC/DTP-PIC/2284/2014), com o apoio financeiro da FCT, através de fundos nacionais e cofinanciado pelo FEDER, no âmbito do novo acordo de parceria PT2020

"A descoberta consiste em ver o que todos viram e em pensar no que ninguém pensou."

Albert Szent-Györgyi

## **o júri**

presidente

**Prof. Doutora Maria Helena Abreu Silva**  
professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutora Maria José Félix Saavedra**  
professora associada com agregação do Departamento de Ciências Veterinárias da  
Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Prof. Doutora Isabel da Silva Henriques**  
investigadora auxiliar do Departamento de Biologia e CESAM da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

Agradeço à Doutora Isabel Henriques, por me ter recebido no seu grupo de trabalho e pela disponibilidade e orientação nesta dissertação. Admiro o gosto e a curiosidade que demonstra ter no seu trabalho. Fico-lhe muito grata por tudo o que me transmitiu.

Agradeço à Doutora Ana Catarina Sousa, pelos seus ensinamentos, simpatia, disponibilidade e pelo apoio demonstrado.

Agradeço à Dra. Carla Valente, peça fundamental neste trabalho, sem ela o recrutamento dos pacientes não seria possível.

Agradeço ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, por nos ter cedido o equipamento de recolha de ar, pois sem esse equipamento não seriam possíveis as colheitas de ar.

Agradeço a Raquel Sousa, pela colaboração, a ajuda e por toda a disponibilidade demonstrada. Obrigada!

A todos os colegas do Microlab que direta ou indiretamente me ajudaram, com boas dicas para o trabalho ou com boa disposição, obrigada.

Agradeço à Doutora Marta Tacão, por toda a disponibilidade e por todos os ensinamentos.

Ao Rafael Tavares, companheiro nas horas de almoço, agradeço-te a paciência, a disponibilidade e a amizade. Foi um prazer trabalhar contigo, sempre correto e profissional!

Agradeço à Marta Alves, pela imensa paciência que tiveste comigo, foste sempre muito simpática e ajudaste muito neste percurso.

Agradeço ao Diogo Ramos, pela colaboração neste trabalho. Obrigada!

Agradeço à Susana Araújo, por todo o apoio, disponibilidade e por todos os conselhos.

Agradeço a minha Mãe, Alexandrina Silva por todos os conselhos, apoio, ajuda, paciência e dedicação. Sem ela nunca poderia ter chegado onde estou. Muito Obrigada!

Ao meu pai Rui Silva e aos meus irmãos Henrique Silva e Sandra Meneses, pela amizade, apoio, carinho e ajuda. Obrigada!

Ao Cristiano Soares, pelo carinho, amor, amizade, ajuda, conversas, risos, apoio e pela paciência enorme.

## palavras-chave

DPOC, Comunidade bacteriana, Resistencia a antibióticos, Tolerância a metais

## resumo

A doença Pulmonar Obstrutiva Crónica (DPOC) é considerada a quarta causa de morte a nível mundial. Esta doença é caracterizada pela diminuição do calibre das vias aéreas respiratórias e destruição do tecido pulmonar. Uma situação de risco em DPOC é a ocorrência de exacerbações, sendo elas na sua maioria associadas a infeções bacterianas.

Os doentes com DPOC passam a maior parte do seu tempo dentro da sua habitação, logo a qualidade do ar interior é muito importante. Um dos fatores que influencia a qualidade do ar é a comunidade bacteriana presente nas habitações. Esta comunidade é afetada por diversos fatores como o nível de humidade, número de ocupantes, número de animais domésticos, entre outros.

No ambiente interior as bactérias existentes podem ser tóxicas, alergénicas e infecciosas e muitas delas são resistentes a antibióticos e tolerantes a metais, tornando-se um risco para a saúde dos habitantes.

O objetivo deste trabalho foi analisar a comunidade bacteriana das habitações de doentes com DPOC.

Usando metodologias dependentes do cultivo, foram determinadas as unidades formadoras de colónias (UFCs) presentes no ar e pó das habitações assim como a percentagem de bactérias resistentes a ampicilina presente nestas amostras. Em meio de cultura não seletivo o número de UFCs variou de acordo com a habitação, na maioria dos casos entre 8 e 800 UFCs/m<sup>3</sup> de ar e 180 a 937 UFCs/g de pó. No entanto, para amostras de pó o número foi muitas vezes incontável nos volumes analisados. Nas amostras para as quais a prevalência de bactérias de Gram negativo resistentes a ampicilina foi quantificada, esta prevalência foi elevada variando de 12 a 78%.

Isolaram-se 47 bactérias Gram-negativas resistentes a ampicilina presentes em amostras de ar e pó. Com base na sequência do gene que codifica a subunidade 16S do rRNA, 93% dos isolados foram afiliados ao género *Pseudomonas*. A suscetibilidade a antibióticos foi analisada usando o método de difusão em agar com discos. Os níveis de resistência foram mais elevados para os antibióticos aztreonam e ceftazidima. Os genes de resistência estudados não foram detetados, exceto num isolado do género *Erwinia* que possuía o gene *bla<sub>SHV</sub>*. A presença de integroes não foi identificada em nenhum isolado. Os isolados apresentaram fenótipos de tolerância aos metais estudados, exceto a mercúrio, ao qual todos os isolados foram sensíveis. A comunidade bacteriana total presente em amostras de pó foi analisada através da amplificação de uma região do gene 16S rRNA e separação dos fragmentos por DGGE (Eletroforese em gel de gradiente desnaturante). Em geral a estrutura da comunidade bacteriana diferiu entre habitações. O número de habitantes, animais domésticos, níveis de humidade, entre outras características das habitações não permitiram explicar a variabilidade observada.

Segundo este estudo podemos concluir que a comunidade bacteriana das casas dos doentes com DPOC varia entre casas, estando presentes bactérias resistentes a antibióticos e tolerantes a metais. Estas bactérias podem representar um risco para a saúde destes pacientes.

## keywords

COPD, Bacterial community, Antibiotic resistance, Metal Tolerance

## abstract

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is considered the fourth leading cause of death worldwide. This disease is characterized by decreased airway calibre and destruction of lung tissue. A risk situation in COPD is the occurrence of exacerbations, most of which are associated with bacterial infections.

Patients with COPD spend most of their time inside their home, so indoor air quality is a matter of concern. One of the factors influencing air quality is the bacterial community present in the dwellings. This community is affected by several factors such as humidity level, number of occupants, number of domestic animals, among others.

In the indoor environment the existing bacteria can be toxic, allergenic and infectious, being frequently resistant to antibiotics and metals and thus becoming a risk to the health of the inhabitants.

The objective of this study was to analyse the bacterial community of houses inhabited by patients with COPD.

Using culture-dependent methodologies, the colony forming units (CFUs) present in house air and dust were determined as well as the percentage of ampicillin-resistant bacteria present in the samples. In non-selective culture medium the number of CFUs varied according housing, in most cases between 8 and 800 CFU/m<sup>3</sup> of air and 180-950 CFU/g powder. However, for powder samples the number was often uncountable in the volumes analyzed. In the samples for which the prevalence of ampicillin resistant Gram-negative bacteria was quantified, this prevalence was high ranging from 12 to 78%.

Forty seven Gram-negative isolates resistant to ampicillin were retrieved from air and powder samples. Based on 16S rRNA gene sequences, 93% of the isolates were affiliated to genus *Pseudomonas*. Antibiotic susceptibility was analysed using the disk diffusion method. Isolates were frequently resistant to aztreonam and ceftazidime. The resistance genes studied were not detected, except *bla*<sub>SHV</sub> in an *Erwinia* isolate. The presence of integrons was not identified in any isolates. Tolerance to various metals was tested. The isolates presented tolerance phenotypes to the studied metals, except for mercury, to which all the isolates were sensitive.

The total bacterial community present in dust samples was analysed by amplifying 16S rRNA gene fragments, which were separated by DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis). The bacterial community varied among houses. The number of inhabitants, domestic animals, humidity levels, and other characteristics of the dwellings did not allow to explain the observed variability.

Our results suggest that the bacterial community varied among houses, comprising antibiotic resistant and metal tolerant bacteria. These bacteria may pose a risk to the health of these patients

## Índice

<b>I. Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica (DPOC)</b> .....	<b>1</b>
1.1. Fatores de risco .....	2
1.2. Exacerbações.....	3
1.3. DPOC em Portugal.....	4
<b>2. Microbiologia do ar</b> .....	<b>5</b>
2.1. Efeitos dos bioaerossóis na saúde .....	6
2.1.1. Doenças respiratórias .....	6
2.2. Qualidade do ar interior (QAI).....	7
2.2.1. Condições ambientais do ar interior .....	8
2.2.2. Síndrome do Edifício Doente .....	9
2.3. Bactérias do ambiente interior .....	9
2.3.1. Bactérias de ambientes interiores associadas a doenças respiratórias .....	10
<b>3. Antibióticos</b> .....	<b>12</b>
3.1. Classificação das classes dos antibióticos .....	12
3.1.1. Antibióticos que inibem a síntese da parede celular.....	13
3.1.2. Antibióticos que inibem a síntese da membrana citoplasmática .....	14
3.1.3. Antibióticos que inibem a síntese proteica .....	14
3.1.4. Antibióticos que alteram a síntese dos ácidos nucleicos .....	14
3.1.5. Antibióticos que inibem vias metabólicas .....	14
<b>4. Resistência a antibióticos</b> .....	<b>15</b>
4.1. Resistência natural e adquirida.....	15
4.2. Mecanismos de resistência a antibióticos.....	16
4.3. Resistência a antibióticos no ambiente .....	17
4.3.1. Resistência a antibióticos no ambiente interior .....	17
<b>5. Descrição do problema</b> .....	<b>19</b>
<b>II. Objetivos</b> .....	<b>21</b>
<b>III. Material e métodos</b> .....	<b>23</b>
<b>1. Recrutamento de pacientes</b> .....	<b>23</b>
<b>2. Recolha de amostras</b> .....	<b>24</b>
2.1. Amostras de ar .....	24

<b>3. Processamento das amostras de Pó.....</b>	<b>25</b>
3.1. Triagem de Pó.....	25
3.2. Análise de bactérias cultiváveis nas amostras de pó.....	25
3.3. Purificação de DNA total a partir de amostras de pó.....	25
3.4. Amplificação da região V3 do gene 16S rRNA.....	26
3.5. Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE).....	27
<b>4. Caracterização dos isolados bacterianos.....</b>	<b>28</b>
4.1. Análise de diversidade genotípica através de BOX-PCR.....	28
4.2. Amplificação do gene 16S rRNA e afiliação filogenética.....	29
<b>5. Determinação da suscetibilidade a antibióticos.....</b>	<b>30</b>
<b>6. Avaliação da tolerância a metais.....</b>	<b>30</b>
<b>7. Detecção de integrões.....</b>	<b>31</b>
<b>8. Detecção de genes de resistência a antibióticos.....</b>	<b>31</b>
<b>IV. Resultados e discussão.....</b>	<b>33</b>
<b>1. Caracterização da Habitação.....</b>	<b>33</b>
<b>2. Análise das amostras de ar e pó.....</b>	<b>35</b>
2.1. Isolados bacterianos.....	39
<b>3. Tipagem molecular e afiliação filogenética dos isolados.....</b>	<b>40</b>
<b>4. Suscetibilidade dos isolados bacterianos a antibióticos.....</b>	<b>45</b>
<b>5. Detecção de genes resistência a antibióticos e integrões.....</b>	<b>49</b>
<b>6. Quantificação de metais presentes no pó.....</b>	<b>50</b>
<b>7. Tolerância a metais.....</b>	<b>52</b>
<b>8. Análise da comunidade microbiana por PCR-DGGE.....</b>	<b>53</b>
<b>V. Considerações Finais.....</b>	<b>57</b>
<b>VI. Bibliografia.....</b>	<b>59</b>
<b>VII. Anexos.....</b>	<b>74</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Representação gráfica dos fatores de risco para DPOC nos diferentes estágios da vida (Postma et al. 2015).....	2
<b>Figura 2.</b> Localização do Complexo Químico de Estarreja (CQE) e o ponto de descargas dos efluentes provenientes do CQE, representado pelo nº 1 (adaptação de Costa e Rydin, 2001). 20	
<b>Figura 3.</b> Amostrador de ar (Merck Air Sampler MAS-100) durante uma recolha de ar. ....	24
<b>Figura 4A e 4B.</b> Perfis BOX-PCR obtidos a partir de 47 isolados de amostras de ar e pó. Os isolados que apresentam cor preta têm perfis de bandas distintos. Relativamente às restantes cores, cores iguais indicam perfis de bandas semelhantes. ....	40
<b>Figura 5.</b> Dendrograma elaborado de acordo com a similaridade genotípica dos 47 isolados, inferida pela posição das bandas obtidas por BOX-PCR. A similaridade foi determinada pelo índice de Pearson e o dendrograma construído pelo método UPGMA.....	42
<b>Figura 6.</b> Suscetibilidade antibiótica dos isolados de <i>Pseudomonas</i> analisados durante o estudo. (PRL-Piperacilina; TZP- Piperacilina e tazobactam; FEZ- Cefepima; CAZ-Ceftazidima; IPM- Imipenemo; CIP- Ciprofloxacina; ATM-Aztreonam; CN-Gentamicina).....	47
<b>Figura 7.</b> Perfis de PCR-DGGE obtidos a partir das 15 amostras de pó. A, B, C e D são bandas que estão presentes na maioria das amostras.....	53
<b>Figura 8.</b> Dendrograma das amostras de pó colhidas nas habitações dos pacientes, elaborado de acordo com as semelhanças estruturais inferidas pela posição das bandas referentes à região V3 do gene 16S rRNA, separadas por DGGE. A similaridade foi determinada pelo índice de Pearson e o dendrograma construído pelo método UPGMA.....	54

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Doenças respiratórias não-infecciosas, potenciais agentes causais e ambientes de trabalho com riscos (Douwes et al. 2003). .....	7
<b>Tabela 2.</b> Sumário dos antibióticos inibidores da síntese da parede celular (Van Hoek et al. 2011; Yılmaz e Özcengiz 2016; Neu, 1992). .....	13
<b>Tabela 3.</b> Mecanismos de resistência a antibióticos comumente usados (Davies e Davies, 2010). 16	
<b>Tabela 4.</b> Composição da reação de PCR usada para amplificação do gene 16S rRNA.....	26
<b>Tabela 5.</b> Composição das soluções usadas para preparação do gel de DGGE .....	27
<b>Tabela 6.</b> Composição das reações de BOX-PCR.....	28
<b>Tabela 7.</b> Composição das reações de PCR para amplificação do gene 16S rRNA.....	29
<b>Tabela 8.</b> Antibióticos usados nos testes de suscetibilidade a antibióticos. ....	30
<b>Tabela 9.</b> <i>Primers</i> usados para a amplificação de genes que codificam para integrases de classe 1 (intI1) e classe 2 (intI2). .....	31
<b>Tabela 10.</b> <i>Primers</i> usados para a amplificação de genes de resistência a antibióticos. ....	32
<b>Tabela 11.</b> Características das habitações dos pacientes, relativamente ao número de habitantes, número de animais domésticos (interior e exterior da habitação) e condições habitacionais (localização da habitação, tipo de habitação, nível de humidade e bolor visível. ....	34
<b>Tabela 12.</b> Abundância de bactérias cultiváveis em amostras de ar e pó e percentagem (%) de bactérias resistentes a ampicilina.....	36
<b>Tabela 13.</b> Número de isolados resistentes a ampicilina em amostras de ar e pó e sua respetiva nomenclatura. ....	39
<b>Tabela 14.</b> Lista de isolados, afiliação filogenética e percentagem de similaridade com a sequência mais próxima depositada no GenBank. ....	43
<b>Tabela 15.</b> Resistência a antibióticos (PRL-Piperacilina; TZP-Piperacilina-tazobactam, FEZ-Cefepima; CAZ-Ceftazidima; IPM-Imipenemo; CIP-Ciprofloxacina; ATM-Aztreonam; CN-Gentamicina) e tolerância a metais para os isolados (Cu-cobre; Cr-Crómio; Zn-Zinco; Hg-mercúrio; As-arsénio; Ni-Níquel).....	46
<b>Tabela 16.</b> Concentração de metais ( $\mu\text{g}$ de metal/g de pó) presente nas amostras de pó. ....	50

## Índice de Abreviaturas

- : Sensível
- +: Tolerante
- µg: micrograma
- µl: microlitro
- µM: micromolar
- AMP: Ampicilina
- As: Arsénio
- ATM: Aztreonam
- BLAST: Ferramenta básica de busca de alinhamento local
- BOX-PCR: Elementos BOX-Reação em cadeia da polimerase
- CAZ: Ceftazidima
- CIP: Ciprofloxacina
- cm: centímetros
- CN: Gentamicina
- CQE: Complexo Químico de Estarreja
- Cr: Crómio
- Cu: Cobre
- DGGE: Eletroforese em gel de gradiente desnaturante
- dH<sub>2</sub>O: água destilada
- DNA: Ácido Desoxirribonucleico
- DPOC: Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica
- FEP: Cefepima
- g: gramas
- h: horas
- Hg: Mercúrio
- IPM: Imipenemo
- L: Litro
- m/v: massa por volume
- M: Molar
- m<sup>3</sup>: metro cúbico
- min: minuto

mL: mililitros

NCBI: Centro Nacional de Informações Biotecnológicas

ND: Não determinado

ng: nanograma

Ni: Níquel

°C: Graus Celcius

Pb: Pares de bases

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PRL: Piperacilina

QAI: Qualidade do Ar Interior

R: Resistente

RNA: Ácido Ribonucleico

rRNA: RNA ribossomal

S: Sensível

seg: segundos

TEMED: Tetrametil Etileno Diamida

TSA: *Tryptic Soy Agar*

TZP: Piperacilina-Tazobactam

UFC: Unidade Formadora de Colónia

V: Voltes

Zn: Zinco

### **1. Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica (DPOC)**

A taxa de envelhecimento populacional tem vindo a aumentar principalmente em países mais desenvolvidos, devido aos avanços da medicina e às melhores condições de vida e de trabalho. Esta situação resulta num aumento da prevalência de doenças crónicas.

As doenças crónicas são um importante desafio de saúde pública, principalmente pela morbidade e mortalidade que causam. A Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica (DPOC) não é exceção, sendo uma das principais causas de morte no mundo (Calverley et al. 2007). A doença causa cerca de 2,75 milhões de mortes por ano, e o número está projetado para aumentar, sendo atualmente considerada a quarta causa de morte a nível mundial (Calverley et al. 2007; Araújo, 2016). Na União Europeia a DPOC representa mais de 50% dos custos associados a doenças respiratórias (Calverley et al. 2007; Araújo, 2016).

DPOC é uma das doenças mais comuns que afeta os pulmões. Engloba um grupo heterogéneo de condições que envolvem as vias aéreas e parênquima pulmonar, como obstrução brônquica persistente, fibrose das pequenas vias aéreas e destruição dos espaços alveolares, resultando em enfisema pulmonar (Rabe et al. 2007).

Asma e DPOC são duas doenças que partilham uma característica funcional comum, a limitação de fluxo de ar. Na DPOC, a limitação do fluxo de ar é não reversível, enquanto na asma esta limitação pode ser reversível, de forma natural ou após tratamento (Weidinger, 2012). Estas duas doenças podem ocorrer em simultâneo em pacientes de meia-idade e idosos (Weidinger, 2012).

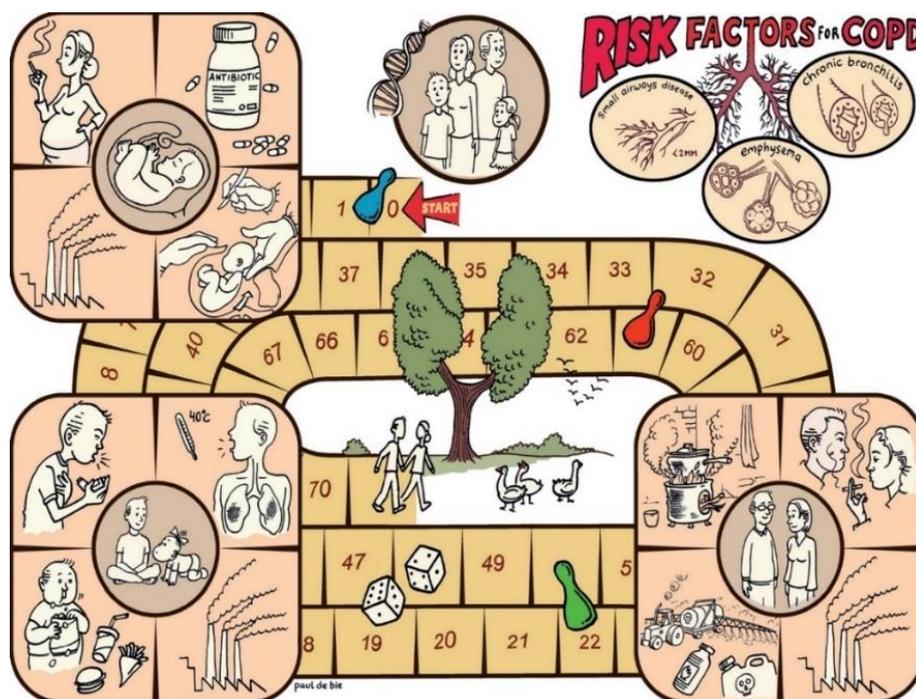
O diagnóstico de DPOC exige a prova espirométrica da limitação do fluxo aéreo (Fragoso et al. 2016; Garcia et al. 2008). A DPOC é uma doença heterogénea pelo que os valores espirométricos não chegam para estabelecer um diagnóstico viável. Outros parâmetros como a sintomatologia e a frequência de exacerbações têm de ser tidos em conta para se obter um diagnóstico mais assertivo (Araújo, 2016). Embora a DPOC possa estar presente sem sintomas significativos, os sintomas clássicos incluem tosse, dispneia e produção de expetoração (Nazir e Erbland, 2009). A asma é excluída como sintoma (Weidinger, 2012).

O tratamento da DPOC passa, primeiramente, pela cessação do tabaco, num doente fumador (Rabe et al. 2007). Posteriormente segue-se a terapêutica farmacológica associada a broncodilatadores, isolados ou em associação, preferencialmente por via inalatória,

podendo-se ainda associar os corticoides inalados (Araújo, 2016). Apesar de algumas abordagens terapêuticas serem consensuais, o tratamento da DPOC deve ser orientado para o paciente, sendo que só assim se consegue uma terapêutica eficaz (Ferreira et al. 2016).

### 1.1. Fatores de risco

O principal fator de risco para o desenvolvimento de DPOC é o tabagismo. No entanto, não é o único fator de risco, uma vez que estudos recentes têm mostrado que muitos pacientes não fumadores desenvolvem a doença (Nazir e Erbland, 2009; Celli et al. 2005). Nalguns casos fatores genéticos podem influenciar o desenvolvimento da doença (Nazir e Erbland, 2009). De uma forma geral os fatores além do tabagismo são: fatores genéticos, a progenitora fumar durante a gravidez, a inalação de fumo durante a infância, estilo de vida (dieta e exercício) e poluição do ar interior e exterior (Figura 1) (Postma et al. 2015; Rabe et al. 2007).



**Figura 1.** Representação gráfica dos fatores de risco para DPOC nos diferentes estágios da vida (Postma et al. 2015).

## 1.2. Exacerbações

A morbidade e mortalidade nos doentes com DPOC estão associadas a exacerbações. Estas exacerbações podem ocorrer uma a três vezes por ano (Sethi et al. 2002).

Sabe-se que 50% das exacerbações estão associadas a infeção bacteriana. A ocorrência de exacerbações fortes está associada à ocorrência das espécies bacterianas *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae* ou *Pseudomonas aeruginosa* (Sethi e Murphy, 2008). O microbioma de pulmões de pessoas com DPOC tem vindo a ser, nos últimos anos, alvo de estudo devido ao facto do agravamento da doença estar associado a disrupções do microbioma pulmonar (Dickson et al. 2013; Dy e Sethi, 2016). A composição do microbioma pulmonar altera-se com o tabagismo, a gravidade da DPOC, durante as exacerbações agudas e com o uso de esteroides e/ou antibióticos (Dy e Sethi, 2016).

A presença de bactérias potencialmente patogénicas nas vias aéreas inferiores foi associada ao aumento da inflamação. Além disso, a alteração do microbioma pulmonar das vias aéreas inferiores contribui para um avanço da doença pelo aumento da inflamação e consequente lesão pulmonar (Dy e Sethi, 2016). Durante uma exacerbação aguda, a composição taxonómica do microbioma é alterada, sugerindo que as exacerbações poderão resultar de uma infeção polimicrobiana, derivada de uma dinâmica de microrganismos e enriquecimento de uma espécie patogénica dominante (Dy e Sethi, 2016).

A prevenção das exacerbações começa pelo correto tratamento da doença, vacinação contra a gripe, prevenção da doença pneumocócica e aumento da atividade física (Araújo, 2016).

### **1.3. DPOC em Portugal**

Cada vez mais a DPOC representa uma doença preocupante no nosso país, visto ser uma das grandes causas de mortalidade. Em 2006 foi considerada a quinta doença mais mortífera em Portugal e hoje estima-se que será a terceira (Cravo et al. 2016). A sua prevalência foi estimada em 14,2% em adultos com mais de 40 anos (18,7% de prevalência em homens e 10,5% nas mulheres), sendo que a grande maioria dos casos (86,8%) ainda não é diagnosticada, segundo um estudo efetuado numa amostra representativa da população da área metropolitana de Lisboa em 2013 (Bárbara et al. 2013).

O número de internamentos por DPOC entre 2000 e 2008 aumentou cerca de 20% no país, representando um custo superior a 25 milhões de euros, sendo a doença respiratória com maior impacto socioeconómico (Araújo, 2016).

Os estudos realizados em Portugal têm-se debruçado sobre o melhoramento do diagnóstico e a identificação do melhor tratamento dependo do estado da doença. Portanto os tratamentos propostos têm como objetivo melhorar o bem-estar, a tolerância ao exercício físico e a diminuição da progressão da doença (Fragoso et al. 2016; Ferreira et al. 2016; Araújo, 2016). Por exemplo a aplicação do treino de músculos inspiratórios em doentes com DPOC moderada a muito grave induz a melhoria da força destes músculos com repercussão na melhoria da qualidade de vida do paciente (Garcia et al. 2008).

Estes estudos pretendem também encontrar um consenso total sobre a sequência do tratamento ótimo, o que tem vindo a ser dificultado devido à heterogeneidade da doença e à ausência de biomarcadores para orientar o tratamento (Fragoso et al. 2016; Ferreira et al. 2016; Araújo, 2016).

## **2. Microbiologia do ar**

Os microrganismos são diversos e ubíquos, e contribuem para a circulação global de matéria. Eles são abundantes nos diversos ecossistemas como o solo, ar, água, animais e plantas.

A flora microbiana do ar é transitória e variável, sendo o número e os tipos de agentes contaminantes do ar determinados pelas várias fontes de contaminação existentes no ambiente. No ar os microrganismos podem ser encontrados em suspensão, em material particulado e em gotas de água. Estes agentes são conhecidos por bioaerossóis (Galès et al. 2015; Douwes et al. 2003).

Bioaerossóis são definidos como aerossóis ou partículas de origem microbiana, vegetal ou animal e o termo é muitas vezes usado como sinônimo de pó orgânico (Douwes et al. 2003). O pó orgânico pode consistir numa mistura de bactérias, fungos, vírus, endotoxinas, micotoxinas, peptidoglicanos, pólen, fibras vegetais, etc. (Douwes et al. 2003). O transporte dos bioaerossóis faz-se através do vento, massas de ar e turbulências da atmosfera (Yoo et al. 2017). O tamanho dos bioaerossóis pode variar de 1 nm a aproximadamente 100 µm. Este é um parâmetro chave na definição do seu comportamento dinâmico e nas distâncias percorridas (Galès et al. 2015). A intensidade da contaminação microbiana é influenciada por mecanismos de dispersão a partir da superfície da Terra, pela hora do dia, a estação do ano e situações de ordem climática (Yoo et al. 2017).

As atividades antropogênicas têm sido, nos últimos anos, responsáveis pelo aumento de bioaerossóis. Alguns exemplos são a reciclagem de resíduos, produção de substâncias biológicas, indústria de químicos, agricultura, tratamento de resíduos, entre outros (Douwes et al. 2003).

## **2.1. Efeitos dos bioaerossóis na saúde**

Na maioria das situações de exposição a bioaerossóis ocorrem misturas de toxinas e alergénios, levando ao aumento dos riscos para a saúde. As doenças associadas à exposição a bioaerossóis podem-se classificar em 3 grupos: doenças infecciosas, doenças respiratórias e cancro (Douwes et al. 2003). As doenças infecciosas e respiratórias são as mais comuns, contudo podem ocorrer dermatites ou até mesmo nascimentos prematuros ou abortos tardios quando as mulheres estão expostas a micotoxinas com efeitos imunotóxicos e do tipo hormonal (Douwes et al. 2003).

### **2.1.1. Doenças respiratórias**

Os sintomas respiratórios e comprometimento da função pulmonar são provavelmente os mais estudados entre os efeitos orgânicos associados a bioaerossóis (Deng et al. 2016; Douwes et al. 2003; Sordillo et al. 2010). Os sintomas respiratórios geralmente resultam da inflamação das vias aéreas, causada por exposições a toxinas específicas, agentes pró-inflamatórios ou alergénios (Wouters et al. 2002; Douwes et al. 2003). Com base nos mecanismos inflamatórios implícitos e nos sintomas posteriores, pode ser feita uma distinção entre doenças respiratórias alérgicas e não-alérgicas (Douwes et al. 2003).

Os sintomas respiratórios de doenças não-alérgicas consistem numa inflamação não-imune, enquanto os sintomas respiratórios de doenças alérgicas refletem uma inflamação imune-específica em que vários anticorpos (IgE, IgG) desempenham um papel importante na resposta inflamatória. As doenças não-alérgicas com maior incidência são a asma e DPOC (Douwes et al. 2003). A Tabela 1 apresenta uma visão geral das doenças respiratórias alérgicas e não alérgicas em relação com agentes potenciais.

**Tabela 1.** Doenças respiratórias não-infecciosas, potenciais agentes causais e ambientes de trabalho com riscos (Douwes et al. 2003).

<b>Doenças respiratórias</b>	<b>Agentes</b>	<b>Ambientes</b>
<i>Não-alérgicas</i>		
Asma não-alérgica, rinite não alérgica, irritação na membrana mucosa, DPOC	Fungos, bactérias, endotoxinas, betaglucano, micotoxinas	Agricultura, tratamento/manuseamento de esgotos/estrumes e indústria de alimentos para animais, processamento de fibras animais, indústria de madeira, produção de papel, matadouros, indústria de metais, recolha de lixo e compostagem; edifícios com sistemas de ventilação
<i>Alérgicas</i>		
Asma alérgica, rinite alérgica, pneumonia por hipersensibilidade/ alveolite alérgica extrínseca	Fungos, enzimas microbianas, proteínas vegetais, proteínas de mamíferos, proteínas invertebradas	Indústria biotecnológica e produtores de enzimas, rações para animais, indústria de detergentes, indústria de biopesticidas

## 2.2. Qualidade do ar interior (QAI)

O ar que respiramos é essencial para a vida, logo uma boa qualidade do ar é vital para a nossa sobrevivência. Uma qualidade do ar inadequada afeta o nosso bem-estar levando a consequências graves na saúde (Seguel et al. 2016). Logo a qualidade do ar deve ser encarada como uma questão de saúde pública.

A maioria da população passa cerca de 90% do seu tempo em ambientes internos (habitações, escolas, escritórios, espaços comerciais, etc.) (Hartmann et al. 2016). A qualidade do ar interior (QAI) inadequada afeta o conforto, a produtividade e a saúde ainda mais do que a qualidade do ar no exterior, afetando em especial os grupos mais vulneráveis como as crianças e os idosos (Ashmore e Dimitroulopoulou, 2009).

A qualidade do ar ótima pode ser definida como o ar que se encontra desprovido de poluentes (Seguel et al. 2016). Apesar do papel determinante que este fator tem na saúde e no bem-estar, o controlo da QAI não é efetuado de forma regular, sendo na maioria das vezes inadequado e deficiente (Seguel et al. 2016). Portanto, é importante definir estratégias de abordagem e controlo de ambientes interiores, tentando desta forma eliminar ou atenuar os

problemas do ambiente interior dos edifícios, de modo a atingir-se uma QAI no mínimo aceitável (Seguel et al. 2016).

### **2.2.1. Condições ambientais do ar interior**

As condições ambientais regulam o crescimento microbiano em cada um dos microambientes. Os fatores determinantes do grau de contaminação do ar interior são as taxas de ventilação, número de pessoas e animais domésticos que ocupam o ambiente, e o grau de atividade exercida por esses indivíduos (Nevalainen e Seuri, 2005).

Alguns dos microrganismos contaminantes têm efeitos negativos na saúde, quer como agentes patogénicos ou por contribuir para o desenvolvimento de alergias e asma. Outros microrganismos podem mesmo ser benéficos [ex. abundância do género *Acinetobacter* na pele aumenta a expressão de interleucina 10 (IL-10) (Hanski et al. 2012)]. Uma vez que o estilo de vida atual implica passarmos mais tempo no interior das habitações, é expectável que a abundância e diversidade de micróbios neste ambiente seja também maior (Barberán et al. 2015).

Em áreas interiores, podemos encontrar muitos materiais e fontes de nutrientes que podem facilitar a colonização por microrganismos (Schleibinger et al. 2004; Tischer et al. 2015; Bernstein et al. 2008), como por exemplo:

- Revestimento e decoração de edifícios (colas de isolamento, aglomerados de madeira, alcatifas, papéis de parede, pintura e vernizes)
- Equipamentos eletrónicos (impressoras, fotocopiadoras e computadores)
- Substratos naturais

Outros fatores que contribuem para esta colonização são:

- Utilização de produtos de limpeza
- Número de habitantes
- Fumo do tabaco
- Animais
- Ventilação
- Humidade
- Temperatura
- Idade do edifício
- Contaminantes químicos

Os habitantes geram dispersão de várias substâncias químicas, em particular de compostos orgânicos voláteis, ozono e dióxido de carbono, que podem atingir, em ambientes interiores, concentrações duas a cem vezes superiores às verificadas em ambiente externo (Bernstein et al. 2008). Em geral, o nível de poluentes no ar de ambientes internos é muitas vezes superior ao encontrado no ar exterior (Stathopoulou et al. 2008).

A humidade relativa baixa contribui para o desenvolvimento de doenças oculares e das vias respiratórias; por outro lado a humidade relativa alta contribuiu para a condensação da água e o crescimento de microrganismos (Norbäck, 2009).

A idade do edifício é um fator a ter em conta dado que edifícios antigos tendem a ter equipamentos degradados, acumulação de pó, bolor, humidade nas paredes, acumulação de contaminantes químicos e biológicos nos sistemas de refrigeração, e presença de metais tóxicos nas pinturas das paredes que neste momento se encontram banidos (Tischer et al. 2015).

### **2.2.2. Síndrome do Edifício Doente**

A síndrome do edifício doente foi definida pela Organização Mundial de Saúde em 1983 (World health organization, 2016). O edifício é considerado “doente” quando se verifica a diminuição da qualidade do ar e quando os habitantes apresentam um conjunto de sintomas de desconforto nomeadamente: alergias oculares e nasais, erupções cutâneas, fadiga sensibilidade a odores e dificuldade de concentração (Broberg e Norbäck, 2012). O número de queixas relacionadas com esta síndrome tem aumentado nos últimos anos devido ao crescente uso de materiais sintéticos e às medidas de conservação da energia que reduzem a entrada de ar exterior (Broberg e Norbäck, 2012).

### **2.3. Bactérias do ambiente interior**

Recentemente tem havido uma grande preocupação acerca dos potenciais riscos para a saúde representados pelos componentes biológicos no ar, especialmente acerca dos níveis de bactérias alergénicas e a sua associação com a QAI (Deng et al. 2016).

Bactérias de ambientes interior podem ser tóxicas, alergénicas e/ou infecciosas. Não existe um consenso sobre quais as bactérias que existem num ambiente interior. De facto, se o ambiente interior for uma casa, jardim-de-infância ou um hospital, as espécies que vão estar representadas e a abundância de cada espécie serão diferentes (Emerson et al. 2016;

Deng et al. 2016). No entanto sabe-se que existe uma dominância de bactérias Gram-positivas, incluindo um subconjunto de gêneros bacterianos conhecidos por estarem associados a fontes humanas (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium* e *Propionibacterium*) (Hanson et al. 2016; Hospodsky et al. 2012; Täubel et al. 2009). Bactérias Gram-negativas (incluindo membros do filo Bacteroidetes e Proteobacteria) também estão representadas no interior, embora em percentagens muito inferiores relativamente a Gram-positivas (Hanson et al. 2016; Adhikari et al. 2014; Soleimani et al. 2016). Alguns exemplos de gêneros de bactérias Gram-negativas presentes em habitações são *Paracoccus*, *Massilia* e *Pseudomonas* (Hanson et al. 2016; Suraju et al. 2015).

As bactérias do ambiente interior têm a capacidade de degradar substratos sintéticos (Megharaj et al. 2011). Esta função de degradação é importante dentro de casa, onde os produtos químicos domésticos podem alterar o microbioma. Estes produtos químicos (pesticidas, ftalatos, triclosano, fragrâncias e polímeros sintéticos) podem exercer pressão seletiva sobre bactérias, com potencial para alterar drasticamente a composição da comunidade microbiana (Hanson et al. 2016).

### **2.3.1. Bactérias de ambientes interiores associadas a doenças respiratórias**

A maioria das bactérias no interior de habitações estão associadas a doenças ao nível do trato respiratório. O trato respiratório não é estéril, sendo habitado por um microbioma muito diversificado e abundante (Niedermaier e Zumla, 2016). As bactérias residentes cumprem diferentes funções, sendo uma delas a regulação da imunidade. Alterações no microbioma estão associados a um aumento de infeções (Dickson et al. 2013). Em pulmões doentes, as condições tornam-se muitas vezes mais favoráveis para proliferação bacteriana, e evidências deste crescimento estão documentadas na literatura (Downward et al. 2011; Hilty et al. 2010; Huang et al. 2010). Indivíduos saudáveis e indivíduos com doenças respiratórias, como a fibrose cística, DPOC e asma, albergam microbiomas significativamente diferentes (Downward et al. 2011; Hilty et al. 2010).

### **Bactérias Gram-Negativas**

Bactérias Gram-negativas produzem endotoxinas, geralmente compostas por lipopolissacarídeos (LPS), que são componentes da parede celular, não alergénicos e com fortes propriedades pró-inflamatórias (Douwes et al. 2003). As endotoxinas podem causar efeitos tóxicos agudos, incluindo febre, mal-estar, tremores, artralgia, leucocitose sanguínea, inflamação neutrófila das vias respiratórias, sintomas de asma tais como tosse seca, bem como o comprometimento da função pulmonar (dependente da dose) e diminuição da difusão pulmonar (Deng et al. 2016; Wouters et al. 2002; Sordillo et al. 2010).

Os indivíduos com asma ou DPOC têm sido relatados por conterem no seu microbioma das vias respiratórias uma maior abundância de Proteobacteria relativamente a indivíduos saudáveis (Adar et al. 2016; Hilty et al. 2010). As espécies mais comuns neste contexto são: 1) *Pseudomonas aeruginosa*, considerada um agente patogénico oportunista, causando pneumonia em pacientes imunocomprometidos, tais como pessoas com fibrose cística ou DPOC (Albuquerque et al. 2016); 2) *Haemophilus influenzae* não tipável, sendo a causa mais comum de colonização bacteriana das vias respiratórias em pacientes com DPOC e também a principal causa de exacerbações bacterianas (25% a 80% das exacerbações bacterianas), estando assim associada a exacerbações muito graves (King et al. 2013); e 3) *Moraxella catarrhalis*, uma bactéria oportunista, que em crianças causa infeções no trato respiratório superior (otite média), enquanto em adultos provoca infeções nas vias aéreas previamente comprometidas (exacerbação aguda em DPOC) (Murphy et al. 2016).

### **Bactérias Gram-Positivas**

No grupo das bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus*, através de produção de toxinas ou de penetração, causa pneumonia (Ludden et al. 2013) e *Streptococcus pneumoniae* tende a causar doenças em indivíduos quando eles estão fragilizados, podendo por exemplo causar pneumonias em doentes com gripe (Deng et al. 2016).

### **3. Antibióticos**

A descoberta e a produção de antibióticos na primeira metade do século anterior foi uma das maiores realizações no tratamento de infecções. O uso de agentes antimicrobianos reduziu a morbidade e mortalidade associadas a doenças infecciosas, e contribuiu substancialmente para o melhoramento da qualidade de vida humana.

Para além do tratamento de doenças infecciosas, os antibióticos são usados como agentes profiláticos e são também amplamente utilizados em práticas agrícolas (Van Hoek et al. 2011).

Os antibióticos podem apresentar duas ações distintas, a inibição do crescimento bacteriano através da ação bacteriostática, e a morte de uma população bacteriana, por uma ação bactericida (Pankey e Sabath, 2004). A ação bacteriostática impede o crescimento das bactérias enquanto um bactericida atua em processos vitais para a célula levando à morte celular (Pankey e Sabath, 2004).

#### **3.1. Classificação das classes dos antibióticos**

Os antibióticos diferem nas suas propriedades físicas, químicas, farmacológicas, no espectro e mecanismos de ação (Davies e Davies, 2010). Os antibióticos podem ser classificados segundo o seu mecanismo de ação: inibição da síntese da parede celular, inibição da síntese ou dano da membrana citoplasmática, inibição da síntese proteica, alterações na síntese dos ácidos nucleicos e inibição de vias metabólicas (Van Hoek et al. 2011).

### 3.1.1. Antibióticos que inibem a síntese da parede celular

Os antibióticos que inibem a síntese da parede celular são os  $\beta$ -lactâmicos, a bacitracina e os glicopéptidos como se pode verificar na tabela 2.

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são bastante prescritos nos dias que correm, dada a sua eficácia terapêutica e baixa toxicidade. Este grupo de antibióticos engloba as penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos, monobactâmicos (Neu, 1992). Nesta classe incluem-se ainda inibidores de  $\beta$ -lactamases (ex. ácido clavulânico, sulbactam, tazobactam), que apesar de não exibirem atividade antimicrobiana relevante, possuem uma estrutura química similar às restantes moléculas incluídas nesta classe.

Os  $\beta$ -lactâmicos inibem a síntese de peptidoglicano por ligação às proteínas de ligação à penicilina (PBPs), interferindo desta forma com a transpeptidação terminal na parede celular bacteriana. Como consequência, a parede celular é fragilizada e o resultado final é a citólise ou morte devido à pressão osmótica (Van Hoek et al. 2011).

**Tabela 2.** Sumário dos antibióticos inibidores da síntese da parede celular (Van Hoek et al. 2011; Yılmaz e Özcengiz 2016; Neu, 1992).

Classes		Antibióticos
<b><math>\beta</math>-lactâmicos</b>	Penicilinas	Benzilpenicilina (Penicilina G) Fenoximetilpenicilina (Penicilina V) Aminopenicilina (Amoxicilina e Ampicilina) Isoxazolilpenicilina (Flucloxacilina) Ureidopenicilina (Piperacilina, Azlocilina e Mezlocilina)
	Cefalosporinas	1ª Geração (Cefalotina, Cefazolina e Cefradina) 2ª Geração (Cefoxitina, Cefotetano e Cefmetazole) 3ª Geração (Ceftazidima, Cefotaxima e Ceftriaxona) 4ª Geração (Cefepima)
	Carbapenemos	Ertapenemo, Imipenemo e Meropenemo
	Monobactâmicos	Aztreonam
<b>Glicopeptídeo</b>	Vancomicina	
	Teicoplanina	
<b>Bacitracina</b>		

### **3.1.2. Antibióticos que inibem a síntese da membrana citoplasmática**

Os antibióticos capazes de desorganizar a membrana citoplasmática podem ser agentes aniônicos, catiônicos ou neutros (polimixinas). As polimixinas foram descobertas em 1947 e embora existam cinco moléculas de polimixina conhecidas, sequencialmente designadas polimixina A a E, apenas duas polimixinas estão disponíveis para uso terapêutico: polimixina B e polimixina E (colistina) (Chen e Kaye, 2009). As polimixinas atuam sobre a membrana celular de bactérias gram-negativas (Hermsen et al. 2003).

### **3.1.3. Antibióticos que inibem a síntese proteica**

A ligação destes antibióticos às subunidades 30s e 50s dos ribossomas bacterianos inibem ou modificam a síntese proteica. Os antibióticos que têm a capacidade de inibir a síntese proteica são: as tetraciclina, anfenicóis, aminoglicosídeos, macrólidos, lincosamida e oxazolidinonas (Bächi, 2002; Van Hoek et al. 2011)

### **3.1.4. Antibióticos que alteram a síntese dos ácidos nucleicos**

Os antibióticos que interferem na síntese dos ácidos nucleicos são as fluoroquinolonas e a rifampicina. A rifampicina inibe a síntese de RNA, ligando-se à RNA polimerase dependente de DNA (Zarei et al. 2016) e as fluoroquinolonas inibem a síntese de DNA ligando-se à subunidade A da DNA girase (topoisomerase) impedindo o superenrolamento do DNA (Van Hoek et al. 2011).

### **3.1.5. Antibióticos que inibem vias metabólicas**

As sulfonamidas são dos antibióticos mais antigos e atuam ao nível do metabolismo do ácido fólico. Foi desenvolvido um número de sulfonamidas diferentes das quais a mais utilizada atualmente é o sulfametoxazol. Além disso, desde 1968, a combinação de trimetoprim e sulfametoxazol (co-trimoxazol) tem sido usada amplamente porque a combinação de ambos os fármacos em certas concentrações tem um efeito bactericida sinérgico (Van Hoek et al. 2011). Uma sulfonamida, com a sua analogia estrutural com o ácido p-aminobenzóico, inibe competitivamente a enzima dihidropteroato sintase (DHPS). Esta enzima atua na via biossintética do ácido fólico, necessário para a produção de timina e crescimento de células bacterianas (Roberts, 2002).

#### **4. Resistência a antibióticos**

As infecções têm sido uma das principais causas de doença ao longo da história da humanidade e, com a introdução dos antibióticos, este problema tendeu a desaparecer. No entanto, o uso de antibióticos foi acompanhado pelo surgimento de estirpes bacterianas capazes de desenvolver mecanismos de resistência. Estes mecanismos levaram a uma regressão dos avanços alcançados no tratamento de infecções (Van Hoek et al. 2011).

Logo, a resistência a antibióticos é uma importante preocupação de saúde pública. A incidência de resistência a antibióticos entre bactérias patogênicas e oportunistas de diferentes fontes não representa só um problema nosocomial, mas também envolve uma variedade de ambientes (Messi et al. 2015).

##### **4.1. Resistência natural e adquirida**

A resistência bacteriana pode ser natural ou adquirida. A resistência natural observa-se na grande maioria dos membros de uma mesma espécie ou gênero, independentemente do seu local de isolamento, sendo uma característica que ocorre naturalmente, por exemplo *Escherichia coli* possui resistência inata a vancomicina, dado que o tamanho desta molécula dificulta a sua transposição através da membrana de células de Gram-negativo (Hawkey, 1998).

A resistência adquirida ocorre numa proporção variável de isolados de uma espécie ou gênero, sendo também variável ao longo do tempo, e resulta da aquisição de genes exógenos, da mutação de genes ou da combinação desses mecanismos (Giedraitienė et al. 2011).

A transferência de genes entre células bacterianas de diferentes grupos filogenéticos é denominada transferência horizontal. Os principais mecanismos de transferência horizontal envolvem elementos genéticos móveis como plasmídeos, fagos transdutores e elementos transponíveis como transposões e sequências de inserção (Giedraitienė et al. 2011).

#### 4.2. Mecanismos de resistência a antibióticos

As bactérias apresentam resistência aos antimicrobianos através de uma diversidade de mecanismos (Van Hoek et al. 2011; Wright, 2005; Baker-Austin et al. 2006):

- Alterações de permeabilidade na parede celular bacteriana que limita o acesso do antimicrobiano aos locais alvo,
- Efluxo ativo do antibiótico da célula bacteriana para o exterior,
- Modificação ou degradação enzimática do antibiótico,
- Aquisição de vias metabólicas alternativas às inibidas pelo antibiótico,
- Modificação dos alvos dos antibióticos,
- Sobreprodução da enzima alvo.

Na tabela 3 podemos observar os diferentes antibióticos mais usados e os mecanismos de resistência a estes antibióticos.

**Tabela 3.** Mecanismos de resistência a antibióticos comumente usados (Davies e Davies, 2010).

Classe de antibiótico	Mecanismos de resistência
<b>β-lactâmicos</b>	Hidrólise enzimática, efluxo, alteração do alvo
<b>Aminoglicosídeos</b>	Fosforilação, acetilação, efluxo, alteração do alvo
<b>Glicopéptidos</b>	Reprogramação da biossíntese de peptidoglicanos
<b>Tetraciclínas</b>	Monoxigenação, efluxo, alteração do alvo
<b>Macrólidos</b>	Hidrólise, glicosilação, fosforilação, efluxo, alteração do alvo
<b>Lincosamidas</b>	Efluxo, alteração do alvo
<b>Oxazolidinonas</b>	Efluxo, alteração do alvo
<b>Quinolonas</b>	Acetilação, efluxo, alteração do alvo
<b>Pirimidinas</b>	Efluxo, alteração do alvo
<b>Sulfonamidas</b>	Efluxo, alteração do alvo
<b>Rifamicinas</b>	Modificação de RNAm-polimerase
<b>Lipopeptídeos</b>	Alteração do alvo

### **4.3. Resistência a antibióticos no ambiente**

O ar representa um reservatório importante e um veículo de uma grande variedade de bactérias multirresistentes e dos genes que codificam para essa resistência (Singer et al. 2016).

Os genes de resistência podem ser adquiridos por bactérias patogênicas através de mecanismos descritos nos pontos anteriores. Estes genes têm sido frequentemente originados no ambiente e podem ser recuperados no ar exterior a muitos quilômetros da fonte, o que sugere que os genes de resistência aos antibióticos podem ser transportados através de aerossóis em escalas locais (Messi et al. 2015).

Alguns estudos têm mostrado que a distribuição de estrume, por espalhamento de terra, pode facilitar a disseminação de resistência antimicrobiana (Wang et al. 2015; Aust et al. 2008). Ambientes contaminados por metais tóxicos também facilitam a dispersão de resistência antimicrobiana (Austin et al. 2006; Henriques et al. 2016). A ocorrência de metais pode, de modo indireto, selecionar bactérias resistentes a antibióticos (Austin et al. 2006). Este fenômeno pode ocorrer devido ao facto de um mesmo mecanismo conferir resistência a metais e a antibióticos (Austin et al. 2006). Por outro lado esta seleção pode também ser devida à ocorrência de genes de resistência a metais e antibióticos no mesmo elemento genético móvel, por exemplo, o transposão Tn21 confere co-resistência ao mercúrio, aminoglicosídeos e sulfonamidas (Stepanauskas et al. 2005).

#### **4.3.1. Resistência a antibióticos no ambiente interior**

A resistência aos antibióticos também é prevalente no ambiente interior das habitações, onde os seres humanos passam a maior parte do seu tempo (Hartmann et al. 2016). Os micróbios no ambiente interior foram identificados como uma fonte importante de infecções provocadas por bactérias resistentes a antibióticos. Por exemplo, isolados cultiváveis de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos estão mais concentrados no ar interior do que no ar exterior (Carey e McNamara, 2015), e os fatores não humanos (isto é, elementos na casa, excluindo os seus residentes) no ambiente doméstico podem contribuir para a recorrência de infecções por bactérias resistentes aos antibióticos (Davis et al. 2012).

A disseminação de genes de resistência aos antibióticos é exacerbada pelo uso generalizado de produtos químicos antimicrobianos, que são predominantes em materiais de construção e produtos de limpeza e higiene pessoal. Ao contrário dos antibióticos, os

antimicrobianos deixam resíduos duradouros e podem acumular-se no ambiente (Hartmann et al. 2016).

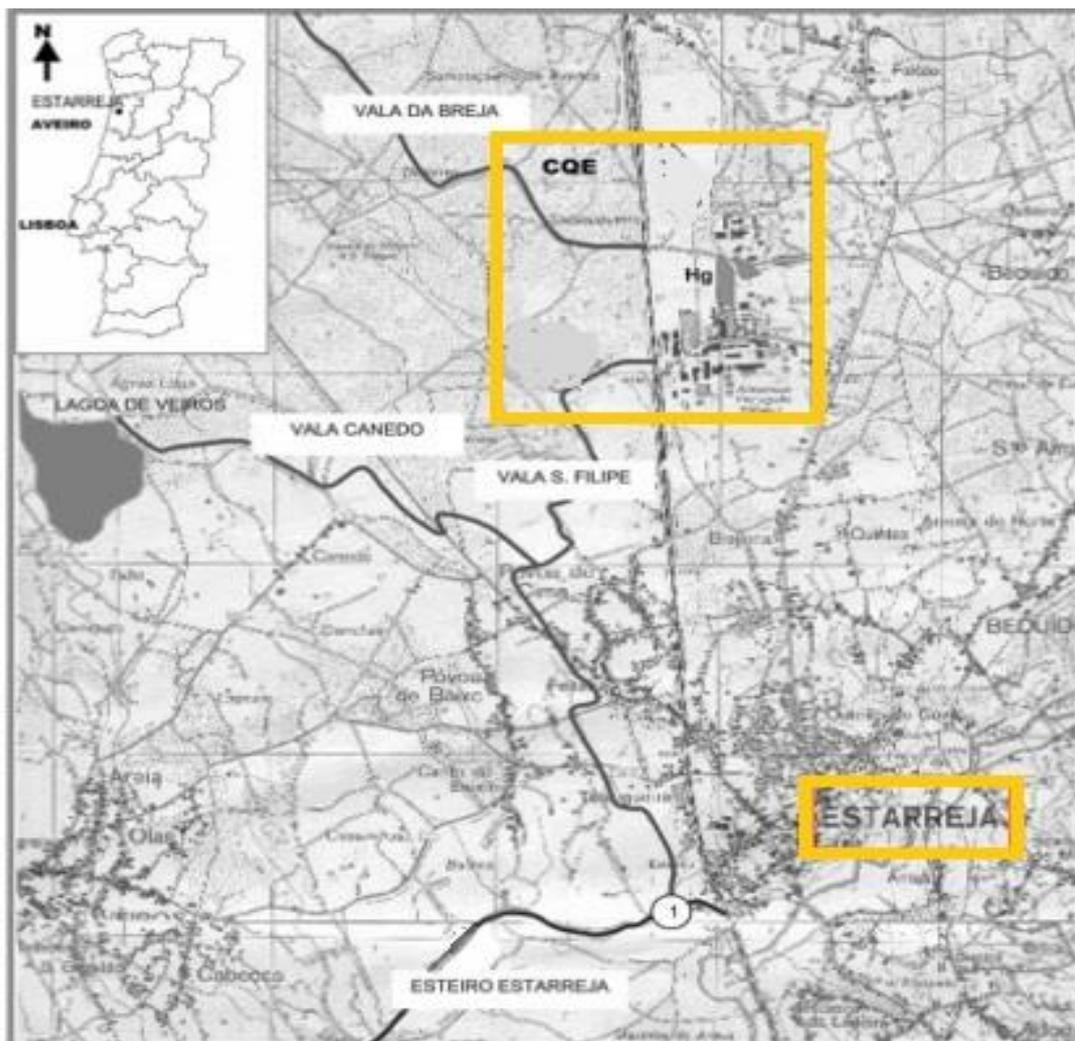
Triclosano é um antimicrobiano comumente utilizado para fins de higiene pessoal e desinfecção (Hartmann et al. 2016). As bactérias usam estratégias de resistência a este composto como alterações na membrana externa ou expressão de bombas não específicas de efluxo. Estas estratégias vão conferir resistência cruzada aos antibióticos, como foi observado em *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e *Rhodospirillum rubrum* (Carey e McNamara, 2015).

## **5. Descrição do problema**

Na região de Estarreja está estabelecido um dos maiores complexos industriais químicos do país. A intensa atividade industrial, juntamente com uma profunda ignorância das questões ambientais, transformou esta região numa das mais poluídas de Portugal (Costa e Jesus-Rydin, 2001).

O Complexo Químico de Estarreja (CQE) começou a funcionar na década de 30 do século XX com a produção de fertilizantes, ácidos minerais, cloro e soda, plásticos, aromáticos e outros produtos (Costa e Rydin, 2001; Lopes et al. 2014). Até 1975, os efluentes industriais contendo compostos orgânicos e metais (mercúrio, arsénio, zinco, chumbo, alumínio, cádmio, cobre, vanádio e ferro) foram descarregados em canais artificiais e depois conduzidos para o Canal de Estarreja (Figura 2) (Costa e Rydin, 2001). Esta prática produziu sedimentos superficiais altamente contaminados nas áreas superiores do Canal de Estarreja (Lopes et al. 2014). Após 1975, os efluentes passaram a ser conduzidos diretamente por condutas para o canal de Estarreja e as emissões de mercúrio foram reduzidas para níveis regulamentares tendo sido cessadas em 2002 (Lopes et al. 2014).

A região centro do país tem uma alta prevalência de doentes com DPOC (Direção Geral da Saúde, 2015). O concelho de Estarreja está incluído nesta análise. Apesar de não ter ainda sido estabelecida qualquer relação direta, a contaminação industrial que se verifica nesta região poderá contribuir para o elevado número de casos de DPOC ou pelo menos para a evolução negativa da doença. De facto, sabe-se que a exposição a contaminantes químicos tóxicos e composto orgânicos afetam a saúde respiratória (Douwes et al. 2003).



**Figura 2.** Localização do Complexo Químico de Estarreja (CQE) e o ponto de descargas dos efluentes provenientes do CQE, representado pelo nº 1 (adaptação de Costa e Rydin, 2001).

## *II. Objetivos*

A DPOC é uma das doenças mais mortíferas do mundo, estando classificada como a quarta causa de morte. Em Portugal o número de mortes por DPOC tem aumentado e tem-se tornado um desafio de saúde pública. Um dos grandes problemas dos doentes com DPOC são as exacerbações muitas vezes associadas a infeção bacteriana.

Em Estarreja os fatores de risco para o desenvolvimento da DPOC são grandes, na medida em que é uma das cidades mais poluídas de Portugal e os efluentes das indústrias químicas foram durante vários anos conduzidos sem tratamento para locais não adequados. Desta forma, os contaminantes químicos tóxicos e o material orgânico estão disseminados pela região, levando a grandes impactos na saúde dos seus habitantes. Esta contaminação pode também ocorrer no interior das casas onde as comunidades microbianas poderão ter sido selecionadas, pela presença de contaminantes, promovendo a persistência de bactérias resistentes a antibióticos e tolerantes a metais.

Este trabalho foi realizado no âmbito do projeto MicroRESPIRA, que tem como objetivos fornecer uma imagem global sobre a prevalência de doenças respiratórias crónicas em Estarreja e caracterizar, pela 1ª vez, o microbioma interno das habitações dos pacientes com DPOC em Estarreja. Este projeto envolve equipas da Universidade da Beira Interior, Universidade Aveiro, do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge e do Centro Hospitalar do Baixo Vouga. Este trabalho está também integrado no projeto Genial cujo objetivo principal é identificar fatores/marcadores que permitam antecipar a ocorrência de exacerbações.

O presente trabalho pretende caracterizar a comunidade bacteriana das habitações de doentes com DPOC, de forma a obter informação que no futuro possa ser relacionada com o desenvolvimento da doença, nomeadamente com a ocorrência de exacerbações. Para este trabalho foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

1. Avaliação da estrutura da comunidade bacteriana total presente em amostras de pó de cada habitação;
2. Determinação do número de bactérias cultiváveis presentes em amostras de pó e ar;
3. Determinação da prevalência de bactérias de Gram-negativo resistentes a antibióticos nestas amostras;
4. Caracterização de bactérias resistentes a antibióticos quanto à sua filogenia, fenótipos e genótipos de resistência a antibióticos;

5. Identificação de possíveis relações entre prevalência de bactérias resistentes a antibióticos e presença de metais;

6. Avaliação da coocorrência de fenótipos de resistência a antibióticos e tolerância a metais.

### ***III. Material e métodos***

#### **1. Recrutamento de pacientes**

Procedeu-se ao recrutamento de pacientes com DPOC (previamente diagnosticados) no hospital Visconde de Salreu em Estarreja, de 1 de outubro de 2016 a 31 de janeiro de 2017, conseguindo-se um total de 21 voluntários.

O hospital Visconde de Salreu é uma das Unidades Hospitalares mais importantes do concelho de Estarreja. A infraestrutura serve uma população com mais de trinta mil habitantes.

Atualmente a Unidade Hospitalar tem serviço de urgência, sala de operações, internamento e diversas consultas de especialidade nomeadamente: anestesiologia, cirurgia geral, ginecologia, medicina do trabalho, medicina física e de reabilitação, oftalmologia, ortopedia, patologia clínica, pneumologia, entre outras.

Os pacientes com DPOC do concelho de Estarreja vão rotineiramente ao hospital Visconde de Salreu para terem consultas de especialidade com a pneumologista Carla Valente, médica colaboradora no projeto. Na consulta os pacientes foram informados acerca do estudo pela própria Pneumologista.

Todos os voluntários receberam informação sobre o estudo e assinaram um consentimento informado e esclarecido, autorizando a recolha e uso de amostras biológicas e ambientais de acordo com a Norma nº 015/2013 de 03/10/2013 atualizada a 04/11/2015. Este estudo foi aprovado pelo Comité de Ética da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior (CE-FCS-2016-008) e pelo Comité de Ética do Centro Hospitalar do Baixo Vouga (ref. 1208070066) e autorizado pela Comissão Nacional de Proteção de Dados (Proc. No. 8678/2016).

No dia do recrutamento foi explicado o projeto e o procedimento a realizar pelos investigadores durante a visita à habitação, agendada para 60 dias após o recrutamento. Foi ainda fornecido ao paciente um saco de aspirador para ser trocado no próprio dia e ser usado durante 60 dias.

## 2. Recolha de amostras

Todas as amostras foram recolhidas na habitação do paciente após 60 dias do seu recrutamento. Recolheram-se amostras de ar e o saco de aspirador contendo o pó recolhido durante este período. Também foi realizado um questionário habitacional (Coelho et al. 2016), relativo ao número de habitantes, número de animais domésticos, localização da habitação, caracterização da construção, ventilação, aquecimento, caracterização das obras, limpezas, entre outros fatores (anexo 1).

### 2.1. Amostras de ar

As amostras de ar foram extraídas dentro da habitação do paciente, mais precisamente no seu quarto, divisão onde o paciente passa a maioria do seu tempo.

Utilizou-se um amostrador de ar (Merck Air Sampler MAS-100) (Figura 3) a uma velocidade de 100 litros por min (L/min) durante 2 min e 30 seg. A colheita foi feita para placas de petri de 90 cm, em triplicado, contendo *tryptic soy agar* (TSA; Merck), MacConkey-agar (Merck) e MacConkey-agar suplementado com 50 µg/mL de ampicilina (Panreac AppliChem). Todas as placas foram suplementadas com 200 µg/mL de ciclohexamida (Sigma) para evitar o crescimento de fungos.

Após a recolha, as placas foram incubadas a 28°C durante 48 h e procedeu-se à contagem das colónias às 48 h. As colónias resistentes a ampicilina foram purificadas em MacConkey-agar suplementado com ampicilina.

Dos isolados selecionados todos foram criopreservados em glicerol (15%) a -80°C.



**Figura 3.** Amostrador de ar (Merck Air Sampler MAS-100) durante uma recolha de ar.

### **3. Processamento das amostras de Pó**

#### **3.1. Triagem de Pó**

A triagem do pó foi realizada na Universidade da Beira Interior. Em laboratório, o saco de aspirador foi aberto e o pó removido. Primeiramente o espaço entre as camadas internas e externas do papel dos sacos de aspirador foi cuidadosamente examinado e todo o pó acumulado foi recuperado. Depois toda a amostra foi inspecionada e o pó foi coletado.

A amostra de pó foi então peneirada através de um crivo de 63  $\mu\text{M}$ . A fração 63  $\mu\text{M}$  é considerada a fração aderente às mãos e, portanto, é ingerida.

A análise do pó foi realizada dentro de 3-5 dias após a peneiração.

#### **3.2. Análise de bactérias cultiváveis nas amostras de pó**

Para isolar e quantificar bactérias do pó, preparou-se uma suspensão de 0.1 g de pó em 10 mL de NaCl 0.9% (m/v), durante 30 min a 180 r.p.m. e a 25°C.

De cada suspensão foram preparadas alíquotas de 0.5 mL, 0.1 mL e 0.1 mL de uma diluição de 100 vezes, que foram inoculadas em triplicado em placas de MacConkey-agar suplementado com 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ampicilina, MacConkey-agar sem antibiótico e TSA. Todas as placas continham 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ciclohexamida.

As placas foram incubadas a 28°C durante 48 h e procedeu-se à contagem das colónias às 48 h. As colónias resistentes a ampicilina foram purificadas.

Dos isolados selecionados todos foram criopreservados em glicerol (15%) a -80°C.

#### **3.3. Purificação de DNA total a partir de amostras de pó**

A extração de DNA das amostras de pó foi realizada utilizando o Kit MoBio PowerSoil (Mobio laboratories Inc), seguindo as recomendações do fabricante. Para avaliar a qualidade do DNA foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 0.8% (m/v) durante uma 1 h a 80 V. O gel foi visualizado no Sistema de imagem Gel DOC<sup>TM</sup> XR+ SYSTEM (Bio-Rad), após incubação numa solução de brometo de etídeo a 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 20 min.

O DNA foi armazenado a -20°C.

### 3.4. Amplificação da região V3 do gene 16S rRNA

A amplificação da região V3 do gene que codifica a sub-unidade 16S do rRNA foi realizada a partir do DNA total da comunidade presente no pó. Essa região foi amplificada utilizando os *primers* 338F-GC (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGGCCCGCC-GCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTA-3') e 518R (5'-ATTA-CCGCGGCTGCTGG-3') (Tacão et al. 2005).

Os reagentes utilizados na reação de PCR foram da marca NZYtech. Para cada reação de PCR o volume final foi de 25  $\mu$ L (Tabela 4).

**Tabela 4.** Composição da reação de PCR usada para amplificação do gene 16S rRNA.

<b>Mix NZYtech 2x Green Master (2.5mM MgCl<sub>2</sub>; 200 <math>\mu</math>M dNTPs; 0.2 U/<math>\mu</math>L DNA polimerase)</b>	6.25 $\mu$ L
<b><i>Primer</i> 338F-GC (10 <math>\mu</math>M)</b>	0.75 $\mu$ L
<b><i>Primer</i> 518 R (10 <math>\mu</math>M)</b>	0.75 $\mu$ L
<b>DNA genómico (50-100 ng)</b>	1 $\mu$ L
<b>Água ultra pura (<i>PCR Water</i>)</b>	16.25 $\mu$ L

As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C durante 9 min; 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 seg, ligação de *primers* a 55°C durante 30 seg e extensão a 72°C durante 90 seg; e uma extensão final a 72°C durante 30 min.

Para avaliar a integridade, o tamanho dos fragmentos e possíveis contaminações foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1.5% (m/v), durante 1 h a 90 V, em TAE 1X. Os géis foram visualizados no Sistema de imagem Gel DOC<sup>TM</sup> XR+ SYSTEM (Bio-Rad), após incubação numa solução de brometo de etídeo a 0.5  $\mu$ g/mL durante 20 min.

### 3.5. Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

Os produtos de PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida (Bio-Rad) a 8% (37,5:1 de acrilamida/bisacrilamida) com tampão TAE 1X. O gel de poliacrilamida foi preparado com um gradiente de desnaturação de 35% a 60% [100% de desnaturação corresponde a ureia (Sigma) numa concentração de 7 M e a formamida (Sigma) a 40%] (tabela 5). Para ocorrer a polimerização do gel foi adicionado 140 µL de persulfato de amónia (Bio-Rad) 10% (m/v) e 14 µL TEMED (NZYtech) com uma concentração final de 0.09% (m/v).

**Tabela 5.** Composição das soluções usadas para preparação do gel de DGGE

Reagentes	Solução 1 (35%)	Solução 2 (60%)
Ureia (98%)	2.35 g	4.03 g
TAE 50x	320 µL	320 µL
acrilamida/bisacrilamida (37.5:1)	3.2 mL	3.2 mL
Formamida	2.24 mL	3.84 mL
dh <sub>2</sub> O	Completar até 16 mL	Completar até 16 mL

Aplicaram-se no gel 20 µL de cada produto de PCR e 5 µL de tampão de carga 6x (Thermo Fisher). Foram também aplicados marcadores.

A eletroforese foi realizada a 60°C em tampão TAE 1X, inicialmente a 20 V durante 20 min e depois a 80 V durante 16 h. Após a eletroforese, o gel foi corado numa solução de brometo de etídeo (0.5 µg/mL), durante 5 min, e lavado em água destilada com agitação suave durante 20 min. O gel foi visualizado no Sistema de imagem Gel DOC<sup>TM</sup> XR+ SYSTEM (Bio-Rad).

Os perfis de DGGE foram analisados utilizando o *software* GelCompar II (Applied Maths) para avaliar a estrutura da comunidade bacteriana nas habitações dos pacientes. A similaridade entre perfis foi determinada usando o índice de Pearson. Os dendrogramas foram construídos tendo como base a matriz de similaridades, usando o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*) que utiliza as médias aritméticas (não ponderadas) nas medidas de dissimilaridade, evitando assim, caracterizar a diferença dos valores extremos (mínimo e máximo) entre acessos considerados. Foram realizadas 3 análises independentes.

#### 4. Caracterização dos isolados bacterianos

##### 4.1. Análise de diversidade genotípica através de BOX-PCR

A análise da diversidade de isolados bacterianos obtidos a partir do pó e do ar foi realizada através da técnica de tipagem BOX-PCR. Foram preparadas suspensões celulares em dH<sub>2</sub>O utilizando os isolados repicados e incubados a 28° C por 14 a 16 h.

O *primer* BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Alves et al. 2004) foi utilizado nas reações de PCR juntamente com reagentes da marca NZYtech. Para cada reação de PCR o volume utilizado foi de 25 µL (Tabela 6).

**Tabela 6.** Composição das reações de BOX-PCR.

<b>Mix NZYtech 2x Green Master (2.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 µM dNTPs; 0.2 U/µL DNA polimerase)</b>	6.25 µL
<b><i>Primer</i> BOXA1R (10µM)</b>	1.50 µL
<b>Suspensão celular (50-100ng)</b>	1 µL
<b>Água ultra pura (<i>PCR Water</i>)</b>	16.25 µL

As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C durante 7 min; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 1 min, ligação dos *primers* a 53°C durante 1 min e extensão a 65 °C durante 8 min; e uma extensão final a 65°C durante 16 min.

Foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1.5% (m/v) durante uma 1 h 20 min a 80 V em TAE 1X. Os géis foram visualizados no sistema de imagem Gel DOC<sup>TM</sup> XR+ SYSTEM (Bio-Rad), após incubação numa solução de brometo de etídeo a 0.5 µg/mL durante 20 min.

Os perfis obtidos foram analisados utilizando o *software* GelCompar II (Applied Maths) para avaliar a diversidade genotípica dos isolados. Foi construída uma matriz de similaridade usando o índice de Pearson. Os dendrogramas foram construídos usando o método UPGMA e foram realizadas 3 análises independentes.

#### 4.2. Amplificação do gene 16S rRNA e afiliação filogenética

Os isolados foram submetidos a uma amplificação por PCR do gene 16S rRNA.

Foram preparadas suspensões celulares como no ponto 4.1. desta secção. Utilizou-se o par de *primers* 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Fidalgo et al. 2016). Para cada reação de PCR o volume utilizado foi de 25µL (Tabela 7).

**Tabela 7.** Composição das reações de PCR para amplificação do gene 16S rRNA.

<b>Mix NZYtech 2x Green Master (2.5mM MgCl<sub>2</sub>; 200 µM dNTPs; 0.2U/µL DNA polimerase)</b>	6.25 µL
<b><i>Primer</i> 27F (10 µM)</b>	1 µL
<b><i>Primer</i> 1492R (10 µM)</b>	1 µL
<b>Suspensão celular (50-100 ng)</b>	1 µL
<b>Água ultra pura (<i>PCR Water</i>)</b>	15.7 µL

As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C durante 3 min; 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 min, ligação dos *primers* a 55°C durante 1 min e extensão a 72°C durante 2 min; e uma extensão final a 72°C durante 10 min.

Foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1.5% durante uma 1 h a 80V em TAE 1X. O gel foi visualizado no Sistema de imagem Gel DOC™ XR+ SYSTEM (Bio Rad), após incubação numa solução de brometo de etídeo a 0.5 µg/mL durante 20 min.

Os produtos de PCR foram parcialmente sequenciados com o *primer* 27F na empresa GATC Biotech (Alemanha) de acordo com as especificações da empresa.

As sequências de qualidade com uma média global de 800 pb foram examinadas e editadas com o *software* FinchTV V1.4.0 (Geospiza). A Ferramenta de Pesquisa de Alinhamento Local Básico (BLAST) foi utilizada para obter a classificação taxonómica até ao género.

## 5. Determinação da suscetibilidade a antibióticos

A análise da suscetibilidade foi realizada pelo método de difusão com discos em agar Mueller-Hinton (Oxoid). Foram testados 8 antibióticos de 6 classes diferentes (Tabela 8). Os diâmetros dos halos de inibição foram interpretados de acordo com as diretrizes do Comité Europeu de Análise de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (EUCAST) para *Pseudomonas* spp., após 18 h de incubação a 28°C. A estirpe *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controlo de qualidade.

**Tabela 8.** Antibióticos usados nos testes de suscetibilidade a antibióticos.

Classe	Antibiótico	Símbolo	Dose por disco
<b>β-lactâmicos</b>	Piperacilina	PRL	30 µg
	Piperacilina-tazobactam	TZP	30-6 µg
<b>Cefalosporinas</b>	Cefepima	FEP	30 µg
	Ceftazidima	CAZ	10 µg
<b>Carbapenemos</b>	Imipenemo	IPM	10 µg
<b>Fluoroquinolonas</b>	Ciprofloxacina	CIP	5 µg
<b>Monobactâmicos</b>	Aztreonam	ATM	30 µg
<b>Aminoglicosídeos</b>	Gentamicina	CN	10 µg

## 6. Avaliação da tolerância a metais

A concentração mínima inibitória de metais foi determinada em Luria-Bertani (LB, NZYtech) agar em triplicado, suplementado com arsénio (As; 50, 300 e 600 µg/mL As como Na<sub>2</sub>AsO<sub>4</sub>), crómio (Cr III; 50, 100 e 600 µg/mL Cr como CrCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O), cobre (Cu; 50, 100 e 300 µg/mL Cu como CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O), mercúrio (Hg; 25 e 50 µg/mL Hg como HgCl<sub>2</sub>), níquel (Ni; 50, 300 µg/mL Ni como NiSO<sub>4</sub>.6H<sub>2</sub>O) e zinco (Zn; 50 e 300, µg/mL Zn como ZnCl<sub>2</sub>).

Os resultados foram registados após 48 h de incubação a 28°C. Pelo facto de não existirem critérios interpretativos padrão para a classificação de isolados bacterianos como suscetíveis ou resistentes a metais, os critérios de interpretação dos resultados obtidos basearam-se em estudos anteriores (Rocha et al. 2016; Martins, 2017).

## 7. Detecção de integrões

A detecção da presença de integrões foi realizada por PCR. O estudo focou-se na pesquisa dos genes *intI1* e *intI2*, que codificam para integrases de classe 1 e 2 respetivamente (Moura et al. 2014).

Os *primers* utilizados estão indicados na tabela 9. As reações de PCR foram idênticas às previamente descritas na tabela 4 desta secção. As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C durante 5 min; 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 seg, temperatura de ligação de *primers* como indicada na tabela 9 durante 30 seg e extensão a 72°C durante 30 seg; e uma extensão final a 72°C durante 7 min.

**Tabela 9.** *Primers* usados para a amplificação de genes que codificam para integrases de classe 1 (*intI1*) e classe 2 (*intI2*).

Gene	Sequência do <i>primer</i> (5'-3')	T° <i>Annealing</i>	Referência
<i>intI1</i>	Int1_F:ACATGCGTGTAATCGTC Int2_R:CTGGATTTCGATGACGGCACG	55°C	(Moura et al. 2014)
<i>IntI2</i>	Int1_F: ACGGCTACCCTCTGTTAT Int2_R:TTATTGCTGGGATTAGGC	50°C	

## 8. Detecção de genes de resistência a antibióticos

A presença de genes de resistência foi determinada por PCR nos isolados que apresentavam fenótipos de resistência aos antibióticos testados. Foram analisados genes de resistência a  $\beta$ -lactâmicos.

Os *primers* e respetivo alvo estão descritos na tabela 10. As reações de PCR foram tal como descrito na tabela 4 desta secção. As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C durante 5 min; 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 seg, temperatura de ligação dos *primers*, indicada na tabela 10 para os diferentes genes, durante 1 min e extensão a 72°C durante 1 min; e uma extensão final a 72°C durante 7 min. No caso dos genes *bla<sub>SPM</sub>* e *bla<sub>GIM</sub>* as condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C durante 10 min; 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 seg, temperatura de ligação de *primers* a 52°C durante 50 seg e extensão a 72°C durante 50 seg; e uma extensão final a 72°C durante 5 min.

**Tabela 10.** *Primers* usados para a amplificação de genes de resistência a antibióticos.

Gene	Sequência do <i>primer</i> (5'-3')	T° Annealing	Referência
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	TEM_F: AAAGATGCTGAAGATCA TEM_R: TTTGGTATGGCTTCATTC	44°C	(Moura et al. 2014)
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	SHV_F: GCGAAAGCCAGCTGTCGGGC SHV_R: GATTGGCGGCGCTGTTATCGC	62°C	(Henriques et al. 2006)
<i>bla</i> <sub>OXA-A</sub>	OXA-A_F: ACACAATACATATCAACTTCGC OXA-A_R: AGTGTGTTTAGAATGGTGATC	53°C	
<i>bla</i> <sub>OXA-C</sub>	OXA-C_F: CGTGCTTTGTAAAAGTAGCAG OXA-C_R: CATGATTTTGGTGGGAATGG		
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	VIM_F: GATGGTGTTTGGTCGCATATCG VIM_R: GCCACGTTCCCCGCAGACG	58°C	
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	IMP_F: GAATAGAGTGGATTAATTCTC IMP_R: GTTTTAAYAAAACAACCACC	55°C	
<i>bla</i> <sub>SPM</sub>	SPM_F: AAAATCTGGGTACGCAAACG SPM_R: ACATTATCCGCTGGAACAGG	52°C	(Poirel et al. 2011)
<i>bla</i> <sub>GIM</sub>	GIM_F: TCGACACACCTTGGTCTGAA GIM_R: AACTTCCAACCTTTGCCATGC		

## *IV. Resultados e discussão*

### **1. Caracterização da Habitação**

Neste estudo foram incluídos 21 pacientes diagnosticados com DPOC. Estes pacientes habitam todos no concelho de Estarreja.

Em todas as habitações foi realizado um questionário habitacional. A partir desses questionários, foram selecionadas algumas características potencialmente relevantes para a disseminação e proliferação bacteriana no ambiente interior, apresentadas na tabela 11.

A maioria dos pacientes (71.4%) vivia com mais uma pessoa e pelo menos um animal doméstico no interior da habitação. Verificou-se que 42% dos pacientes possuíam animais domésticos nas imediações da habitação. A maioria das habitações localizava-se em zonas rurais (57%) e são na generalidade isoladas (76%). A maior parte apresentava um nível de humidade entre baixo (52%) a moderado (33%) e nenhum bolor visível (71.42%). O nível de humidade foi estimado com base na observação de manchas nas paredes ou soalho escurecido, e cheiro.

**Tabela 11.** Características das habitações dos pacientes, relativamente ao número de habitantes, número de animais domésticos (interior e exterior da habitação) e condições habitacionais (localização da habitação, tipo de habitação, nível de humidade e bolor visível).

Código da amostra	Número de habitantes	Animais domésticos		Condições habitacionais			
		Interior	Exterior	Localização	Tipo	Nível Humidade	Bolor visível
1	2	3 (pássaros)	6 (galinhas)	Zona rural	Moradia	Alto	Alto
2	2	2 (cão, gato)	5 (galinhas, ovelhas)	Zona rural	Moradia	Moderado	ND
3	3	1 (cão)	41 (galinhas, porco)	Zona rural	Moradia	Baixo	ND
4	2	1 (cão)	-	Zona urbana	Moradia	Moderado	Baixo
5	4	1 (cão)	-	Zona urbana	Apartamento	Baixo	ND
6	6	1 (cão)	24 (galinhas, porcos e cabras)	Zona rural	Moradia	Moderado	ND
7	2	-	-	Zona rural	Apartamento	Baixo	ND
8	2	1 (cão)	-	Zona rural	Moradia	Baixo	ND
9	3	1 (gato)	4 (pássaros)	Zona rural	Moradia	Baixo	ND
10	2	1 (cão)	11 (cães, gatos, galinhas, pássaro e porcos)	Zona urbana (centro cidade)	Moradia	Baixo	Baixo
11	2	-	-	Zona urbana (centro cidade)	Apartamento	Moderado	Baixo
12	1	-	-	Zona rural	Moradia	Baixo	ND
13	2	1 (coelho)	-	Zona urbana (centro da cidade)	Apartamento	ND	ND
14	2	1 (cão)	-	Zona urbana (centro da cidade)	Moradia	Baixo	ND
15	2	1 (cão)	32 (gato, pássaros, porcos, cabras)	Zona urbana	Moradia	Baixo	ND
16	2	1 (cão)	-	Zona urbana (centro da cidade)	Moradia	Baixo	ND
17	3	-	2 (cães)	Zona urbana (centro da cidade)	Moradia	Moderado	Baixo
18	5	-	163 (cães, galinhas, pombas)	Zona rural	Moradia	Moderado	Baixo
19	2	1 (cão)	-	Zona rural	Moradia	Baixo	ND
20	2	1 (cão)	-	Zona rural	Moradia	Moderado	ND
21	2	-	-	Zona urbana (centro da cidade)	Apartamento	Nada	ND

ND: Não detetável

**Nota:** Nenhuma das casas possuía sistema de ventilação

## 2. Análise das amostras de ar e pó

Neste estudo foram analisadas 21 amostras de ar interior, do quarto do paciente, e 16 amostras de pó da habitação. Os pacientes 5, 6, 18, 19 e 20 não forneceram amostra suficiente de pó, o que impossibilitou a análise desta amostra.

Todas as amostras de ar foram filtradas em igual volume para placas com TSA, MacConkey-agar e MacConkey-agar suplementado com antibiótico (ampicilina). Alíquotas de amostras de pó foram semeadas em placas de TSA e de MacConkey-agar com e sem antibiótico, como descrito no ponto 3.2 na secção Material e métodos.

O meio de cultura TSA é um meio não seletivo, enquanto o meio de cultura MacConkey-agar é um meio usado para o cultivo de bactérias Gram-negativas. Vários estudos têm demonstrado que as bactérias Gram-negativas estão muitas vezes associadas a exacerbações em doentes com DPOC (Sethi e Murphy, 2008; Ramadan et al. 2016). Todas as amostras foram também inoculadas em MacConkey-agar suplementado com ampicilina de forma a obtermos um meio seletivo para bactérias Gram-negativas resistentes a ampicilina. Selecionou-se este antibiótico por ser representativo da classe dos  $\beta$ -lactâmicos, uma vez que é a classe de antibióticos mais prescrita no nosso país (Direção Geral da Saúde, 2015).

A contagem de bactérias cultiváveis foi expressa em unidades formadoras de colónias (UFC) por metro cúbico para as amostras de ar e UFC por grama nas amostras de pó.

Nas amostras de ar o número de bactérias cultiváveis em TSA variou de acordo com a habitação (Tabela 12), variando de 8 a 800 UFCs/m<sup>3</sup>. No entanto, a ordem de grandeza foi a mesma para a maioria das amostras, exceto nas amostras 9 e 21 em que o valor foi inferior (8 e 46 UFCs/m<sup>3</sup>) e na amostra 14 para a qual se obteve um valor de UFCs incontável nos volumes analisados. Em MacConkey-agar, em geral e como esperado, observou-se uma redução no número de bactérias cultiváveis comparativamente ao número em meio TSA, variando de 1 a 169 UFC/m<sup>3</sup>, exceto para as habitações 16, 17, 19, 20 e 21 (0 UFC/m<sup>3</sup>) e para a habitação 14 (valor incontável).

**Tabela 12.** Abundância de bactérias cultiváveis em amostras de ar e pó e percentagem (%) de bactérias resistentes a ampicilina.

Código da amostra	Amostras de ar				Amostras de pó			
	Bactérias cultiváveis em TSA (UFCs/m <sup>3</sup> )	Bactérias cultiváveis em MacConkey-agar (UFCs/m <sup>3</sup> )	Bactérias cultiváveis em MacConkey-agar + AMP (UFCs/m <sup>3</sup> )	% Bactérias resistentes a AMP	Bactérias cultiváveis em TSA (UFCs/gr)	Bactérias cultiváveis em MacConkey-agar (UFCs/gr)	Bactérias cultiváveis em MacConkey-agar + AMP (UFCs/gr)	% Bactérias resistentes a AMP
<b>1</b>	(1.16 ± 0.54)×10 <sup>2</sup>	(0.08 ± 0.03)×10 <sup>2</sup>	(0.03 ± 0.02)×10 <sup>2</sup>	38%	(4.27 ± 2.49)×10 <sup>2</sup>	(5.33 ± 9.43)×10 <sup>2</sup>	0	*
<b>2</b>	(4.96 ± 0.27)×10 <sup>2</sup>	(0.05 ± 0.05)×10 <sup>2</sup>	0	*	Incontável	(7.50 ± 1.84)×10 <sup>2</sup>	(4.67 ± 3.39)×10 <sup>2</sup>	62%
<b>3</b>	(1.19 ± 0.62)×10 <sup>2</sup>	(1.69 ± 1.37)×10 <sup>2</sup>	(2.48 ± 1.17)×10 <sup>2</sup>	*	Incontável	Incontável	(3.59 ± 729)×10 <sup>2</sup>	*
<b>4</b>	(3.80 ± 0.26)×10 <sup>2</sup>	(0.16 ± 0.03)×10 <sup>2</sup>	(0.09 ± 0.05)×10 <sup>2</sup>	56%	(8.93 ± 7.72)×10 <sup>2</sup>	(8.53 ± 2.27)×10 <sup>2</sup>	(6.67 ± 2.49)×10 <sup>2</sup>	78%
<b>5</b>	(8.00 ± 3.19)×10 <sup>2</sup>	(0.58 ± 0.34)×10 <sup>2</sup>	(0.07 ± 0.05)×10 <sup>2</sup>	12%	-	-	-	-
<b>6</b>	(5.46 ± 0.44)×10 <sup>2</sup>	(0.01 ± 0.02)×10 <sup>2</sup>	0	*	-	-	-	-
<b>7</b>	(3.52 ± 0.40)×10 <sup>2</sup>	(0.08 ± 0.03)×10 <sup>2</sup>	0	*	(7.87 ± 3.70)×10 <sup>2</sup>	(9.73 ± 1.74)×10 <sup>2</sup>	(4.67 ± 3.40)×10 <sup>2</sup>	47%
<b>8</b>	(4.02 ± 0.10)×10 <sup>2</sup>	(0.01 ± 0.01)×10 <sup>2</sup>	0	*	Incontável	Incontável	(1.66 ± 8.99)×10 <sup>2</sup>	*
<b>9</b>	(0.08 ± 1.03)×10 <sup>2</sup>	(0.04 ± 0.03)×10 <sup>2</sup>	0	*	Incontável	Incontável	(1.24 ± 0.59)×10 <sup>2</sup>	*
<b>10</b>	(1.15 ± 2.16)×10 <sup>2</sup>	(0.02 ± 0.03)×10 <sup>2</sup>	0	*	Incontável	Incontável	Incontável	*
<b>11</b>	(2.18 ± 0.49)×10 <sup>2</sup>	(0.04 ± 0.03)×10 <sup>2</sup>	0	*	Incontável	(1.18 ± 3.58)×10 <sup>2</sup>	Incontável	*
<b>12</b>	(2.77 ± 0.39)×10 <sup>2</sup>	(0.01 ± 0.02)×10 <sup>2</sup>	0	*	Incontável	Incontável	(0.09 ± 1.98)×10 <sup>2</sup>	*
<b>13</b>	(3.17 ± 0.68)×10 <sup>2</sup>	(0.04 ± 0.06)×10 <sup>2</sup>	0	*	(1.80 ± 1.16)×10 <sup>2</sup>	Incontável	(1.07 ± 4.14)×10 <sup>2</sup>	*
<b>14</b>	Incontável	Incontável	Incontável	*	Incontável	Incontável	Incontável	*
<b>15</b>	(3.93 ± 0.67)×10 <sup>2</sup>	(0.01 ± 0.02)×10 <sup>2</sup>	0	*	(9.37 ± 3.20)×10 <sup>2</sup>	(0.60 ± 2.35)×10 <sup>2</sup>	(3.93 ± 1.97)×10 <sup>2</sup>	66%
<b>16</b>	(2.33 ± 0.11)×10 <sup>2</sup>	0	0	*	Incontável	Incontável	(2.55 ± 7.90)×10 <sup>2</sup>	*
<b>17</b>	(4.16 ± 1.45)×10 <sup>2</sup>	0	0	*	Incontável	Incontável	(1.40 ± 0.63)×10 <sup>2</sup>	*
<b>18</b>	(2.77 ± 0.68)×10 <sup>2</sup>	(0.01 ± 0.02)×10 <sup>2</sup>	(0.01 ± 0.03)×10 <sup>2</sup>	*	-	-	-	-
<b>19</b>	(4.41 ± 0.20)×10 <sup>2</sup>	0	0	*	-	-	-	-
<b>20</b>	(3.53 ± 0.16)×10 <sup>2</sup>	0	0	*	-	-	-	-
<b>21</b>	(0.46 ± 0.07)×10 <sup>2</sup>	0	0	*	(5.90 ± 1.30)×10 <sup>2</sup>	0	0	*

\* Impossibilidade de calcular %

- Falta de amostra

AMP: Ampicilina

Para as amostras de pó verificou-se que o número de bactérias cultiváveis em TSA é em alguns casos ligeiramente superior ou igual ao observado em MacConkey-agar (tabela 12). Em TSA, nas amostras para as quais foi possível determinar a abundância, o número variou de 180 a 937 UFC/g. Em MacConkey-agar a abundância variou de 60 a 973 UFC/g. Na amostra 21 não se verificou crescimento nas placas de MacConkey inoculadas com amostras de pó. Em ambos os meios, para várias amostras de pó o valor foi incontável nos volumes analisados.

Nas amostras de ar foi possível determinar o número de UFCs em MacConkey agar suplementado com ampicilina para 5 habitações e este variou de 1 a 248 UFCs/m<sup>3</sup>. Para a habitação 14 este valor foi incontável, tendo sido de 0 para as restantes habitações. Em amostras de pó o número de UFCs em meio suplementado com ampicilina foi determinado para 11 habitações, tendo variado de 9 a 667 UFCs/g. Em duas habitações (1 e 21) não se registou crescimento neste meio de cultura, enquanto nas habitações 10, 11 e 14 este valor foi incontável.

Sempre que possível a percentagem de isolados de ar e pó resistentes à ampicilina foi calculada através da relação do número de UFC/m<sup>3</sup> ou UFC/g em MacConkey-agar com e sem antibiótico. Como indicado na tabela 12, não foi possível determinar a percentagem de bactérias resistentes a ampicilina na maioria das amostras de ar e pó. A contagem de UFCs resistentes a ampicilina foi possível apenas em amostras de ar obtidas em 3 habitações (1, 4 e 5), sendo que a percentagem de resistência variou de 12% a 56%. Nas amostras de pó a percentagem foi determinada para 4 habitações (2, 4, 7, 15) e variou de 47% a 78%.

Os resultados relativos à abundância de bactérias resistentes a ampicilina e à percentagem de resistência sugerem que o volume de ar filtrado para meio de cultura suplementado com antibiótico deverá ser, para a maioria das habitações, superior em estudos posteriores. De qualquer forma é de destacar que o número de UFCs/m<sup>3</sup> em meio de cultura com antibiótico assim como as percentagens de resistentes determinadas foram muitas vezes elevados o que mostra a pertinência desta avaliação. O mesmo se verificou nas amostras de pó, sendo que em estudos posteriores a quantidade de pó usada nas sementeiras deverá também ser otimizada, reduzindo especialmente a quantidade de pó usada para inocular MacConkey sem antibiótico.

O estudo aqui apresentado reporta valores de UFCs presentes em amostras de ar e de pó muitas vezes superiores aos previamente reportados para outros ambientes interiores (Cabo

Verde et al. 2015; Soleimani et al. 2016). Este resultado é surpreendente tendo em conta os ambientes anteriormente analisados. Por exemplo em ambientes hospitalares a quantidade esperada de UFCs presente no ar seria superior à de uma habitação unifamiliar devido ao número e atividade dos ocupantes, pacientes e visitantes do hospital e sistemas de ventilação (Cabo Verde et al. 2015). Por outro lado, verificou-se que os valores repostados no presente estudo estão acima dos limites definidos em legislação publicada no nosso país, referente à qualidade do ar interior (Portaria nº 3553-A, 2013).

As características das habitações avaliadas neste estudo (tabela 11), não foram suficientes para explicar a variabilidade observada em termos de abundância de bactérias cultiváveis (tabela 12). Segundo os autores Täubel et al. 2009, os ocupantes da habitação são a principal fonte de bactérias presentes no pó. Para obter os resultados que suportam esta conclusão, os autores coletaram e analisaram diversas amostras de pó (superfície da pele dos ocupantes, colchão e chão). Num próximo trabalho seria vantajoso estudar o pó e ar do interior e exterior da habitação, assim como estudar amostras de diferentes locais da habitação, de modo a tentar perceber quais as fontes que poderão estar a contribuir para a disseminação e proliferação bacteriana (Tischer et al. 2015; Soleimani et al. 2016; Hanson et al. 2016).

A metodologia dependente do cultivo permitiu determinar a prevalência de bactérias nas amostras de ar e de pó para algumas das habitações analisadas. Outros trabalhos também têm recorrido a esta técnica (Schulz et al. 2016; Tacão et al 2015; Garofalo et al. 2017). No entanto sabe-se que este tipo de metodologias permite aceder apenas a uma fração das bactérias presentes nas amostras dado que a grande maioria não são cultiváveis em laboratório (Stewart, 2012).

## 2.1. Isolados bacterianos

As bactérias que demonstraram crescimento em MacConkey-agar suplementado com ampicilina foram isoladas, obtendo-se uma coleção com 47 isolados. Estes isolados são provenientes de amostras de ar e pó.

Foram selecionados 14 isolados a partir das amostras de ar e 33 isolados das amostras de pó. A cada isolado foi atribuído uma nomenclatura baseada no número do paciente e na amostra de onde foi isolado, como indicado na tabela 13.

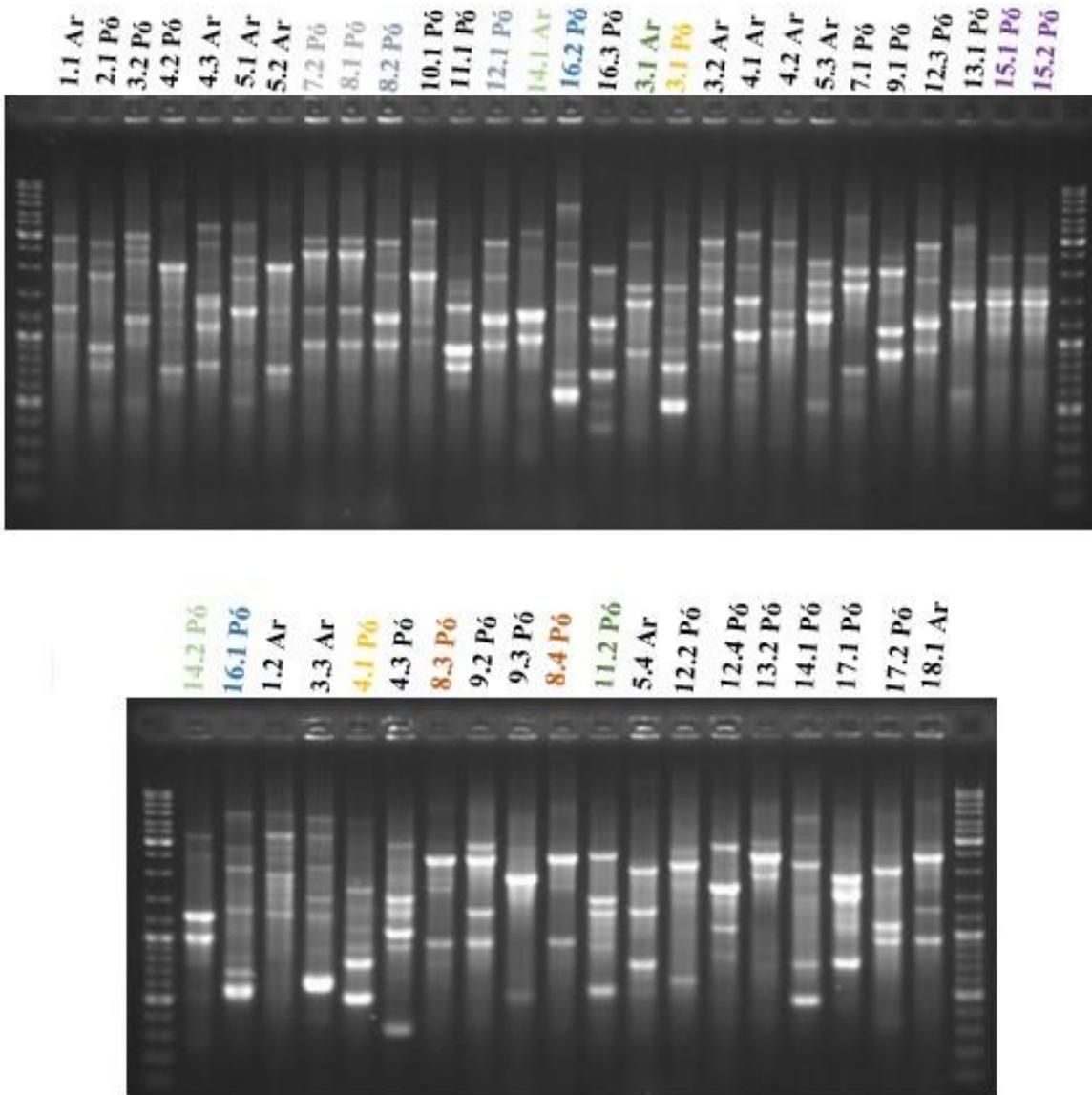
Através da análise da tabela 13 verifica-se que 70% dos isolados são provenientes de amostras de pó, e que o maior número de isolados foi obtido nas habitações 3, 4, 5, 8, 12.

**Tabela 13.** Número de isolados resistentes a ampicilina em amostras de ar e pó e sua respetiva nomenclatura.

Código da amostra	Número de isolados resistentes a AMP		Nomenclatura dos isolados	
	Ar	Pó	Ar	Pó
1	2	0	1.1 Ar; 1.2 Ar	-
2	0	1	-	2.1 Pó
3	3	2	3.1 Ar; 3.2 Ar; 3.3 Ar	3.1 Pó; 3.2 Pó
4	3	3	4.1 Ar; 4.2 Ar; 4.3 Ar	4.1 Pó; 4.2 Pó; 4.3 Pó
5	4	0	5.1 Ar; 5.2 Ar; 5.3 Ar; 5.4 Ar	-
6	0	0	-	-
7	0	2	-	7.1 Pó; 7.2 Pó
8	0	4	-	8.1 Pó; 8.2 Pó; 8.3 Pó; 8.4 Pó
9	0	3	-	9.1 Pó; 9.2 Pó; 9.3 Pó
10	0	1	-	10.1 Pó
11	0	2	-	11.1 Pó; 11.2 Pó
12	0	4	-	12.1 Pó; 12.2 Pó; 12.3 Pó; 12.4 Pó
13	0	2	-	13.1 Pó; 13.2 Pó
14	1	2	14.1 Ar	14.1 Pó; 14.2 Pó
15	0	2	-	15.1 Pó; 15.2 Pó
16	0	3	-	16.1 Pó; 16.2 Pó; 16.3 Pó
17	0	2	-	17.1 Pó; 17.2 Pó
18	1	0	18.1 Ar	-
19	0	0	-	-
20	0	0	-	-
21	0	0	-	-

### 3. Tipagem molecular e afiliação filogenética dos isolados

As relações clonais entre os 47 isolados foram avaliadas por BOX-PCR. Através desta técnica, verificou-se que havia variabilidade genética entre os isolados, uma vez que os perfis de bandas eram distintos entre isolados, exceto para os isolados assinalados com cor na figura 4A e 4B.



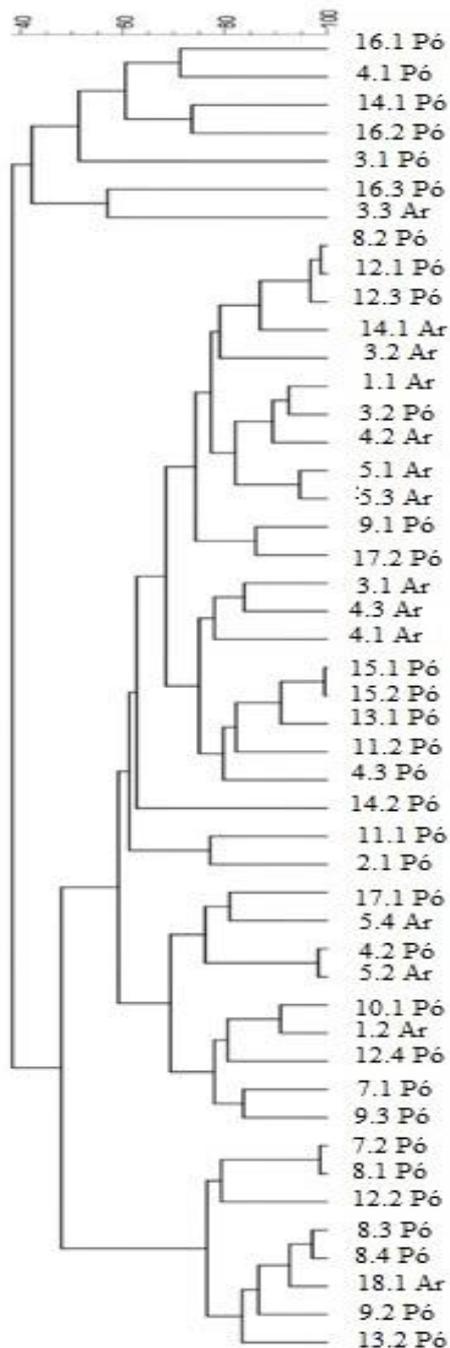
**Figura 4A e 4B.** Perfis BOX-PCR obtidos a partir de 47 isolados de amostras de ar e pó. Os isolados que apresentam cor preta têm perfis de bandas distintos. Relativamente às restantes cores, cores iguais indicam perfis de bandas semelhantes.

Através da análise do dendrograma da figura 5, resultante da análise dos perfis de tipagem apresentados nas figuras 4A e 4B, verificámos as relações de similaridade entre isolados, e observámos que os 47 isolados agrupam em 2 grupos com um índice de similaridade superior a 40%. Dentro do grupo com maior número de isolados (40 isolados) verificou-se um elevado índice de similaridade, destacando os isolados 15.1 pó e 15.2 pó que apresentaram um índice de similaridade de 100%. Ainda dentro deste grupo formaram-se 7 subgrupos em que o índice de similaridade é de 95%. Com base na análise deste dendrograma e dos géis apresentados na figura 4A e 4B verificou-se que, em vários casos, isolados genotipicamente idênticos foram encontrados em pó de habitações diferentes (ex: isolados 8.2-Pó e 12.1-Pó) e em amostras de ar e pó (ex: isolados 14.1-Ar e 14.2-Pó).

A afiliação filogenética dos isolados foi determinada com base na sequência do gene que codifica para a subunidade 16S do rRNA. As sequências com tamanho médio de 800 pb foram analisadas usando a ferramenta BLAST e obteve-se uma classificação taxonómica até ao género. Os isolados apresentaram uma identidade superior a 97% com as sequências presentes no banco de dados do NCBI (tabela 14).

Das 47 sequências analisadas, 44 afiliaram com o género *Pseudomonas* e as restantes com *Enterobacter* (n=1), *Erwinia* (n=1) e *Klebsiella* (n=1).

Pearson correlation [0.0%-100.0%]  
**box**



**Figura 5.** Dendrograma elaborado de acordo com a similaridade genotípica dos 47 isolados, inferida pela posição das bandas obtidas por BOX-PCR. A similaridade foi determinada pelo índice de Pearson e o dendrograma construído pelo método UPGMA.

**Tabela 14.** Lista de isolados, afiliação filogenética e percentagem de similaridade com a sequência mais próxima depositada no GenBank.

<b>Grupo filogenético</b>	<b>Isolado</b>	<b>Sequência mais próxima (número de acesso)</b>	<b>% Identidade da sequência</b>
<i>Pseudomonas</i>	1.1 Ar	<i>P. koreensis</i> (KX290158.1)	100%
	1.2 Ar	<i>P. putida</i> (KX279648.1)	100%
	2.1 Pó	<i>P. koreensis</i> (KT710802.1)	99%
	3.1 Pó	<i>P. reinekei</i> (KU350591.1)	99%
	3.2 Pó	<i>P. poae</i> (KJ529011.1)	99%
	3.1. Ar	<i>P. koreensis</i> (KJ567119.2)	100%
	3.2 Ar	<i>P. cedrina</i> (KY045836.1)	100%
	3.3 Ar	<i>P. fluorescens</i> (KX186944.1)	99%
	4.1 Ar	<i>P. putida</i> (AP013070.1)	97%
	4.2 Ar	<i>P. koreensis</i> (KT008003.1)	100%
	4.3 Ar	<i>P. putida</i> (KP682485.1)	99%
	4.1 Pó	<i>P. reinekei</i> (KU350591.1)	100%
	4.2 Pó	<i>P. japónica</i> (KT825519.1)	99%
	5.1Ar	<i>Pseudomonas</i> sp. (FJ979636.1)	99%
	5.2 Ar	<i>P. japónica</i> (KT825519.1)	99%
	5.3 Ar	<i>P. koreensis</i> (KU041145.1)	98%
	5.4 Ar	<i>Pseudomonas</i> sp. (KR189721.1)	99%
	7.1 Pó	<i>P. hunanensis</i> (JX545210.1)	99%
	7.2 Pó	<i>P. hunanensis</i> (JX545210.1)	99%
	8.1 Pó	<i>P. koreensis</i> (CP014947.1)	99%
	8.2 Pó	<i>P. baetica</i> (KP682486.1)	100%
	8.3 Pó	<i>Pseudomonas</i> sp. (KY681944.1)	99%
	8.4 Pó	<i>P. baetica</i> (KP682486.1)	100%
	9.1. Pó	<i>P. japónica</i> (KY568692.1)	99%
	9.2 Pó	<i>P. baetica</i> (KC139413.1)	99%
	9.3 Pó	<i>P. fluorescens</i> (KT982468.1)	99%
	10.1 Pó	<i>P. fluorescens</i> (KT982468.1)	100%
	11.1 Pó	<i>P. putida</i> (KC128883.1)	100%
	11.2 Pó	<i>P. putida</i> (KR054997.1)	99%
	12.1 Pó	<i>P. putida</i> (KU990893.1)	99%
	12.2 Pó	<i>P. lúrida</i> (NR_042199.1)	100%
	12.3 Pó	<i>Pseudomonas</i> sp. (KT779905.1)	99%
	13.1 Pó	<i>P. azotoformans</i> (KX762048.1)	100 %
13.2 Pó	<i>P. koreensis</i> (LN774294.1)	99%	
14.1 Ar	<i>P. fluorescens</i> (CP015639.1)	100%	
14.1 Pó	<i>P. rhodesiae</i> (LT629801.1)	99%	
14.2 Pó	<i>P. brassicacearum</i> (NR_116299.1)	99%	
15.1 Pó	<i>P. tolaasi</i> (JN869462.1)	99%	
15.2 Pó	<i>P. tolaaii</i> (NR_114481.1)	99%	
16.1 Pó	<i>Pseudomonas</i> sp. (AB740377.1)	100%	
16.2 Pó	<i>P. putida</i> (KM079616.1)	99%	
16.3 Pó	<i>P. fuscovaginae</i> (AB638424.1)	99%	
17.2 Pó	<i>P. koreensis</i> (KY524298.1)	99%	
18.1 Ar	<i>P. koreensis</i> (KY612283.1)	99%	
<i>Enterobacter</i>	17.1 Pó	<i>Enterobacter kobei</i> (NR_028993.1)	99%
<i>Erwinia</i>	4.3 Pó	<i>Erwinia rhapontici</i> (KU312051.1)	99%
<i>Klebsiella</i>	12.4 Pó	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (KU312771.1)	100%

Outros estudos também identificaram isolados de *Pseudomonas* no ambiente interno, principalmente no pó (Bouillard et al. 2005; Kim et al. 2012). Os autores Kim et al. (2012) estudaram a comunidade microbiana em pó de colchões e relataram que 90% das bactérias encontradas eram Gram-Negativas e estavam presentes os géneros *Enterobacter*, *Erwinia* e *Pseudomonas*. Outros autores estudaram o pó interior de sistemas de ar condicionado, móveis, pisos e cozinhas e relataram a presença de *Klebsiella pneumoniae* na maioria das amostras analisadas (Hamzam et al. 2017).

O facto de termos utilizado a ampicilina como agente seletivo obviamente condicionou a diversidade da coleção. A grande prevalência de bactérias do género *Pseudomonas* possivelmente poderá estar associada ao facto de as estirpes deste género serem intrinsecamente resistentes a ampicilina (Devarajan et al. 2017; Henriques et al. 2006; Rocha et al. 2016).

*Pseudomonas aeruginosa* é um dos agentes patogénicos nosocomiais mais importantes, e uma das principais causas de infeção em doentes com DPOC (Lagares et al. 2015). Para além da relevância clínica desta espécie, existem estudos que têm demonstrado que outras espécies de *Pseudomonas*, como por exemplo *Pseudomonas putida*, são reservatórios clínicos e ambientais de genes de resistência a antibióticos, genes estes que podem ser transferidos para *Pseudomonas aeruginosa* (Viedma et al. 2014; Gilarranz et al. 2013). Portanto entende-se que as bactérias incluídas neste género constituem um risco potencial para os doentes com DPOC.

Os membros do género *Enterobacter* têm sido associados a infeções respiratórias (Deal et al. 2009) e indicados como resistentes a cefalosporinas de 3<sup>a</sup> Geração (Direção-Geral da Saúde, 2013), representando por isso um risco para a saúde pública.

*Klebsiella pneumoniae*, tem sido associada a episódios de exacerbações em pacientes com DPOC (Lin et al. 2007), sendo a maioria das estirpes encontradas neste contexto resistentes a carbapenemos, antibióticos pertencentes à classe dos  $\beta$ -lactâmicos e de elevada relevância clínica (Dalmolin et al. 2017). De facto os carbapenemos são usados com frequência no meio hospitalar como antibióticos de último recurso, para o tratamento de infeções graves ou quando outras opções terapêuticas se mostram ineficazes (Zhanel et al. 2007).

As bactérias do género *Erwinia* têm sido associadas a plantas (Mills et al. 2006), não sendo patogénicas para humanos. De qualquer forma, tratando-se de isolados resistentes a antibióticos,

justifica-se o seu estudo dado que, caso possuam genes de resistência a antibióticos, estes poderão ser transmitidos por transferência horizontal de genes a bactérias patogénicas (Van Hoek et al. 2011).

#### **4. Suscetibilidade dos isolados bacterianos a antibióticos**

A suscetibilidade a antibióticos foi testada para os 47 isolados, que foram todos classificados como suscetíveis ou resistentes aos antibióticos, tal como descrito no ponto 5 na secção Material e métodos. Os resultados estão apresentados na tabela 15.

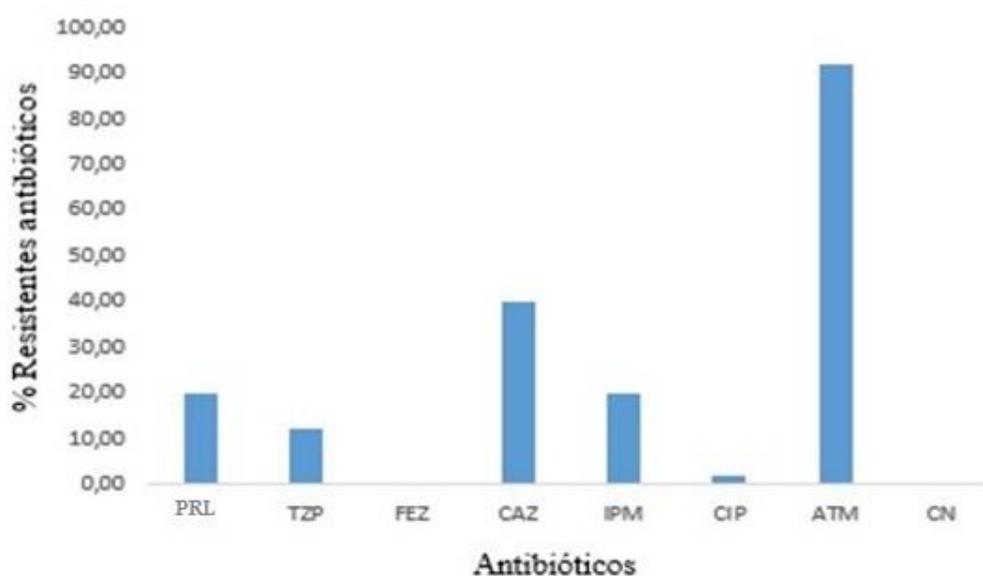
Segundo a tabela 15, todos os isolados foram resistentes a pelo menos um antibiótico.

Os isolados 17.1 Pó (*Enterobacter*) e 12.4 Pó (*Klebsiella*) apresentaram resistência ao antibiótico aztreonam e o isolado 4.3 Pó (*Erwinia*) apresentou resistência a piperacilina (tabela 15).



A frequência de resistência a antibióticos está apresentada na figura 6, para os 44 isolados pertencentes ao género *Pseudomonas*.

Considerando os dados da figura 6 relativamente aos isolados de *Pseudomonas*, o aztreonam é o antibiótico para o qual há maiores níveis de resistência (93.7%), seguido de ceftazidima (40.7%), piperacilina e imipenemo (20.3%), combinação de piperacilina com tazobactam (12.2%) e ciprofloxacina (2%). Todos os isolados foram sensíveis a cefepima e gentamicina.



**Figura 6.** Suscetibilidade antibiótica dos isolados de *Pseudomonas* analisados durante o estudo. (PRL-Piperacilina; TZP- Piperacilina e tazobactam; FEZ- Cefepima; CAZ-Ceftazidima; IPM- Imipenemo; CIP- Ciprofloxacina; ATM-Aztreonam; CN-Gentamicina).

A multirresistência (resistência para 3 ou mais classes de antibióticos) não esteve presente em nenhum isolado (tabela 15).

De referir que neste estudo foi testado um número relativamente reduzido de antibióticos, dado que a maioria dos restantes compostos não têm atividade contra *Pseudomonas* (Rocha et al., 2016), devido à prevalência neste género de mecanismos intrínsecos de resistência a antibióticos (Silva et al. 2014).

Relativamente a resistência aos antibióticos, *Pseudomonas aeruginosa* é a espécie mais estudada do género *Pseudomonas*, devido à sua importância clínica. Estudos têm relatado que a *Pseudomonas aeruginosa* apresenta resistência a uma vasta gama de antibióticos, sendo designada de bactéria multirresistente (Devarajan et al. 2017; Nicolau e Oliver, 2010; Gilarranz et al. 2013; Rocha et al. 2016). Estirpes desta espécie apresentam também altos níveis de resistência ao aztreonam (Silva et al. 2014; Oermann et al. 2011). Esta situação pode ser devida ao uso exacerbado deste antibiótico desde da década de 70, especialmente no tratamento de doentes com fibrose cística (Oermann et al. 2011).

*Pseudomonas* apresentam um elevado nível de resistência intrínseca aos antibióticos (Silva et al. 2014) e uma extraordinária capacidade de desenvolver resistência adicional por mutações cromossómicas (Nicolau e Oliver, 2010).

## 5. Detecção de genes resistência a antibióticos e integrons

A presença de genes de resistência a antibióticos foi testada para isolados que apresentaram resistência a piperacilina e a imipenemo, dado serem antibióticos de uso restrito e utilizados no tratamento de infeções graves (Infarmed, 2017).

Dos 47 isolados, só 9 apresentaram resistência à piperacilina, 8 pertencentes ao género *Pseudomonas* e 1 ao género *Erwinia*. Estes isolados foram testados quanto à presença de 4 famílias de genes: *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OXA-A</sub> e *bla*<sub>OXA-c</sub>. Estes genes foram selecionados por terem sido previamente detetados em estirpes de *Pseudomonas* (Elhariri et al.2017; Fonseca et al. 2005). O gene *bla*<sub>SHV</sub> foi detetado apenas no isolado 4.3-Pó pertencente ao género *Erwinia*. Os outros genes não foram detetados em nenhum isolado com os *primers* e as condições de PCR utilizadas.

Os 10 isolados que apresentaram resistência ao imipenemo pertenciam todos ao género *Pseudomonas*. A presença de 4 genes (*bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>SMP</sub> e *bla*<sub>GIM</sub>) que codificam para carbapenemases e que foram previamente detetados em *Pseudomonas* (Kateete et al. 2016; Castanheira et al. 2004) foi testada para estes isolados. Estes genes também não foram detetados em nenhum dos isolados com os *primers* e as condições de PCR utilizadas.

Todos os isolados foram testados quanto a presença de genes que codificam integrases de classe 1 e classe 2, e estes não foram identificados com os *primers* e as condições de PCR utilizadas.

Segundo a literatura, o gene *bla*<sub>SHV</sub> não tinha sido previamente detetado no género *Erwinia* (Handal et al. 2005). A contaminação de rios e de solos com bactérias que possuem o gene *bla*<sub>SHV</sub> bem como outros genes que codificam beta-lactamases está a aumentar devido à extensa utilização de  $\beta$ -lactâmicos no nosso país (Direção Geral da Saúde, 2015). Para esta disseminação poderão também contribuir as descargas de efluentes clínicos e domésticos que transportam bactérias resistentes a antibióticos e genes de resistência (Messi et al. 2015).

O facto de não se terem detetado genes de resistência na maioria dos isolados pode dever-se ao facto de nestes isolados os mecanismos de resistência serem mediados por bombas de efluxo, alterações na membrana ou outros mecanismos cujas bases genéticas não foram aqui avaliadas. Em *Pseudomonas* tem sido relatada a presença de diversas bombas de efluxo (Masuda

et al. 2000). Os autores Van Hoek et al. 2011 relataram que na presença de tetraciclina os géneros *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Enterobacter* e *Klebsiella* apresentavam o gene *tet(B)* que codifica para bombas de efluxo. A pesquisa de genes que codificam para bombas de efluxo seria uma alternativa para perceber os fenótipos de resistência aos antibióticos observados (Aghazadeh et al. 2014).

## 6. Quantificação de metais presentes no pó

A quantificação de metais foi realizada em laboratórios externos para mercúrio, crómio, níquel, cobre, zinco e arsénio (Tabela 16). A escolha destes metais tóxicos para análise foi influenciada pela abundância destes metais nos solos do concelho de Estarreja como reportado anteriormente (Lopes et al. 2014). A quantificação de mercúrio total nas amostras de pó foi realizada na Universidade da Beira Interior através da técnica de espectrometria de absorção atómica com decomposição térmica e amálgama de ouro, enquanto a quantificação dos restantes metais foi realizada no Departamento de Geociências da universidade de Aveiro por espectrometria de massa acoplada a plasma indutivo. A quantificação de metais não foi realizada para todas as habitações por falta de amostra.

**Tabela 16.** Concentração de metais ( $\mu\text{g}$  de metal/ $\text{g}$  de pó) presente nas amostras de pó.

Código da amostra	[Hg]	[Cr]	[Ni]	[Cu]	[Zn]	[As]	[Cd]	[Pb]
1	0.6	59.5	53.0	159.8	2010.5	7.2	1.2	265.2
3	0.7	54.3	29.1	121.0	881.9	6.0	1.9	229.4
4	1.7	74.8	62.6	242.3	1476.6	3.8	0.9	116.8
7	0	53.0	106.6	820.6	1228.9	3.3	0.3	44.2
9	0.4	34.8	58.0	123.2	667.8	7.8	0.7	201.4
10	0.7	46.3	33.8	123.3	817.4	20.2	0.8	136.2
12	9.0	65.4	64.9	207.8	964.8	6.1	0.7	73.9
13	1.0	56.0	58.5	1299.9	1620.5	2.4	1.2	218.6
14	0.3	107.3	95.9	276.1	1216.0	14.9	0.8	800.4
15	0.1	214.4	159.4	5683.9	4100.8	5.6	1.2	46.5
16	-	73.4	92.5	678.4	993.3	14.0	3.7	192.8
17	-	77.6	129.6	908.3	1419.4	3.2	0.8	264.8
19	0.2	1854.0	1384.3	543.8	1146.0	63.6	1.6	138.9
<b>Média das amostras</b>	<b>1.4</b>	<b>213.1</b>	<b>179.1</b>	<b>860.6</b>	<b>1426.5</b>	<b>12.2</b>	<b>1.2</b>	<b>241.8</b>
<i>Portaria N° 1450/2007</i>	<b>0.5</b>	<b>1</b>	<b>30</b>	<b>35</b>	<b>100</b>	<b>20</b>	<b>1</b>	<b>50</b>

- Falta de amostra

A concentração de metais presentes nas amostras de pó variou entre os diferentes metais. A concentração de zinco foi a mais alta, seguido do cobre, chumbo, crómio, níquel, arsénio, mercúrio e cádmio (tabela 16). Não existe uma recomendação para o nível máximo permitido de metais em pó. No entanto, é possível comparar os valores obtidos neste estudo com o valor máximo admissível para solos estabelecido pela Portaria N° 1450/2007. Como podemos verificar na tabela 16, a média da concentração dos metais estudados encontrava-se em concentração superior relativamente ao estabelecido pela Portaria N° 1450/2007, exceto para o arsénio. Alguns autores têm relatado a presença de metais tóxicos em pó doméstico, verificando que a concentração de metais tóxicos é elevada (Pastorinho et al. 2016; Wang et al. 2013; Yang et al. 2015).

A presença de elevados níveis de metais nas amostras de pó, possivelmente estará relacionada com a região de onde as amostras foram recolhidas. No concelho de Estarreja localiza-se uma grande indústria química e os seus efluentes foram durante muito anos expelidos para canais não adequados levando a contaminação dos solos com metais tóxicos (Costa e Rydin, 2001; Lopes et al. 2014). A presença de indústrias químicas, exploração de minerais e tráfego automóvel têm sido relatadas como sendo as principais fontes de contaminação do pó interior (Yang et al. 2015; Neisi et al. 2016).

Os níveis altos de metais tóxicos no pó doméstico aumenta a probabilidade de efeitos tóxicos na saúde, uma vez que o pó pode entrar no corpo humano através do contato dérmico, por inalação e ingestão (Pastorinho et al. 2016). A exposição a metais aumenta a probabilidade de desenvolver doenças respiratórias (edema pulmonar, tosse, pneumonite intersticial e insuficiência cardíaca), doenças neurológicas, cardíacas, renais entre outras (Kim et al. 2016; Bargagli et al. 2017; Sanchez et al. 2016).

## 7. Tolerância a metais

O teste de tolerância a metais foi realizado para todos os isolados. Foram testados 6 metais (Cu, Cr, Zn, Hg, As e Ni) a diferentes concentrações (tabela 15), como descrito no ponto 7 da secção Material e Métodos.

Os limiares de sensibilidade considerados foram 600 µg/mL para As, 20 µg/mL para Hg, 250 µg/mL para Cr e 300 µg/mL para Cu, Ni e Zn (Rocha et al. 2016). Segundo a tabela 15, todos os isolados foram suscetíveis à presença de Hg nas duas concentrações usadas. No entanto, as concentrações testadas para Hg foram acima do limite de sensibilidade devido a altas concentrações de Hg presentes na região de Estarreja (Inácio et al. 1998). A tolerância bacteriana aos restantes metais (Cu, Cr, Ni, As, Zn) foi alta. O arsénio foi o metal para o qual foi observado um maior nível de resistência (63.8% dos isolados) a uma concentração de 600 µg/ml. Em geral, a ordem de tolerância a metais entre isolados foi As > Zn > Cr > Ni > Cu > Hg.

A tolerância a metais apresentada na tabela 15 poderá estar relacionada com a zona de onde as amostras foram recolhidas, pois, como já foi descrito, a região de Estarreja está altamente contaminada por metais tóxicos (Costa e Rydin, 2001; Lopes et al. 2014). A exposição ao metal tóxico altera a composição das comunidades microbianas e seleciona para estirpes resistentes aos metais (Stepanauskas et al. 2005).

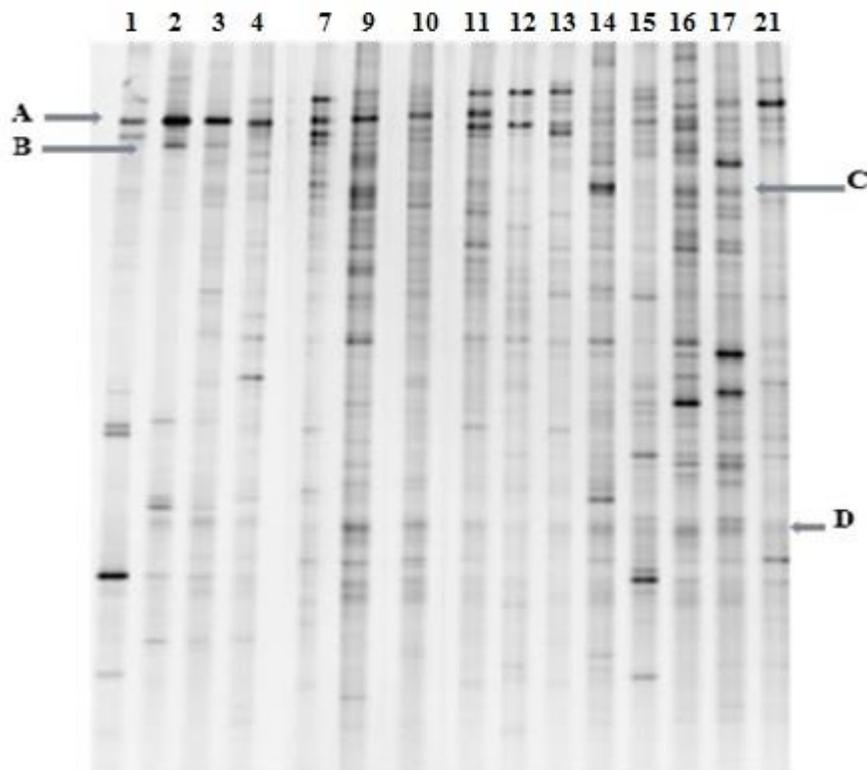
Os fenótipos de resistência a antibióticos apresentados pelos isolados poderão estar relacionados com a tolerância a metais, demonstrada na tabela 15. Esta pressão seletiva poderá também estar relacionada com a elevada prevalência de bactérias Gram-negativas determinadas neste estudo para algumas das habitações. A presença de concentrações altas de metais no meio ambiente tem sido correlacionada com abundância de genes de resistência aos antibióticos, devido ao efeito de co-seleção (Henriques et al. 2016), pois a presença de metais seleciona bactérias resistentes a antibióticos (Stepanauskas et al. 2005). Existem relatos que confirmam a presença de genes que conferem resistência a metais e genes de resistência a antibióticos no mesmo plasmídeo (Stepanauskas et al. 2005; McIntosh et al. 2008). Por outro lado o mesmo mecanismo de efluxo pode conferir resistência a metais e antibióticos (Austin et al. 2006).

## 8. Análise da comunidade microbiana por PCR-DGGE

A análise da comunidade microbiana das habitações dos pacientes foi feita pela técnica de PCR-DGGE com amplificação da região V3 do gene 16S rRNA a partir de DNA total das amostras de pó.

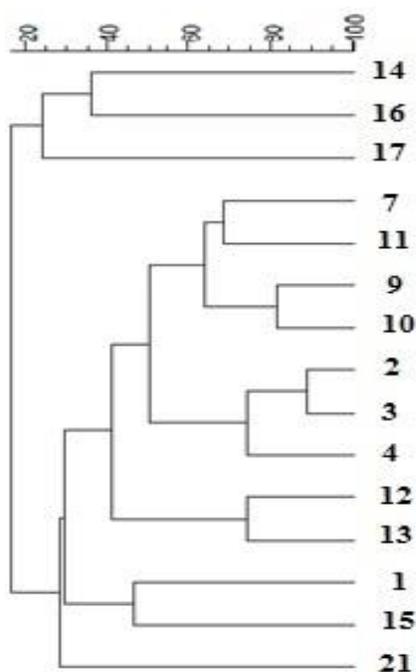
Num total de 21 habitações, foram obtidas amostras de pó de 15 casas. Os 15 perfis de bandas de DGGE correspondentes foram analisados de forma a perceber a similaridade da comunidade bacteriana entre casas de pacientes com DPOC (figura 8).

Este método revelou uma grande diversidade bacteriana em cada amostra (medida pelo número de bandas presentes em cada amostra), como podemos observar na figura 7. Outros estudos têm verificado que amostras de pó apresentam uma elevada diversidade bacteriana (Yamaguchi et al. 2016; Jeon et al. 2011).



**Figura 7.** Perfis de PCR-DGGE obtidos a partir das 15 amostras de pó. A, B, C e D são bandas que estão presentes na maioria das amostras.

Com base na análise apresentada na figura 8, observa-se que as amostras de pó agruparam em 2 grupos, sendo que em cada grupo as amostras partilham uma similaridade acima dos 25%. Os perfis apresentaram em geral baixa similaridade entre si, sugerindo a presença de comunidades bacterianas específicas para cada habitação. As exceções registadas foram, por exemplo, as casas 2 e 3, cujos perfis de DGGE apresentaram uma similaridade de 89% entre si, assim como as casas 9 e 10, com similaridade entre perfis de 82%.



**Figura 8.** Dendrograma das amostras de pó colhidas nas habitações dos pacientes, elaborado de acordo com as semelhanças estruturais inferidas pela posição das bandas referentes à região V3 do gene 16S rRNA, separadas por DGGE. A similaridade foi determinada pelo índice de Pearson e o dendrograma construído pelo método UPGMA.

A elevada especificidade das comunidades bacterianas do pó em cada casa poderá estar diretamente relacionada com as condições das habitações (Tabela 11). Outros autores têm mostrado que o número de ocupantes, a localização da habitação, o tipo de superfície da habitação e os níveis de humidade influenciam a abundância e diversidade bacteriana (Nevalainen e Seuri, 2005). O ambiente externo poderá também influenciar estas comunidades (Hanson et al. 2016; Täubel et al. 2009).

Neste estudo, os dados que temos relativamente às condições habitacionais não foram suficientes para explicar as diferenças entre os dois grupos apresentados no dendrograma ou os níveis de similaridades superiores a 70% dos subgrupos. Possivelmente a estrutura das comunidades será influenciada por fatores que não foram avaliados neste trabalho.

A técnica de PCR-DGGE mostrou ser uma boa ferramenta para a análise da comunidade bacteriana neste tipo de amostras, permitindo-nos perceber que as comunidades bacterianas das habitações dos pacientes com DPOC são diferentes entre si. Este tipo de análise tem vindo a ser utilizada noutros estudos, por exemplo para análise do microbioma pulmonar de doentes com DPOC (Huang et al. 2017), no estudo da diversidade bacteriana associada a alimentos (Garofalo et al. 2017), ou para análise de comunidades bacterianas no solo (Henriques et al. 2015), entre outros.

As maiores vantagens deste método para análise da comunidade bacteriana são a sua reprodutibilidade e o facto de permitir comparar várias amostras simultaneamente no mesmo gel (Duarte et al. 2012). Além disso é uma técnica de baixo custo relativamente a técnicas de sequenciação massiva paralela que poderiam ser uma alternativa (Nagai et al. 2016).

Este método apresenta limitações: é uma técnica demorada e laboriosa, destaca-se pela falta de genuidade dos produtos provenientes do PCR (erros de amplificação, formação de moléculas quiméricas e amplificação preferencial) (Duarte et al. 2012). Além disso, só pequenos fragmentos (até 500 pb) podem ser separados por DGGE, o que pode limitar a informação filogenética da sequência. As populações menos representadas na comunidade podem estar abaixo do limite de deteção (Duarte et al. 2012). Diferentes sequências de DNA podem ter motilidades semelhantes devido a conteúdo de GC idêntico e, portanto, uma banda pode não representar necessariamente um só filotipo; por outro lado, a presença de cópias diferentes do

gene 16S rRNA pode dar origem a padrões de bandas múltiplas para um único filotipo (Michaelsen et al. 2006).

De forma a perceber melhor a comunidade bacteriana das habitações poderíamos ter isolado os fragmentos de PCR a partir do gel de DGGE para serem usados em reações de sequenciação. Assim poderíamos determinar qual o grupo filogenético representado por cada banda no gel de DGGE (Garofalo et al. 2017). Esta análise seria especialmente relevante para identificar grupos bacterianos dominantes nas diferentes comunidades como os representados pelas bandas A, B, C e D indicadas na figura 7. Apesar das diferenças já referidas entre comunidades, a presença de filotipos comuns (tais como os indicados) e dominantes poderá ter implicações em termos de riscos.

Os pacientes com DPOC passam a maioria do seu tempo dentro da habitação. A caracterização da comunidade bacteriana presente no ambiente interior foi importante para avaliar se haveria algum fator determinante que conduzisse a disseminação e proliferação bacteriana. Estudos anteriores demonstraram que as características selecionadas (tabela 11) têm influência na disseminação e proliferação de bactérias (Hanson et al. 2016; Nevalainen e Seuri, 2005). Por exemplo, os animais domésticos dentro ou fora das habitações alteram a comunidade bacteriana e aumentam a sua disseminação e proliferação dentro da habitação (Soleimani et al. 2016).

## V. Considerações Finais

Este é o primeiro estudo a caracterizar a comunidade bacteriana de habitações de doentes com DPOC em Estarreja. Este e outros estudos similares poderão ser muito importantes para identificar possíveis associações entre as bactérias presentes no ambiente interior e a evolução (agravamento) da DPOC. Segundo os resultados apresentados podemos tecer as seguintes conclusões:

Nas amostras de ar e pó das habitações estudadas existe uma prevalência elevada de bactérias totais e de bactérias Gram-negativas. Esta prevalência variou de acordo com a habitação. Em várias habitações verificou-se uma elevada prevalência de bactérias Gram-negativas resistentes a ampicilina. Estes resultados demonstram a necessidade de uma caracterização detalhada de bactérias nestes ambientes.

Uma grande parte (93%) dos isolados resistentes a ampicilina foi afiliada ao género *Pseudomonas*. Dentro deste género, *Pseudomonas aeruginosa* normalmente está relacionada com o desenvolvimento de exacerbações em doentes com DPOC. Outras espécies pertencentes a este género poderão constituir um risco para a saúde por serem reservatórios clínicos e ambientais de genes de resistência a antibióticos. Grupos filogenéticos minoritários nas amostras analisadas (e.g. *Klebsiella*, *Enterobacter*) possuem também potencial patogénico. Estes resultados sugerem que as comunidades do interior das habitações representam potenciais riscos para a saúde de pacientes com DPOC.

Todos os isolados apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico, incluindo a antibióticos com enorme relevância clínica. Os genes estudados, geralmente adquiridos e que conferem resistência a estes antibióticos, não foram detetados, exceto em 1 isolado. Este resultado sugere a presença de mecanismos de resistência intrínsecos como a expressão de bombas de efluxo.

Uma concentração elevada de metais tóxicos foi detetada nas amostras de pó, possivelmente devido à atividade industrial que se verifica na região de Estarreja e a descargas inadequadas de efluentes resultantes desta atividade. A tolerância a metais tóxicos foi verificada em todos os isolados. Os fenótipos de tolerância a metais e resistência a antibióticos poderão ser coseleccionados e resultantes da pressão seletiva imposta pela presença de metais.

Os resultados obtidos por PCR-DGGE revelaram que a comunidade bacteriana presente nas amostras de pó das habitações dos pacientes com DPOC é específica de cada habitação. Os ocupantes das casas, bem como o número de animais domésticos, o nível de humidade, entre outras características estudadas não foram suficientes para explicar esta variabilidade.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a comunidade bacteriana das casas de pacientes com DPOC poderá constituir um risco para a saúde destes pacientes, pois estes passam cerca de 90% do seu tempo dentro das suas habitações.

Num trabalho futuro, seria interessante estudar genes que codificam bombas de efluxo, genes de resistência a metais bem como o potencial de virulência dos isolados obtidos neste trabalho.

## VI. Bibliografia

- Adar, Sara D., Gary B. Huffnagle, e Jeffrey L. Curtis. 2016. «The respiratory microbiome: an underappreciated player in the human response to inhaled pollutants?» *Annals of Epidemiology* 26 (5): 355–59.
- Adhikari, Atin, Eric M. Kettleson, Stephen Vesper, Sudhir Kumar, David L. Popham, Christopher Schaffer, Reshmi Indugula, et al. 2014. «Dustborne and airborne Gram-positive and Gram-negative bacteria in high versus low ERMI homes». *Science of The Total Environment* 482: 92–99.
- Aghazadeh, Mohammad, Zoya Hojabri, Reza Mahdian, Mohammad Reza Nahaei, Marveh Rahmati, Tina Hojabri, Tahereh Pirzadeh, e Omid Pajand. 2014. «Role of efflux pumps: MexAB-OprM and MexXY(-OprA), AmpC cephalosporinase and OprD porin in non-metallo- $\beta$ -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis and burn patients». *Infection, Genetics and Evolution* 24: 187–92.
- Albuquerque, Cassiano Felipe, Adriana Ribeiro Silva, Patrícia Burth, Patricia Rieken Macêdo Rocco, Mauro Velho Castro-Faria, e Hugo Caire Castro-Faria-Neto. 2016. «Possible mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa*-associated lung disease». *International Journal of Medical Microbiology* 306 (1): 20–28.
- Alves, A., I. Henriques, S. Fragoeiro, C. Santos, A. J. L. Phillips, e A. Correia. 2004. «Applicability of rep-PCR genomic fingerprinting to molecular discrimination of members of the genera *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella*». *Plant Pathology* 53 (5). Blackwell Science Ltd: 629–34.
- Araújo, António Manuel S. Duarte de. 2016. «DPOC: estamos a tratar os doentes conforme o estado da arte?» *Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar* 32 (3): 222–26.
- Ashmore, M.R., e C. Dimitroulopoulou. 2009. «Personal exposure of children to air pollution». *Atmospheric Environment* 43 (1): 128–41.
- Aust, Marc-Oliver, Frauke Godlinski, Greg R. Travis, Xiyang Hao, Tim A. McAllister, Peter Leinweber, e Sören Thiele-Bruhn. 2008. «Distribution of sulfamethazine, chlortetracycline and tylosin in manure and soil of Canadian feedlots after subtherapeutic use in cattle». *Environmental Pollution* 156 (3): 1243–51.

- Austin, Craig, Meredith S. Wright, Ramunas Stepanauskas, e J.V. McArthur. 2006. «Co-selection of antibiotic and metal resistance». *Trends in Microbiology* 14 (4): 176–82.
- Bächi, Brigitte. 2002. «Resistance mechanisms of Gram-positive bacteria». *International Journal of Medical Microbiology* 292 (1): 27–35.
- Bábara, C., F. Rodrigues, H. Dias, J. Cardoso, J. Almeida, M.J. Matos, P. Simão, et al. 2013. «Prevalência da doença pulmonar obstrutiva crónica em Lisboa, Portugal: estudo Burden of Obstructive Lung Disease». *Revista Portuguesa de Pneumologia* 19 (3): 96–105.
- Barberán, Albert, Robert R. Dunn, Brian J. Reich, Krishna Pacifici, Eric B. Laber, Holly L. Menninger, James M. Morton, et al. 2015. «The ecology of microscopic life in household dust». *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 282 (1814).
- Bargagli, Elena, Federico Lavorini, Massimo Pistolesi, Elisabetta Rosi, Antje Prasse, Emilia Rota, e Luca Voltolini. 2017. «Trace metals in fluids lining the respiratory system of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and diffuse lung diseases». *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 42: 39–44.
- Bernstein, Jonathan A, Neil Alexis, Hyacinth Bacchus, I Leonard Bernstein, Pat Fritz, Elliot Horner, Ning Li, et al. 2008. «The health effects of non-industrial indoor air pollution.» *The Journal of allergy and clinical immunology* 121 (3): 585–91.
- Bouillard, Lucette, Olivier Michel, Michèle Dramaix, e Michel Devleeschouwer. 2005. «Bacterial contamination of indoor air, surfaces, and settled dust, and related dust endotoxin concentrations in healthy office buildings.» *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM* 12 (2): 187–92.
- Broberg, Roma, e Dan Norbäck. 2012. «Sick building syndrome (SBS) and sick house syndrome (SHS) in relation to psychosocial stress at work in the Swedish workforce». *Int Arch Occup Environ Health* 86:915-922.
- Cabo Verde, Sandra, Susana Marta Almeida, João Matos, Duarte Guerreiro, Marcia Meneses, Tiago Faria, Daniel Botelho, Mateus Santos, e Carla Viegas. 2015. «Microbiological assessment of indoor air quality at different hospital sites». *Research in Microbiology* 166 (7): 557–63.
- Calverley, Peter M.A., Julie A. Anderson, Bartolome Celli, Gary T. Ferguson, Christine Jenkins,

- Paul W. Jones, Julie C. Yates, e Jørgen Vestbo. 2007. «Salmeterol and fluticasone propionate and survival in chronic obstructive pulmonary disease». *New England Journal of Medicine* 356 (8). Massachusetts Medical Society : 775–89.
- Carey, Daniel E., e Patrick J. McNamara. 2015. «The impact of triclosan on the spread of antibiotic resistance in the environment». *Frontiers in Microbiology* 5: 780.
- Castanheira, Mariana, Mark A Toleman, Ronald N Jones, Franz J Schmidt, e Timothy R Walsh. 2004. «Molecular characterization of a beta-lactamase gene, *bla*<sub>GIM-1</sub>, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (12): 4654–61.
- Celli, Bartolome R., R.J. Halbert, Robert J. Nordyke, e Brigitte Schau. 2005. «Airway obstruction in never smokers: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey». *The American Journal of Medicine* 118 (12): 1364–72.
- Chen, Luke F., e Donald Kaye. 2009. «Current use for old antibacterial agents: polymyxins, rifamycins, and aminoglycosides». *Infectious Disease Clinics of North America* 23 (4): 1053–75.
- Coelho, Sónia D., Ana C.A. Sousa, Tomohiko Isobe, Joon-Woo Kim, Tatsuya Kunisue, António J.A. Nogueira, e Shinsuke Tanabe. 2016. «Brominated, chlorinated and phosphate organic contaminants in house dust from Portugal». *Science of The Total Environment* 569: 442–49.
- Costa, C, e C Rydin. 2001. «Site investigation on heavy metals contaminated ground in Estarreja (Portugal)». *Engineering Geology* 60 (1–4): 39–47.
- Cravo, Joao, Dinarte Viveiros, Isabel Domingues, e Paulo Matos. 2016. «DPOC em Portugal». DPOC.PT. <http://dpoc.pt/dpoc-em-portugal>. (Acedido a 2016-12-07)
- Dalmolin, Tanise Vendruscolo, Bianca Vendruscolo Bianchini, Grazielle Guidolin Rossi, Ana Carolina Ramos, Ana Cristina Gales, Priscila de Arruda Trindade, e Marli Matiko Anraku de Campos. 2017. «Detection and analysis of different interactions between resistance mechanisms and carbapenems in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*». *Brazilian Journal of Microbiology* 223:6.
- Davies, J, e D Davies. 2010. «Origins and evolution of antibiotic resistance». *Microbiology and*

*Molecular Biology Reviews* 74 (3): 417–33.

- Davis, Meghan F, Sally Ann Iverson, Patrick Baron, Aimee Vasse, Ellen K Silbergeld, Ebbing Lautenbach, e Daniel O Morris. 2012. «Household transmission of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other *staphylococci*». *The Lancet Infectious Diseases* 12 (9): 703–16.
- Deal, Eli N., Scott T. Micek, Richard M. Reichley, e David J. Ritchie. 2009. «Effects of an alternative cefepime dosing strategy in pulmonary and bloodstream infections caused by *Enterobacter* spp, *Citrobacter freundii*, and *Pseudomonas aeruginosa*: A single-center, open-label, prospective, observational study». *Clinical Therapeutics* 31 (2): 299–310.
- Deng, Wenjing, Yemao Chai, Huiying Lin, Winnie W.M. So, K.W.K. Ho, A.K.Y. Tsui, e R.K.S. Wong. 2016. «Distribution of bacteria in inhalable particles and its implications for health risks in kindergarten children in Hong Kong». *Atmospheric Environment* 128: 268–75.
- Devarajan, Naresh, Thilo Köhler, Periyasamy Sivalingam, Christian van Delden, Crispin K. Mulaji, Pius T. Mpiana, Bastiaan W. Ibelings, e John Poté. 2017. «Antibiotic resistant *Pseudomonas* spp. in the aquatic environment: A prevalence study under tropical and temperate climate conditions». *Water Research* 115: 256–65.
- Dickson, Robert P, John R Downward, e Gary B Huffnagle. 2013. «The role of the bacterial microbiome in lung disease». *Expert Review of Respiratory Medicine* 7 (3).
- Direção-Geral da Saúde, LISBOA. 2013. «Portugal – Controlo da Infecção e resistências aos antimicrobianos em números – 2013».
- Direção-Geral da Saúde, LISBOA. 2015. «Programa Nacional para as Doenças Respiratórias Portugal Doenças Respiratórias em Números – 2015».
- Douwes, J, P Thorne, N Pearce, e D Heederik. 2003. «Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects.» *The Annals of occupational hygiene* 47 (3). Oxford University Press: 187–200.
- Downward, John R., Deborah L. Thompson, Meilan K. Han, Christine M. Freeman, Lisa McCloskey, Lindsay A. Schmidt, Vincent B. Young, et al. 2011. «Analysis of the lung microbiome in the “Healthy” smoker and in COPD». Editado por Stefan Bereswill. *PLoS ONE* 6 (2): e16384.

- Duarte, Sofia, Fernanda Cássio, e Cláudia Pascoal. 2012. «Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) in Microbial Ecology - Insights from Freshwaters». *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology* » "Gel Electrophoresis - Principles and Basics" Cap.11, p. 173-196.
- Dy, Rajany, e Sanjay Sethi. 2016. «The lung microbiome and exacerbations of COPD». *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 22 (3): 196–202.
- Emerson, Joanne B., Patricia B. Keady, Nicholas Clements, Emily E. Morgan, Jonathan Awerbuch, Shelly L. Miller, e Noah Fierer. 2016. «High temporal variability in airborne bacterial diversity and abundance inside single-family residences». *Indoor Air* 27 (3): 501–702.
- Elhariri, Mahmoud, Dalia Hamza, Rehab Elhelw, e Sohad M. Dorgham. 2017. «Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in camel in Egypt: potential human hazard». *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 16 (1): 21.
- Ferreira, J., M. Drummond, N. Pires, G. Reis, C. Alves, e C. Robalo-Cordeiro. 2016. «Optimal treatment sequence in COPD: Can a consensus be found?». *Revista Portuguesa de Pneumologia (English Edition)* 22 (1): 39–49.
- Fidalgo, Cátia, Isabel Henriques, Jaqueline Rocha, Marta Tacão, e Artur Alves. 2016. «Culturable endophytic bacteria from the salt marsh plant *Halimione portulacoides*: phylogenetic diversity, functional characterization, and influence of metal(loid) contamination». *Environmental Science and Pollution Research* 23 (10): 10200–214.
- Fonseca, Érica L., Verónica V. Vieira, Rosângela Cipriano, e Ana C.P. Vicente. 2005. «Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical settings in Amazon region, Brazil». *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 44 (3): 303–9.
- Fragoso, E., S. André, J.P. Boleo-Tomé, V. Areias, J. Munhá, e J. Cardoso. 2016. «Understanding COPD: A vision on phenotypes, comorbidities and treatment approach». *Revista Portuguesa de Pneumologia (English Edition)* 22 (2): 101–11.
- Galès, Amandine, Valérie Bru-Adan, Jean-Jacques Godon, Karine Delabre, Philippe Catala, Arnaud Ponthieux, Michel Chevallier, Emmanuel Birot, Jean-Philippe Steyer, e Nathalie Wéry. 2015. «Predominance of single bacterial cells in composting bioaerosols».

*Atmospheric Environment* 107: 225–32.

- Garcia, Susana, Margarida Rocha, Paula Pinto, António M.F. Lopes, e Cristina Bárbara. 2008. «Treino de músculos inspiratórios em doentes com DPOC». *Revista Portuguesa de Pneumologia* 14 (2): 177–94.
- Garofalo, Cristiana, Elena Bancalari, Vesna Milanović, Federica Cardinali, Andrea Osimani, Maria Luisa, Savo Sardaro, et al. 2017. «Study of the bacterial diversity of foods: PCR-DGGE versus LH-PCR». *International Journal of Food Microbiology* 242: 24-36.
- Giedraitienė, A, Adresas Susirašinėti, : A Giedraitienė, Agnė Giedraitienė, Astra Vitkauskienė, Rima Naginienė, e Alvydas Pavilonis. 2011. «Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria». *Medicina (Kaunas) REVIEW Medicina (Kaunas)* 4747 (33): 137–46.
- Gilarranz, R., C. Juan, J. Castillo-Vera, F.J. Chamizo, F. Artiles, I. Álamo, e A. Oliver. 2013. «First detection in Europe of the metallo- $\beta$ -lactamase IMP-15 in clinical strains of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*». *Clinical Microbiology and Infection* 19 (9): E424–27.
- Hamzam, Lara Q, e Assist M Laith Abdulhassan Jawad. 2017. «Isolation and Molecular Characterization of *Klebsiella pneumonia* isolated from Dust», *AL-Muthanna Journal of Pure Sciences (MJPS)* n. 41.
- Handal, Trude, Ingar Olsen, Clay B. Walker, Dominique A. Caugant, Ujiie K., Nishida N., Sawai T., Finegold S.M., e Jousimies-Somer H. 2005. «Detection and characterization of B-lactamase genes in subgingival bacteria from patients with refractory periodontitis». *FEMS Microbiology Letters* 242 (2): 319–24.
- Hanski, Ilkka, Leena Von Hertzen, Nanna Fyhrquist, Kaisa Koskinen, Kaisa Torppa, Tiina Laatikainen, Piia Karisola, et al. 2012. «Environmental biodiversity, human microbiota, and allergy are interrelated». *Proc Natl Acad Sci U S A.* 09(21): 8334–8339.
- Hanson, Blake, Yanjiao Zhou, Eddy J. Bautista, Bruce Urch, Mary Speck, Frances Silverman, Michael Muilenberg, et al. 2016. «Characterization of the bacterial and fungal microbiome in indoor dust and outdoor air samples: a pilot study». *Environ. Sci.: Processes Impacts* 18 (6): 713–24.

- Hartmann, Erica M., Roxana Hickey, Tiffany Hsu, Clarisse M. Betancourt Román, Jing Chen, Randall Schwager, Jeff Kline, et al. 2016. «Antimicrobial chemicals are associated with elevated antibiotic resistance genes in the indoor dust microbiome». *Environmental Science & Technology* 50 (18): 9807–15.
- Hawkey, P M. 1998. «The origins and molecular basis of antibiotic resistance.» *BMJ (Clinical research ed.)* 317 (7159). BMJ Group: 657–60.
- Henriques, Isabel, Susana Araújo, Anabela Pereira, Vanessa B. Menezes-Oliveira, António Correia, Amadeu M.V.M. Soares, Janeck J. Scott-Fordsmand, e Mónica J.B. Amorim. 2015. «Combined effect of temperature and copper pollution on soil bacterial community: Climate change and regional variation aspects». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 111: 153–59.
- Henriques, Isabel S., Fátima Fonseca, Artur Alves, Maria José Saavedra, e António Correia. 2006. «Occurrence and diversity of integrons and  $\beta$ -lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters». *Research in Microbiology* 157 (10): 938–47.
- Henriques, Isabel, Marta Tação, Laura Leite, Cátia Fidalgo, Susana Araújo, Cláudia Oliveira, e Artur Alves. 2016. «Co-selection of antibiotic and metal(loid) resistance in gram-negative epiphytic bacteria from contaminated salt marshes». *Marine Pollution Bulletin* 109 (1): 427–34.
- Hermesen, Elizabeth D, Christopher J Sullivan, e John C Rotschafer. 2003. «Polymyxins: pharmacology, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical applications.» *Infectious disease clinics of North America* 17 (3): 545–62.
- Hilty, Markus, Conor Burke, Helder Pedro, Paul Cardenas, Andy Bush, Cara Bossley, Jane Davies, et al. 2010. «Disordered microbial communities in asthmatic airways». Editado por Olivier Neyrolles. *PLoS ONE* 5 (1): e8578.
- Hospodsky, Denina, Jing Qian, William W Nazaroff, Naomichi Yamamoto, Kyle Bibby, Hamid Rismani-Yazdi, e Jordan Peccia. 2012. «Human occupancy as a source of indoor airborne bacteria.» *PloS one* 7 (4): e34867.
- Huang, Yvonne J., John R. Downward, Robert P. Dickson, Jeffrey L. Curtis, Gary B. Huffnagle, e MeiLan K. Han. 2017. «Understanding the role of the microbiome in chronic obstructive

- pulmonary disease: principles, challenges, and future directions». *Translational Research* 179: 71–83.
- Huang, Yvonne J., Eugenia Kim, Michael J. Cox, Eoin L. Brodie, Ron Brown, Jeanine P. Wiener-Kronish, e Susan V. Lynch. 2010. «A persistent and diverse airway microbiota present during chronic obstructive pulmonary disease exacerbations». *OMICS: A Journal of Integrative Biology* 14 (1): 9–59.
- Inácio, M.M., V. Pereira, e M.S. Pinto. 1998. «Mercury contamination in sandy soils surrounding an industrial emission source (Estarreja, Portugal)». *Geoderma* 85 (4): 325–39.
- Infarmed, 2017 «Protuário Terapêutico online» <http://app10.infarmed.pt/prontuario/index.php> (Acedido a 27-6-2017)
- Jeon, Eun Mi, Heung Joo Kim, Kweon Jung, Joo Hyung Kim, Min Young Kim, Yong Pyo Kim, e Jong-Ok Ka. 2011. «Impact of Asian dust events on airborne bacterial community assessed by molecular analyses». *Atmospheric Environment* 45 (25): 4313–21.
- Kateete, David P, Ritah Nakanjako, Juliet Namugenyi, Joseph Erume, Moses L Joloba, e Christine F Najjuka. 2016. «Carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* at Mulago Hospital in Kampala, Uganda (2007-2009).» *SpringerPlus* 5 (1): 1308.
- Kim, Ki-Hyun, Ehsanul Kabir, e Shamin Ara Jahan. 2016. «A review on the distribution of Hg in the environment and its human health impacts». *Journal of Hazardous Materials* 306: 376–85.
- Kim, Y., Y. Jee, Y. Gho, e Y. Kim. 2012. «Metagenomic analysis of bacteria and bacteria-derived nanovesicles collected from indoor dust». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 129 (2): AB18.
- King, Paul T., Steven Lim, Adrian Pick, James Ngui, Zdenka Prodanovic, William Downey, Cliff Choong, et al. 2013. «Lung T-cell responses to nontypeable *Haemophilus influenzae* in patients with chronic obstructive pulmonary disease». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131 (5): 1314–1321.e14.
- Lagares, Antonio, Betina Agaras, Marisa P. Bettiol, Blanca M. Gatti, e Claudio Valverde. 2015.

- «A cultivation-independent PCR-RFLP assay targeting *oprF* gene for detection and identification of *Pseudomonas* spp. in samples from fibrocystic pediatric patients». *Journal of Microbiological Methods* 114: 66–74.
- Lin, Sheng-Hsiang, Ping-Hung Kuo, Po-Ren Hsueh, Pan-Chyr Yang, e Sow-Hsong Kuo. 2007. «Sputum bacteriology in hospitalized patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease in Taiwan with an emphasis on *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*». *Respirology* 12 (1): 81–87.
- Lopes, Marta Lobão, Ana Maria Rodrigues, e Victor Quintino. 2014. «Ecological effects of contaminated sediments following a decade of no industrial effluents emissions: The Sediment Quality Triad approach». *Marine Pollution Bulletin* 87: 117–30.
- Ludden, C., M. Cormican, B. Austin, e D. Morris. 2013. «Rapid environmental contamination of a new nursing home with antimicrobial-resistant organisms preceding occupation by residents». *Journal of Hospital Infection* 83: 327-329.
- Martins, Vânia Catarina Mendes. 2017. «Comunidade bacteriana endofítica cultivável de *Halimione portulacoides*». Universidade de Aveiro.
- Masuda, N, E Sakagawa, S Ohya, N Gotoh, H Tsujimoto, e T Nishino. 2000. «Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*.» *Antimicrobial agents and chemotherapy* 44 (12): 3322–27.
- McIntosh, Douglas, Michelle Cunningham, Baijing Ji, Frank A. Fekete, Erin M. Parry, Sarah E. Clark, Zachary B. Zalinger, et al. 2008. «Transferable, multiple antibiotic and mercury resistance in Atlantic Canadian isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* is associated with carriage of an IncA/C plasmid similar to the *Salmonella enterica* plasmid pSN254». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61 (6): 1221–28.
- Megharaj, Mallavarapu, Balasubramanian Ramakrishnan, Kadiyala Venkateswarlu, Nambrattil Sethunathan, e Ravi Naidu. 2011. «Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective». *Environment International* 37 (8): 1362–75.
- Messi, Patrizia, Carla Sabia, Immacolata Anacarso, Carla Condò, Ramona Iseppi, Sara Stefani, Simona de Niederhausern, e Moreno Bondi. 2015. «Prevalence of multi-drug-resistant (MDR) bacteria in air samples from indoor and outdoor environments». *Aerobiologia* 31

(3): 381–87.

- Michaelsen, Astrid, Flavia Pinzari, Katrin Ripka, Werner Lubitz, e Guadalupe Piñar. 2006. «Application of molecular techniques for identification of fungal communities colonising paper material». *International Biodeterioration & Biodegradation* 58 (3–4): 133–41.
- Mills, A.A.S., H.W. (Bud) Platt, e R.A.R. Hurta. 2006. «Sensitivity of *Erwinia* spp. to salt compounds in vitro and their effect on the development of soft rot in potato tubers in storage». *Postharvest Biology and Technology* 41 (2): 208–14.
- Moura, Alexandra, Susana Araujo, Marta S. Alves, Isabel Henriques, Anabela Pereira, e António C. M. Correia. 2014. «The contribution of *Escherichia coli* from human and animal sources to the integron gene pool in coastal waters». *Frontiers in Microbiology* 5: 419.
- Murphy, Timothy F, Charmaine Kirkham, Antoinette Johnson, Aimee L Brauer, Mary Koszelak-Rosenblum, e Michael G Malkowski. 2016. «Sulfate-binding protein, CysP, is a candidate vaccine antigen of *Moraxella catarrhalis*» *Vaccine* 34: 3855–3861.
- Nagai, Satoshi, Kohsuke Hida, Shingo Urushizaki, Goh Onitsuka, Motoshige Yasuike, Yoji Nakamura, Atushi Fujiwara, et al. 2016. «Influences of diurnal sampling bias on fixed-point monitoring of plankton biodiversity determined using a massively parallel sequencing-based technique». *Gene* 576 (2): 667–75.
- Nazir, Shoab A., e Marcia L. Erbland. 2009. «Chronic Obstructive Pulmonary Disease». *Drugs & Aging* 26 (10): 813–31.
- Neisi, Abdolkazem, Gholamreza Goudarzi, Ali Akbar Babaei, Mehdi Vosoughi, Hassan Hashemzadeh, Abolfazl Naimabadi, Mohammad Javad Mohammadi, e Bayram Hashemzadeh. 2016. «Study of heavy metal levels in indoor dust and their health risk assessment in children of Ahvaz city, Iran». *Toxin Reviews* 35 (1–2): 16–23.
- Neu, H. C. 1992. «The Crisis in Antibiotic Resistance». *Science* 257 (5073): 1064–73.
- Nevalainen, A., e M. Seuri. 2005. «Of microbes and men». *Indoor Air* 15 (s9): 58–64.
- Nicolau, Carlos Juan, e Antonio Oliver. 2010. «Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*». *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 28 (Janeiro): 19–28.
- Niederman, Michael S., e Alimuddin Zumla. 2016. «Understanding community-acquired

- respiratory tract infections». *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 22 (3): 193–95.
- Norbäck, Dan. 2009. «An update on sick building syndrome». *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 9 (1): 55–59.
- Oermann, C. M., K. S. McCoy, G. Z. Retsch-Bogart, R. L. Gibson, M. McKeivitt, e A. B. Montgomery. 2011. «*Pseudomonas aeruginosa* antibiotic susceptibility during long-term use of aztreonam for inhalation solution (AZLI)». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66 (10): 2398–2404.
- Pankey, G A, e L D Sabath. 2004. «Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections.» *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 38 (6): 864–70.
- Pastorinho, M Ramiro, João Carlos Lanzinha, Luís Taborda-Barata, Maria Assunção Vaz-Patto, Marisa Monteiro, Miguel C S Nepomuceno, Ana C A Sousa, M Ramiro Pastorinho, e Maria Assunção Vaz-Pato. 2016. «Toxic metals in indoor dust collected from houses included in the “6X60X” project (Covilhã, Portugal) during the cooling season». *Sustainability and Innovation for the Future " 41<sup>st</sup> Iahs World Congress 13-16 September 2016*.
- Poirel, Laurent, Timothy R. Walsh, Vincent Cuvillier, e Patrice Nordmann. 2011. «Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes». *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 70 (1): 119–23.
- Portaria nº 1450/2007 de 12 de Novembro. Diário da República, 1ª série-Nº 217-12 de Novembro de 2007. Ministério do Ambiente, do ordenamento do território e desenvolvimento Regional pp. 8372–8382, 2007.
- Portaria nº 353-A/2013 de 4 de Dezembro. Diário da República, 1ª série-Nº 235 de Dezembro de 2013. Ministério do Ambiente, do ordenamento do território e desenvolvimento Regional pp. 6644: 2-9.
- Postma, Dirkje S, Andrew Bush, e Maarten van den Berge. 2015. «Risk factors and early origins of chronic obstructive pulmonary disease». *The Lancet* 385 (9971): 899–909.
- Rabe, Klaus F., Suzanne Hurd, Antonio Anzueto, Peter J. Barnes, Sonia A. Buist, Peter

- Calverley, Yoshinosuke Fukuchi, et al. 2007. «Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 176 (6): 532–55.
- Roberts, Marilyn C. 2002. «Resistance to Tetracycline, Macrolide-Lincosamide-Streptogramin, Trimethoprim, and Sulfonamide Drug Classes». *Molecular Biotechnology* 20 (3): 261–84.
- Rocha, Jaqueline, Marta Tacão, Cátia Fidalgo, Artur Alves, e Isabel Henriques. 2016. «Diversity of endophytic *Pseudomonas* in *Halimione portulacoides* from metal(loid)-polluted salt marshes». *Environmental Science and Pollution Research* 23 (13): 13255–67.
- Sanchez, Tiffany R., Matthew Perzanowski, e Joseph H. Graziano. 2016. «Inorganic arsenic and respiratory health, from early life exposure to sex-specific effects: A systematic review». *Environmental Research* 147: 537–55.
- Schleibinger, Hans, Reinhard Keller, e Henning Rüden. 2004. «Indoor air pollution by microorganisms and their metabolites». Springer Berlin Heidelberg, 149–77.
- Schulz, Jochen, Inga Ruddat, Jörg Hartung, Gerd Hamscher, Nicole Kemper, e Christa Ewers. 2016. «Antimicrobial-resistant *Escherichia coli* survived in dust samples for more than 20 Years.» *Frontiers in microbiology* 7: 866.
- Seguel, J. M., R. Merrill, D. Seguel, e A. C. Campagna. 2016. «Indoor Air Quality». *American Journal of Lifestyle Medicine*, 15 june 2016.
- Sethi, Sanjay, Nancy Evans, Brydon J.B. Grant, e Timothy F. Murphy. 2002. «New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease». *New England Journal of Medicine* 347 (7): 465–71.
- Sethi, Sanjay, e Timothy F. Murphy. 2008. «Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease». *New England Journal of Medicine* 359 (22): 2355–65.
- Silva, André P., Vinicius Vicente Martins, Ana Flavia Tonelli Fernandes, e Eliana Guedes Stehling. 2014. «High level of resistance to Aztreonam and Ticarcillin in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from soil of different crops in Brazil». *Science of The Total Environment* 473–474: 155–58.
- Singer, Andrew C, Helen Shaw, Vicki Rhodes, e Alwyn Hart. 2016. «Review of antimicrobial resistance in the environment and its relevance to environmental regulators.» *Frontiers in*

*microbiology* 7: 1728.

- Soleimani, Zahra, Gholamreza Goudarzi, Armin Sorooshian, Mohammad Bagherian Marzouni, e Heidar Maleki. 2016. «Impact of Middle Eastern dust storms on indoor and outdoor composition of bioaerosol». *Atmospheric Environment* 138: 135–43.
- Sordillo, J. E., E. B. Hoffman, J. C. Celedón, A. A. Litonjua, D. K. Milton, e D. R. Gold. 2010. «Multiple microbial exposures in the home may protect against asthma or allergy in childhood». *Clinical & Experimental Allergy* 40 (6): 902–10.
- Stathopoulou, O.I., V.D. Assimakopoulos, H.A. Flocas, e C.G. Helmis. 2008. «An experimental study of air quality inside large athletic halls». *Building and Environment* 43 (5): 834–48.
- Stepanauskas, Ramunas, Travis C. Glenn, Charles H. Jagoe, R. Cary Tuckfield, And Angela H. Lindell, e J.V. McArthur. 2005. «Elevated microbial tolerance to metals and antibiotics in metal-contaminated industrial environments». *American Chemical Society* 39: 3671-3678
- Stewart, Eric J. 2012. «Growing unculturable bacteria.» *Journal of bacteriology* 194 (16): 4151–60.
- Suraju, Mohammed O., Sloan Lalinde-Barnes, Sachindra Sanamvenkata, Mahsa Esmaeili, Shishir Shishodia, e Jason A. Rosenzweig. 2015. «The effects of indoor and outdoor dust exposure on the growth, sensitivity to oxidative-stress, and biofilm production of three opportunistic bacterial pathogens». *Science of The Total Environment* 538: 949–58.
- Tacão, Marta, António Correia, e Isabel S. Henriques. 2015. «Low prevalence of carbapenem-resistant bacteria in river water: resistance is mostly related to intrinsic mechanisms». *Microbial Drug Resistance* 21 (5) : 497–506.
- Tacão, Marta, Alexandra Moura, Artur Alves, Isabel Henriques, Maria José Saavedra, e António Correia. 2005. «Evaluation of 16S rDNA- and gyrB-DGGE for typing members of the genus *Aeromonas*». *FEMS Microbiology Letters* 246 (1): 11–18.
- Täubel, Martin, Helena Rintala, Miia Pitkäranta, Lars Paulin, Sirpa Laitinen, Juha Pekkanen, Anne Hyvärinen, e Aino Nevalainen. 2009. «The occupant as a source of house dust bacteria». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 124 (4): 834–840.e47.
- Tischer, Christina, Jan-Paul Zock, Maria Valkonen, Gert Doekes, Stefano Guerra, Dick Heederik, Deborah Jarvis, et al. 2015. «Predictors of microbial agents in dust and

- respiratory health in the Ecrhs». *BMC Pulmonary Medicine* 15 (1): 48.
- Van Hoek, Angela H A M, Dik Mevius, Beatriz Guerra, Peter Mullany, Adam Paul Roberts, e Henk J M Aarts. 2011. «Acquired antibiotic resistance genes: an overview». *Frontiers in Microbiology* 2 article 203
- Viedma, E., V. Estepa, C. Juan, J. Castillo-Vera, B. Rojo-Bezares, C. Seral, F. J. Castillo, et al. 2014. «Comparison of local features from two spanish hospitals reveals common and specific traits at multiple levels of the molecular epidemiology of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas* spp.» *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (4): 2454–58.
- Wang, Feng Hua, Min Qiao, Zheng Chen, Jian-Qiang Su, e Yong-Guan Zhu. 2015. «Antibiotic resistance genes in manure-amended soil and vegetables at harvest». *Journal of Hazardous Materials* 299: 215–21.
- Wang, Wei, Fuyong Wu, Jinshu Zheng, e Ming Hung Wong. 2013. «Risk assessments of PAHs and Hg exposure via settled house dust and street dust, linking with their correlations in human hair». *Journal of Hazardous Materials* 263: 627–37.
- Weidinger, Paolina. 2012. Asthma and COPD Diagnoses and prescriptions in Swedish primary care. University Gothenburg.
- World health organization. 2016. «WHO | Household (Indoor) Air Pollution». WHO. World Health Organization.
- Wouters, I M, S K M Hilhorst, P Kleppe, G Doekes, J Douwes, C Peretz, e D Heederik. 2002. «Upper airway inflammation and respiratory symptoms in domestic waste collectors.» *Occupational and environmental medicine* 59 (2): 106–12.
- Wright, G. 2005. «Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification». *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (10): 1451–70.
- Yamaguchi, Nobuyasu, Takashi Baba, Tomoaki Ichijo, Yuka Himezawa, Kanami Enoki, Makoto Saraya, Pin-Fang Li, e Masao Nasu. 2016. «Abundance and community structure of bacteria on asian dust particles collected in Beijing, China, during the Asian Dust Season». *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 39 (1): 68–77.
- Yang, Qin, Huaguo Chen, e Baizhan Li. 2015. «Source identification and health risk assessment of metals in indoor dust in the vicinity of phosphorus mining, Guizhou Province, China».

*Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 68 (1): 20–30.

Yoo, Keunje, Tae Kwon Lee, Eun Joo Choi, Jihoon Yang, Sudheer Kumar Shukla, Sang-il Hwang, e Joonhong Park. 2017. «Molecular approaches for the detection and monitoring of microbial communities in bioaerosols: A review». *Journal of Environmental Sciences* 51: 234–47.

Zarei, Zahra, Amir Emami, Mohsen Moghadami, Golnar Sami Kashkooli, e Neda Pirbonyeh. 2016. «Molecular characterization of Isoniazid and Rifampicin target genes in multi-drug resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from southwest of Iran». *Gene Reports* 6: 19-25.

Zhanel, George G, Ryan Wiebe, Leanne Dilay, Kristjan Thomson, Ethan Rubinstein, Daryl J Hoban, Ayman M Noreddin, e James A Karlowsky. 2007. «Comparative review of the carbapenems.» *Drugs* 67 (7): 1027–52.







Realizado por: ..... (Data) ..... Código ..... Pág 11

#### D. VENTILAÇÃO E AQUECIMENTO

D1. VENTILAÇÃO: (1)  Natural  Nº total janelas  Nº janelas abertas diariamente  
(2)  Assistida  Nº total exaustores \_\_\_\_\_

D2. SISTEMAS DE PURIFICAÇÃO DE AR: Não  Sim

Se sim quais: \_\_\_\_\_

D3. ARREFECIMENTO: (1)  Não usa (2)  Ventilinha (3)  Ar condicionado  
(4)  Outro \_\_\_\_\_

D4. AQUECIMENTO: (1)  Não usa (2)  Aquecedores electricos (termoventiladores, ...)  
(3)  Lareira aberta (4)  Recuperador de calor (5)  Salamandra  
(6)  Ar condicionado (7)  Aquecimento Central (8)  Outro \_\_\_\_\_

Se SIM A AQUECIMENTO CENTRAL: (7.1)  Lenha (7.2)  Pellets (7.3)  Gasoleo  
(7.4)  Electricidade (7.5)  Gas (7.6)  Outro \_\_\_\_\_

#### E. CARACTERIZAÇÃO DAS OBRAS

A HABITAÇÃO SOFREU OBRAS NOS ÚLTIMOS 12 MESES? Não  Sim

Se sim complete o quadro seguinte:

Tipo de intervenção	Data	Comentários
Telhado		
Paredes exteriores		
Paredes interiores		
Pavimento		
Janelas		
Mobiliário novo		
Outro		



Projeto (re)RESPIRA: (micro)factores de risco ambiental para a progressão de doenças pulmonares; Autorização C. Ética: CE-FC5-2018-008; CHCV: 29apr181208070099; Autorização CNPD: Nº 8678/2018.  
Projeto GENAL: Marcadores genéticos e clínicos na trajetória da DPOC; Autorização Ética: 13NOV1814-40058832 (CHEV); PROCESSO N.º 6/2015 (UA); Autorização CNPD: N.º 8528/2018



Realizado por: ..... (Data) ..... Código ..... Pag 12

## F. INFORMAÇÃO COMPLEMENTAR

F1. PLANTAS DE INTERIOR: Não [ ] Sim [ ] Nº Total de plantas: \_\_\_\_\_  
F1.2. PLANTAS DE INTERIOR QUARTO: Não [ ] Sim [ ] Nº de plantas: \_\_\_\_\_

### F2. PROBLEMAS VISÍVEIS:

F2.1. BOLOR VISÍVEL: Não [ ] Sim [ ]

Se sim, Onde: \_\_\_\_\_

Extensão: \_\_\_\_\_

F2.2. OUTROS SINAIS DE HUMIDADE: (1) [ ] Cheiro humidade (2) [ ] Manchas (spots) visíveis  
(3) [ ] Soalho escurecido (4) [ ] Bolhas/ descoloração em soalho sintético  
(5) [ ] Outros \_\_\_\_\_

F2.3. TENDÊNCIA PARA CONDENSAÇÃO NAS JANELAS: Não [ ] Sim [ ]

Se sim, em quais: \_\_\_\_\_

F2.4. TINTALASCADA: Não [ ] Sim [ ]

Se sim, Onde: \_\_\_\_\_

Extensão: \_\_\_\_\_

F2.5. OUTROS PROBLEMAS: \_\_\_\_\_

### F3. PERCEÇÃO DA QUALIDADE DO AMBIENTE INTERIOR:

F3.1. Indique o nível de humidade da sua casa:

(1) [ ] Nada (2) [ ] Pouco (3) [ ] Moderadamente (4) [ ] Muito (5) [ ] Extremamente

F3.2. Usa ALGUM APARELHO DESUMIDIFICADOR? Não [ ] Sim [ ]

Se sim, em que divisão: \_\_\_\_\_