



**INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA**  
**Área Departamental de Engenharia Química**

## **Caracterização da Exposição Ocupacional ao Microbiota em Motoristas de Táxis**

**MATEUS LOPES DOS SANTOS**  
(Licenciado em Saúde Ambiental)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre em Análise e  
Controlo de Riscos Ambientais para a Saúde

**Orientador**

Carla Sofia Costa Viegas (ESTeSL)

**Júri**

Presidente: Maria Paula Alves Robalo (ISEL)

Vogais: Anita Raquel Quintal Gomes (ESTeSL)

Carla Sofia Costa Viegas (ESTeSL)

**Lisboa**  
**Setembro de 2018**





**INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA**  
**Área Departamental de Engenharia Química**

## **Caracterização da Exposição Ocupacional ao Microbiota em Motoristas de Táxis**

**MATEUS LOPES DOS SANTOS**  
(Licenciado em Saúde Ambiental)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre em Análise e  
Controlo de Riscos Ambientais para a Saúde

**Orientador**

Carla Sofia Costa Viegas (ESTeSL)

**Júri**

Presidente: Maria Paula Alves Robalo (ISEL)

Vogais: Anita Raquel Quintal Gomes (ESTeSL)

Carla Sofia Costa Viegas (ESTeSL)

**Lisboa**  
**Setembro de 2018**

*Acknowledgement:* This work was supported by the Instituto Politécnico de Lisboa, Lisbon, Portugal, for funding the project “W2E Bioburden” (IPL/2016/W2E\_ESTeSL) and by the.FCT – Fundação para Ciência e Tecnologia under grant (02/SAICT/2016 – Project nº 23222).

## **Agradecimentos**

Começo por agradecer a todos aqueles que, de forma direta ou indireta, contribuíram, ao longo destes dois anos, para o bom funcionamento do mestrado.

À Doutora Carla Viegas que me orientou para a conclusão desta etapa, prestando todo o acompanhamento e o incentivo necessários, bem como pela exímia disponibilidade e atenção.

A toda a equipa do projeto de investigação pela dedicação, pela entrega, pela simpatia e disponibilidade que sempre demonstraram, e pela transmissão de conhecimentos.

Por fim, e não menos importante, à minha mãe e à minha namorada pelo aconselhamento, força, incentivo, persistência e disponibilidade constantes.

## Resumo

A exposição ocupacional a diversos fatores de risco, como os riscos físicos, químicos e biológicos, tem vindo a aumentar a prevalência de doenças do foro respiratório, bem como de cancro. Os motoristas de táxis são um grupo profissional que trabalham num ambiente bastante complexo. O sistema de aquecimento, ventilação e ar condicionado é bastante utilizado para garantir um maior conforto térmico, no entanto, pode ser uma potencial fonte de contaminação do ambiente interior do habitáculo, dado que a proliferação de microrganismos, como fungos e bactérias, nos filtros do sistema AVAC é uma realidade. Este fator poderá pôr em risco a saúde dos seus ocupantes. Com isto em mente, o objetivo deste estudo passa por caracterizar a contaminação microbiana nestes filtros e estimar a exposição dos motoristas de táxis a microrganismos. Para isto, foram recolhidos filtros de táxis que operam nos arredores de Lisboa, bem como de veículos controlo. Os filtros foram extraídos e inoculados em meios de cultura de MEA, DG-18, TSA e VRBA, para análise do microbiota. Complementarmente, procedeu-se à deteção molecular de *Aspergillus* sections, através de qPCR. *Aspergillus* sp. foi isolado em percentagens significativas, e foi detetada a proliferação de estirpes toxigénicas. Por outro lado, não foi possível observar contaminação bacteriana a Gram-negativa nos filtros analisados. Os resultados obtidos sugerem a necessidade de aumentar a periodicidade de substituição dos filtros, tanto nos táxis, como nos veículos controlo.

## Palavras-chave

Exposição ocupacional, caracterização microbiota, táxis, filtros ar-condicionado, fungos, bactérias, *Aspergillus* sp., biologia molecular

## **Abstract**

The occupational exposure to several risk factors, such as physical, chemical and biological risks, has been increasing the prevalence of respiratory diseases as well as cancer. Taxi drivers are a professional group working in a very complex environment. The heating, ventilation and air conditioning system is widely used to ensure greater thermal comfort. However, it can be a potential source of contamination to the cabin indoor environment, since the microorganism proliferation, such as fungi and bacteria, in the HVAC system's a reality. This may endanger the health of the occupants. The aim of this study is to characterize the microbial load in these filters and to estimate the exposure of taxi drivers to microorganisms. To achieve that, HVAC filters from taxis were collected as well as control vehicles. The filters were extracted and inoculated in MEA, DG-18, TSA and VRBA for microbiota analysis. In addition, the molecular detection of *Aspergillus* sections through qPCR was performed. *Aspergillus* sp. was isolated in significant percentages, and it was detected the proliferation of toxigenic fungi. On the other hand, it wasn't possible to observe Gram-negative bacterial contamination in the analyzed filters. The results suggest the need to increase the frequency of filter substitution, both in taxis and in control vehicles.

## **Keywords**

Occupational exposure, microbiota characterization, taxis, air-conditioner filters, fungi, bacteria, *Aspergillus* sp., molecular biology

## Lista de abreviaturas

AC – Ar condicionado

ACGIH – *American Conference of Governmental Industrial Hygienist*

AFB1 – Aflotoxina B1

AMT – Autoridade da Mobilidade e dos Transportes

AVAC – Aquecimento, ventilação e ar condicionado

BS – *British Standards*

°C – Grau celsius

CG-EM – Cromatografia gasosa – Espirometria de massa

DG18 – *Dichloran glycerol*

DNA – *Deoxyribonucleic acid*

EASHW – *European Agency for Safety and Health at Work*

EN – European norm

EUA – Estados Unidos da América

HPA – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

IARC – *International Agency for Research on Cancer*

MEA – *Malt extract agar*

OTA – Ocratoxina

PCR – *Polymerase chain reaction*

PM – *Particulate matter*

qPCR – *Real time polymerase chain reaction*

RPM – Rotações por minuto

TSA – *Trypticase soy agar*

UFC – Unidade formadora de colónias

# Índice

Agradecimentos .....	iv
Resumo .....	vi
Abstract.....	vii
Lista de abreviaturas .....	viii
Índice .....	ix
Índice de figuras e de tabelas .....	x
1. Introdução.....	1
1.1. Questões de partida.....	3
1.2. Objetivos .....	3
1.2.1. Objetivo geral .....	3
1.2.2. Objetivos específicos.....	3
2. Enquadramento Teórico .....	4
2.1. A indústria dos táxis.....	4
2.2. Fungos.....	7
2.3. Bactérias .....	9
2.4. Métodos de avaliação.....	10
3. Metodologia.....	16
3.1. Características e recolha dos filtros .....	16
3.2. Amostragem de filtros.....	17
3.3. Caracterização da contaminação microbiana.....	17
3.4. Detecção molecular de <i>Aspergillus sections</i> .....	17
3.5. Análise estatística .....	18
4. Resultados.....	19
4.1. Caracterização da microbiota .....	19
4.2. Detecção molecular de <i>Aspergillus sections</i> .....	21
5. Discussão .....	21
6. Conclusão.....	26
7. Referências.....	27
8. Apêndice .....	36

## Índice de figuras e de tabelas

<b>Tabela 1</b> – Limitações apresentadas de métodos utilizados para colheitas de frações cultiváveis. ....	6
<b>Tabela 2</b> – Estudos realizados no âmbito da problemática da exposição ocupacional em habitáculos - Estado de arte. ....	13
<b>Tabela 3</b> – Sequência dos primers e TaqMan probes usados para qPCR.....	18
<b>Tabela 4</b> – Distribuição fúngica em filtros de táxis e do grupo controlo (MEA e DG18). .....	20
<b>Tabela 5</b> – Resultados do teste de Mann-Whitney para comparação entre o grupo alvo de estudo e o grupo controlo. ....	21

## 1. Introdução

Os poluentes são emitidos para a atmosfera através de diversas fontes naturais e/ou de atividades antropogénicas e, conseqüentemente, podem causar diversos efeitos na saúde pública e no meio ambiente (Kampa & Castanas, 2008). Desde os anos 2000, tem existido um aumento significativo na prevalência de doenças do foro respiratório, bem como de cancro. Isto está associado, sobretudo, à exposição da população a fatores de risco físicos, químicos e biológicos nos seus locais de trabalho (Bosson-Rieutord et al., 2018).

Nos dias de hoje, grande parte da nossa sociedade passa a maior parte do seu tempo (cerca de 90%) em ambientes interiores: escolas, trabalho, escritórios, centros comerciais, viaturas pessoais ou transportes públicos (EPA, 2018; Luksamijarulkul et al., 2004). Esta população está potencialmente exposta a um maior número de riscos que têm impacto direto e indireto na saúde, dado que os poluentes presentes no ar interior são, muitas das vezes, superiores aos presentes no ar exterior (EPA, 2018). Para além disso, as pessoas que estão expostas aos poluentes do ar interior durante maiores períodos de tempo são aquelas que se encontram mais suscetíveis aos efeitos da exposição (EPA, 2018).

Enquadrados neste contexto estão os motoristas de táxis. Os motoristas de táxis são uma população que, em Portugal, tipicamente, trabalha cerca de 8h diárias, e estão inseridos em ambientes interiores, denominados habitáculos (dos veículos). Esta realidade, associada a uma série de comportamentos da população em questão, nomeadamente os hábitos tabágicos, bem como o transporte de clientes transportadores de doenças (sazonais, crónicas, entre outras), faz destes microambientes, ambientes bastante complexos. Os veículos de transporte público fazem uso intensivo ao seu sistema de aquecimento, ventilação e ar condicionado (AVAC) para garantir um maior conforto térmico dentro dos seus habitáculos (Wan-Keun & Lee, 2014). Vários estudos desenvolvidos em autocarros de transporte público e em veículos pessoais têm-se focado na quantificação fúngica, quer através de amostragens de ar e superfícies, quer através de amostras dos filtros dos sistemas AVAC dos veículos (Hamanda & Fujita, 2002; Vonberg et al., 2010; Katsoyiannis et al.,

2012; Prakash et al., 2014; Nowakowicz-Dębek et al., 2017). O objetivo passa por desenvolver uma caracterização microbiológica destes ambientes, e entender qual o impacto na saúde dos seus ocupantes.

Os filtros dos sistemas AVAC, quer em edifícios, quer em veículos, têm como objetivo reter a contaminação microbiológica presente no ar, bem como de outros compostos orgânicos, durante longos períodos de tempo (meses a anos) (Viegas et al., 2018a). Uma das grandes questões que se colocam relativamente à utilização destes meios filtrantes do ar exterior, são os prazos da sua substituição. Ao longo do tempo, os filtros vão perdendo a sua capacidade de filtração e passam a ser meios ótimos para proliferação de microrganismos, que, por sua vez, levarão à aerossolização para o interior do habitáculo (Wan-Keun & Lee, 2014).

A exposição a bioaerossóis está, possivelmente, ligada a diversos problemas de saúde pública (Pastuszka et al., 2000; Ren et al., 2001), como asma, rinites alérgicas, síndrome do edifício doente e pneumonias (Wan-Keun & Lee, 2014). A título de enquadramento, os bioaerossóis podem incluir esporos ou células de fungos e bactérias, hifas fúngicas, pólen, vírus, bem como metabolitos (Oppliger, 2014). Os sintomas respiratórios e o comprometimento da função pulmonar são os efeitos de saúde mais estudados e, possivelmente, entre os mais associados aos bioaerossóis (Rylander and Jacobs, 1997; Fogelmark et al., 1994; Eduard et al., 2001; Douwes et al., 2003; Subbarao et al., 2009).

Como métodos de amostragem, para proceder à respetiva análise da contaminação e carga microbiana, é possível utilizar dois tipos de métodos: métodos passivos e ativos, respetivamente (Viegas et al., 2018a). A utilização de métodos passivos, quando comparados com os métodos ativos, são úteis dado que conseguem amostrar durante longos períodos de tempo (semanas até meses), ao invés do curto período de tempo dos ativos (minutos) (Viegas et al., 2018a). Isto é de facto uma vantagem, dado que a caracterização do ambiente em estudo é mais representativa da exposição. Do ponto de vista da quantificação (análise), a complementaridade dos métodos de cultura com as ferramentas de biologia molecular é de todo uma vantagem para a caracterização da contaminação fúngica existente num determinado contexto (Viegas et al., 2016a; Viegas et al., 2016b; Viegas et al., 2018a).

Existem poucos estudos que se debruçam na qualidade do ar, com especial foco nos veículos automóveis, e, em Portugal, não existe legislação nem normas técnicas para a inspeção dos filtros dos sistemas AVAC ou da qualidade do ar condicionado que circula no interior dos habitáculos.

Todos estes aspetos justificam a pertinência de avaliar estes contextos profissionais. Com isto em mente, o presente estudo, tem como objetivo caracterizar a contaminação microbiológica dos filtros do sistema AVAC de táxis, e justificar que este é um meio útil para avaliar a exposição ocupacional dos motoristas de táxis a microrganismos.

### **1.1. Questões de partida**

- Qual a contaminação microbiológica nos filtros dos sistemas AVAC dos táxis analisados?
- Serão os filtros dos sistemas AVAC ferramentas úteis para avaliar a exposição ocupacional dos motoristas de táxis a microrganismos?

### **1.2. Objetivos**

#### **1.2.1. Objetivo geral**

Este projeto tem como objetivo caracterizar a contaminação microbiológica dos filtros dos sistemas AVAC de táxis da cidade de Lisboa, por forma a estimar a exposição dos condutores.

#### **1.2.2. Objetivos específicos**

- Caracterizar a contaminação microbiana dos filtros do sistema AVAC de táxis;
- Estimar a exposição dos motoristas de táxis a microrganismos, através de métodos passivos (filtros do sistema AVAC);
- Sugerir recomendações para a indústria de táxis, com o propósito de mitigar, ou reduzir ao mínimo, o risco de exposição a agentes biológicos.

## 2. Enquadramento Teórico

### 2.1. A indústria dos táxis

Nas últimas décadas o crescimento da população humana provocou um aumento da circulação de veículos, que, conseqüentemente, aumentou as frotas de carros, motociclos e autocarros (De Conto et al., 2018). Com isto, a indústria de táxis está presente em todo o mundo, no entanto o seu contexto nas operações tem as suas especificações em diferentes partes do mundo.

Dados da Autoridade da Mobilidade e dos Transportes (AMT), em agosto de 2016, apontam que, em Portugal, existiam 13776 táxis licenciados, valores que correspondem a cerca de 1.33 táxis por cada mil habitantes. A nível nacional, o distrito de Lisboa representa 34% da densidade de táxis e 27% da população. Importa ainda realçar que em Portugal, a Lei n.º 6/2013, de 22 de agosto, do Diário da República n.º 15/2013, Série I de 2013-01-22, aprova o exercício da profissão de motorista de táxi.

Os motoristas de táxis são um grupo profissional com diversas especificidades, uma vez que estão inseridos num microambiente complexo.

Tal como avança a *European Agency for Safety and Health at Work* (EASHW), este grupo profissional está exposto a uma ampla gama de perigos e riscos associados. Dentro destes riscos, os que estão associados à condução são os riscos psicossociais, químicos, biológicos e físicos, bem como o próprio comportamento. De uma forma sistematizada, os riscos podem-se enquadrar nos seguintes capítulos (EASHW, 2010):

- I. Riscos físicos:
  - a. Vibrações emitidas pelo próprio veículo;
  - b. Movimentação manual de cargas, como bagagens, cadeiras de rodas de doentes com mobilidade reduzida;
  - c. Movimentos repetitivos e adoção de posturas incorretas que levam a lesões musculoesqueléticas;
- II. Riscos químicos e biológicos:
  - a. Emissões de gases do trânsito e outros poluentes;
- III. Riscos psicossociais:
  - a. Stress;

- b. Violência;
  - c. Trabalho por turnos;
- IV. Comportamento individual;
- a. Hábitos tabágicos;
  - b. Consumo de estimulantes, como café e álcool;
  - c. Falta de exercício físico.

Por todo este enquadramento, é consensual que o ambiente de trabalho destes operacionais é influenciado por fatores internos e externos. De facto, no que ao risco de exposição a agentes biológicos diz respeito, as indicações dadas pela Agência que regula a saúde e segurança no trabalho na Europa não aponta para um caminho claramente definido, dado que não torna claro a sua identificação, nem para quais as medidas de prevenção a adotar para salvaguardar a saúde deste grupo profissional.

As informações sobre a contaminação fúngica das unidades de tratamento de ar, e dos sistemas AVAC é bastante genérica, contudo não existe informação relativa aos filtros dos sistemas de ar condicionados dos veículos automóveis. Os estudos desenvolvidos neste âmbito têm incidido, sobretudo, nos autocarros de transporte público (BUS) e automóveis pessoais - Tabela 2. Na realidade, a utilização de sistemas AVAC reduz em 80% o número total de microrganismos, incluindo fungos e bactérias (Li et al., 2016). Esta contaminação contribui para a prevalência de doenças relacionadas com a qualidade do ar dos edifícios, que incluem doenças infecciosas e hipersensibilidade, como rinites alérgicas e asma (Levetin et al., 2001). Alguns estudos demonstram que as bactérias têm a capacidade de sobreviver em filtros de polipropileno (Miaskiewicz-Peska, 2012).

Os microrganismos proliferam nos filtros ao longo do tempo, uma vez que as condições de humidade, nutrientes, temperatura, entre outras, são ótimas, o que representam uma fonte de risco motivada pela exposição biológica (Viegas et al., 2018a). É quando estes sistemas são ligados, que a corrente de ar passa através do sistema de filtração do veículo e que pode aerossolizar microrganismos transmitidos pelo filtro e, posteriormente, transportá-los para o interior do habitáculo (Li et al., 2016). A monitorização ambiental pode ser realizada através de métodos ativos ou passivos (Andon, 2016). Os métodos

ativos envolvem a deposição ou imposição de partículas numa placa de Petri com meio de cultura. De um modo geral, os equipamentos utilizados funcionam com o recurso a vácuo com o intuito de puxar um volume de ar previamente definido (Andon, 2016). Nos métodos passivos, as partículas suspensas no ar podem-se depositar naturalmente numa placa de Petri aberta com meio de cultura. Baseia-se, portanto, nas forças gravitacionais para as partículas depositarem-se no meio (Andon, 2016). Com isto, os filtros dos sistemas AVAC são um importante método passivo para avaliar a exposição ocupacional a microrganismos, dado que conseguem recolher a contaminação microbiana durante um longo período de tempo (semanas a largos meses) (Viegas et al., 2015; Madsen et al., 2016), o que expressa um espectro mais abrangente da microbiota (Viegas et al., 2018a).

Tal como descrito na Tabela 2, a maior parte dos estudos neste tipo de contexto ocupacional assentam em colheitas de ar e superfície. Em outros estudos, foram igualmente utilizadas colheitas de ar como metodologia para a monitorização da contaminação fúngica: Perez et al., 2006; Lugauskas & Jaskelevicius, 2007; Homma et al., 2009; Must et al., 2009; Ando et al., 2009; Sanchez et al., 2009; Mentese et al., 2009. De facto, este tipo de metodologia tem algumas limitações. De acordo com a BS EN 13098:2001 (British Standards, 2001), os métodos utilizados para colheitas de frações cultiváveis têm as suas limitações – tabela 1.

**Tabela 1** – Limitações apresentadas de métodos utilizados para colheitas de frações cultiváveis.

Métodos de Colheita	Limitações
Impacto	<ul style="list-style-type: none"><li>- Apenas permite colheitas estáticas;</li><li>- Baixo limite de detecção;</li><li>- Colheitas muito curta;</li><li>- Perda das partículas maiores;</li><li>- Pouco adequado para substituir métodos não baseados na cultura;</li><li>- Pobre precisão;</li><li>- Grande carga horária envolvida;</li><li>- Apenas permite a utilização de um meio de cultura por análise.</li></ul>
Impinger	<ul style="list-style-type: none"><li>- Estimativa de exposição limitada para efeitos tóxicos e alérgicos;</li><li>- Pouco adequado para substituir métodos não baseados na cultura;</li><li>- Apenas permite colheitas estáticas;</li><li>- Comparada com a amostragem de filtros, a amostragem é muito curta;</li><li>- Precisão pobre;</li><li>- Os agregados são contabilizados como uma única colônia;</li><li>- Perda das partículas maiores;</li><li>- Grande carga horária envolvida.</li></ul>

Fonte: adaptado da BS EN 13098:2001.

## 2.2. Fungos

Os fungos são organismos eucariotas que não possuem clorofila e que obtém nutrientes de matéria orgânica viva ou morta (Eduard, 2009). Os fungos são ubíquos no ambiente, estimando-se que compreendam, aproximadamente, 25% da biomassa global (Eduard, 2009; Khan & Karuppayil, 2012) e que existam cerca de 1.5 milhões de espécies (Viegas et al., 2017c). Têm a capacidade de invadir organismos e infetar plantas, animais, humanos, e também decompor comida, madeira e têxteis (Eduard, 2009).

Os fungos têm a capacidade de se replicar através da formação de esporos sexuais e assexuais (Eduard, 2009). O tamanho dos esporos varia entre 2 µm e

120  $\mu\text{m}$ , e as suas concentrações podem ser bastantes elevadas em ambientes ocupacionais (Viegas et al., 2017c). Para se multiplicarem e sobreviverem necessitam de matéria orgânica, oxigénio e água. A temperatura também é um fator importante para o crescimento fúngico. Maior parte dos fungos são mesofílicos e apresentam um intervalo de crescimento ótimo compreendido entre os 15°C e os 30°C (Eduard, 2009). Existem também fungos que conseguem-se desenvolver em meios com temperaturas negativas, com os psicrófilos (*Cladosporium herbarum*), e também a temperaturas mais elevadas, como os termófilos (*Thermomyces lanuginosus*) (Eduard, 2009). Alguns fungos, como *Aspergillus fumigatus*, têm uma taxa de crescimento ótima com temperaturas idênticas à temperatura do corpo humano, tornando-o o agente oportunista infeccioso mais importante. Outra variável a considerar é o pH, sendo o pH 6 o ótimo para o crescimento fúngico, no entanto, tal como a temperatura, estes podem-se desenvolver abaixo e/ou acima do pH normal.

Os metabolitos primários são constituintes dos microrganismos e são essenciais para a sua sobrevivência, como os componentes da parede celular. No entanto, existem alguns microrganismos que produzem metabolitos secundários, como micotoxinas que são, provavelmente, utilizados para competir com outros microrganismos (Eduard, 2009, Viegas et al., 2017c). Estas micotoxinas são toxinas potentes que vários fungos toxigénicos podem libertar através dos esporos. A aflotoxina B1 (AFB1), produzida pelas espécies fúngicas *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (Pohanka, 2014), é considerada genotóxica e um potencial agente carcinogénico a nível hepático (IARC, 1993; Pohanka, 2014). Isto corrobora a importância da avaliação da exposição ocupacional em contextos onde existe a possibilidade de se desenvolverem microrganismos e destes terem a capacidade de alcançar o Homem, uma vez que os esporos têm a capacidade de agregar estas micotoxinas. Ora, estes esporos têm a capacidade de se dispersar e transportar no ar, o que implica que o Homem está exposto a este fator de risco. De realçar que algumas micotoxinas funcionam como autênticos antibióticos, dado que apresentam elevada toxicidade para as bactérias, e baixa toxicidade para o Homem (Eduard, 2009).

A maior fonte de fungos em ambientes interiores é realmente o ar exterior. Os esporos são facilmente dispersos pelos sistemas AVAC e a contaminação

destes sistemas são uma importante causa do aumento da contaminação fúngica nos ambientes interiores (Morey et al., 1984; Eduard, 2009). Quando extrapolado para a realidade da atividade do Homem, em que a sua presença em ambientes interiores é superior a 80% durante um dia, é fácil entender que as principais vias de exposição a esporos fúngicos são através da via inalatória e digestiva (Khan & Karuppaiyil, 2012). O tamanho, a forma e a estrutura da superfície oferecem a capacidade dos esporos se depositarem na via aérea do Homem (Eduard, 2009). Muitas doenças em humanos, resultante da exposição a fungos e os seus metabolitos, estão claramente definidas (Baxi et al., 2016). Nestas incluem-se a asma, micose bronco pulmonar alérgica, sinusite fúngica e pneumonite por hipersensibilidade (Baxi et al., 2016), rinites (Douwes et al., 2003), doenças reumáticas (Khan & Karuppaiyil, 2012). No entanto, a correlação entre a exposição a fungos e as doenças profissionais é bastante difícil de comprovar devido à múltipla exposição a outros componentes de bioaerossóis. Daqui nasce a necessidade de caracterizar a exposição ocupacional (Oppliger & Duquenne, 2016).

### **2.3. Bactérias**

Em ambientes interiores não industriais, uma das maiores fontes de contaminação de bactérias é o Homem (Mandal & Brandl, 2011). Atividades particulares como falar, tossir, espirrar, andar, lavar as mãos ou tomar banho geram bioaerossóis. Outro fator importante na avaliação da concentração de microrganismos em ambientes interiores é a abertura e fecho de portas e janelas, uma vez que o ambiente exterior é outra das principais fontes de contaminação do ambiente interior (Mandal & Brandl, 2011).

O grupo das bactérias representa um vasto leque de microrganismos unicelulares procariotas, que se reproduzem por divisão celular simples (sem núcleo individualizado e sem organelos intracelulares). Estes podem assumir a forma de bastonetes (bacilos) ou de esferas (cocos). A maioria das bactérias contém informação genética e capacidade energética necessária para garantir o seu crescimento e reprodução, sendo capazes de utilizar várias fontes de nutrientes inorgânicos e orgânicos. A maioria das espécies encontradas na

qualidade do ar são saprófitas, o que significa que obtêm a sua energia a partir de fontes orgânicas (Abelho, 2010; Goyer et al., 2001).

As bactérias são classificadas com base em características celulares, morfológicas ou bioquímicas. Neste âmbito, as bactérias apresentam diferentes tipos de revestimentos, com base na reação à mancha de Gram: Gram-positivas, revestidas por uma camada externa de peptidoglicano; e as Gram-negativas, revestidas por uma camada externa de macromoléculas (lipopolissacarídeos). Aquando de uma infeção, a célula bacteriana desintegra-se e produz endotoxinas, responsáveis por um grande número de infeções. Algumas Gram-negativa também produzem toxinas. As bactérias Gram-positiva possuem uma parede mais resistente e algumas produzem esporos, os quais lhes conferem uma maior resistência às variações ambientais (Gorny & Dutkiewicz, 2002). No interior, as espécies são mais numerosas e as concentrações estão acima das do exterior. Estudos do ar interior demonstraram que as bactérias Gram-positivas, nomeadamente as espécies de *Micrococcus* e *Staphylococcus*, são as que predominam em ambientes interiores (Abelho, 2010; Gorny & Dutkiewicz, 2002; Goyer et al., 2001). A maioria das bactérias naturalmente presentes não causam efeitos adversos à saúde. As bactérias são microrganismos que estão presentes no organismo humano. Estas passam a ser um risco para a saúde quando as concentrações de algumas espécies são elevadas (Goyer et al., 2001). Alguns géneros bacterianos, como *Bacillus* e *Clostridium*, formam endósporos. Os esporos bacterianos podem permanecer viáveis durante anos e são resistentes a diversas condições ambientais como o calor, o frio e a radiação ultravioleta. As formas vegetativas também desenvolvem mecanismos de defesa em que algumas espécies reduzem a sua taxa metabólica e o seu tamanho sob condições de limitação de nutrientes (Tang, 2009).

#### **2.4. Métodos de avaliação**

A capacidade de identificar com precisão um organismo é fundamental para os aspetos de diagnóstico fúngico e da epidemiologia, seja no ramo da fitopatologia, ciência médica, nos estudos ambientais ou no controlo biológico (Atkins & Clark, 2004).

A medição de microrganismos depende da colheita de uma amostra em/ou sobre meios sólidos, líquidos ou meios de agar com a subsequente análise micro e macroscópica, microbiológica, bioquímica, imunoquímica ou molecular. De acordo com Douwes (2003), têm sido desenvolvidas duas abordagens para a avaliação da exposição microbiana: métodos convencionais e métodos moleculares.

Os métodos convencionais são conhecidos por sobrestimar os resultados referentes à contaminação microbiana (Viegas et al., 2012). A temperatura pode não ser a mais adequada para permitir o crescimento fúngico de diversas espécies, o que provocará a inibição de umas e favorecerá outras (Viegas et al., 2012). As diferentes taxas de crescimento das estirpes também são um fator a ter em conta, dado que determinados fungos têm taxas de crescimento mais elevados que outros, e poderão inibir o crescimento de determinadas espécies (Viegas et al., 2012). No entanto, esta metodologia apresenta igualmente várias vantagens. Através deste tipo de metodologia os microrganismos podem ser efetivamente identificados e o limite de deteção é superior quando comparado com métodos microscópicos (Eduard, 2009).

Os métodos convencionais de cultura são desenvolvidos através da colheita de amostragens de ar, por impacto em meios sólidos ou líquidos, ou através de filtros que, posteriormente, são transferidos para um meio de cultura sólido (Mandal & Brandl, 2011). As UFC são, à posteriori, contabilizadas através de inspeção visual. Os microrganismos que são coletados diretamente para um meio agar através de métodos impacto podem ser cultivados diretamente, enquanto os microrganismos coletados para um meio líquido ou filtro têm de ser transferidos para um meio de cultura (Mandal & Brandl, 2011). Vários meios de amplo espectro têm sido avaliados para cultivo de espécies fúngicas, como o MEA (*malt extract agar*) e o DG-18 (*dicloran-glicerol agar*) (Mandal & Brandl, 2011). No que concerne ao cultivo de bactérias, o meio de TSA (*tryptic soy agar*) é comumente utilizado (Mandal & Brandl, 2011). Por sua vez, o meio de cultura VRB agar (*violet red bile agar*) é um meio seletivo usado para detetar microrganismos coliformes que fermentam de lactose. Este atua como agente inibidor de algumas bactérias Gram-positiva, especialmente *Staphylococcus*.

Os métodos moleculares, como o PCR (*polymerase chain reaction*) são usados para detetar e quantificar DNA fúngico (Mandal & Brandl, 2011; Viegas et al., 2012). Para o desenvolvimento da tecnologia de PCR é crucial basear-se em 3 passos: 1) selecionar uma região alvo específica de DNA para identificar o fungo; 2) extrair o DNA da amostra; 3) destacar um método para identificar a presença da região alvo de DNA da amostra (Atkins & Clark, 2004). Estes métodos caracterizam-se pela sua rapidez de execução, quando comparados com os métodos descritos anteriormente, e para além disso são técnicas com um reduzido tempo de deteção e um maior nível de deteção, quando comparado com metodologias convencionais (Atkins & Clark, 2004). Importa ainda salientar que a utilização deste tipo de metodologias requer um conhecimento prévio do genoma das estirpes ou espécies alvo (Viegas et al., 2012).

No entanto, a aplicação de métodos convencionais em complementaridade com os moleculares é importante dado que estes não permitem distinguir os microrganismos que são viáveis dos que não são (Mandal & Brandl, 2011). Para além disso, permitem caracterizar a distribuição fúngica em contexto poucos estudados (Viegas et al., 2012). A melhor estratégia de avaliação, até ao presente, parece ser a utilização de métodos convencionais de cultura para identificar microrganismos, complementados com métodos moleculares para a quantificação (Eduard, 2009).

**Tabela 2** – Estudos realizados no âmbito da problemática da exposição ocupacional em habitáculos - Estado de arte.

Contexto	País	Parâmetros avaliados (fungos/ bactérias/ metabolitos)	Métodos analíticos aplicados	Principais Resultados)	Referências
Filtros de AC de autocarros	Índia	Fungos	Amostras de ar Amostras de superfície Amostras de filtros Métodos de cultura	<p><b>Amostras de ar</b></p> <p>A espécie fúngica dominante foi <i>Aspergillus niger</i> (UFC/m<sup>3</sup>: 230; 33.25%).</p> <p>A segunda e terceira espécies fúngicas mais dominantes foram <i>Chrysonillia sitophila</i> e <i>Alternaria alternata</i> (UFC/m<sup>3</sup>: 76; 10.65%; <i>p-value</i>: 0.28 e UFC/m<sup>3</sup>: 61.5; 8.62%; <i>p-value</i>: 0.44 respetivamente).</p> <p><b>Amostras de superfície</b></p> <p>A espécie fúngica dominante foi <i>Aspergillus niger</i> (42.51%).</p> <p>Esta foi seguida pela espécie fúngica <i>Aspergillus flavus</i> (26.33%), <i>Rhizopus stolonifer</i> (5.82%) e <i>Aspergillus tamaris</i> (2.66%).</p> <p><b>Amostras de filtros</b></p> <p>A espécie fúngica <i>Cladosporium chlorocephalum</i> contribuiu com cerca de 25% da dispersão, seguida pela espécie fúngica <i>Curvularia lunata</i> (17.74%), <i>Aspergillus niger</i> (17.18%) e <i>Aspergillus flavus</i> (14.71%).</p>	Prakash et al., 2014
Filtros de AC de automóveis	Reino Unido	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA)	Amostras de ar Cromatografia Gasosa – Espirometria de Massa (CG-EM)	<p><b>Concentração de HPA</b></p> <p>Foram detetados 7 HPA cujas concentrações variavam entre os 650 e 2700 µg/Filtros de automóveis.</p> <p>Foram detetados 6 HPA cancerígenos (BaA, BbF, BkF, BaP, Ipy, dBA) com concentrações compreendidas entre os 590 e 2400 µg/Filtros de automóveis.</p>	Katsoyiannis et al., 2012

Contexto	País	Parâmetros avaliados (fungos/ bactérias/ metabolitos)	Métodos analíticos aplicados	Principais Resultados	Referências																																		
Filtros de AC de habitações e automóveis	Japão	Fungos	Amostras de ar Amostras de poeiras Métodos de cultura	<p><b><u>Contaminação Fúngica nos Filtros de CA - carros</u></b></p> <p>Em 24% dos automóveis examinados foram detetados níveis superiores a 1000 fungos/m<sup>3</sup> e mais de 2000 fungos/m<sup>3</sup> em 13%.</p> <p>As espécies fúngicas <i>Cladosporium</i> e <i>Penicillium</i> foram predominantes quer no quadrante de fungos libertados pelo AC, quer pelo que está presente nos filtros de AC.</p> <p>A contaminação fúngica dos filtros de AC foi bastante baixa durante o primeiro ano, e aumento com a idade do filtro. A libertação de fungos pelo sistema de AC também foi menos nos filtros mais recentes que nos antigos.</p> <p>A contaminação fúngica nos filtros de AC dos automóveis parquados no exterior foi significativamente inferior àqueles que parqueiam debaixo de uma zona coberta. A média de fungos presentes nos filtros enquanto o carro estava ao sol foi de 339 fungos/m<sup>3</sup>, e daqueles que estavam à sombra foi de 724 fungos/m<sup>3</sup>.</p>	Hamanda & Fujita, 2002																																		
Motoristas de autocarros no setor dos transportes públicos	Polónia	Bioaerossóis (Mesófilos aeróbios, bactérias, fungos)	Amostras de ar Métodos de cultura	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th><b><u>Primavera</u></b></th> <th><b><u>Outono</u></b></th> <th><b><u>Inverno</u></b></th> <th><b><u>Média (UFC/m<sup>3</sup>)</u></b></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Mesófilos</td> <td>1576</td> <td>2258</td> <td>64229</td> <td>13173</td> </tr> <tr> <td>Aeróbios</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Bactérias</td> <td>4147</td> <td>83893</td> <td>97084</td> <td>3232</td> </tr> <tr> <td>Fungos</td> <td>470</td> <td>2678</td> <td>1702</td> <td>1289</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th><b><u>Secção Dianteira</u></b></th> <th><b><u>Secção Traseira</u></b></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Total fungos</td> <td>60.7%</td> <td>39.3%</td> </tr> <tr> <td>Total bactérias</td> <td>43.7%</td> <td>56.3%</td> </tr> </tbody> </table>		<b><u>Primavera</u></b>	<b><u>Outono</u></b>	<b><u>Inverno</u></b>	<b><u>Média (UFC/m<sup>3</sup>)</u></b>	Mesófilos	1576	2258	64229	13173	Aeróbios					Bactérias	4147	83893	97084	3232	Fungos	470	2678	1702	1289		<b><u>Secção Dianteira</u></b>	<b><u>Secção Traseira</u></b>	Total fungos	60.7%	39.3%	Total bactérias	43.7%	56.3%	Nowakowicz-Dębek et al., 2017
	<b><u>Primavera</u></b>	<b><u>Outono</u></b>	<b><u>Inverno</u></b>	<b><u>Média (UFC/m<sup>3</sup>)</u></b>																																			
Mesófilos	1576	2258	64229	13173																																			
Aeróbios																																							
Bactérias	4147	83893	97084	3232																																			
Fungos	470	2678	1702	1289																																			
	<b><u>Secção Dianteira</u></b>	<b><u>Secção Traseira</u></b>																																					
Total fungos	60.7%	39.3%																																					
Total bactérias	43.7%	56.3%																																					

Contexto	País	Parâmetros avaliados (fungos/ bactérias/ metabolitos)	Métodos analíticos aplicados	Principais Resultados	Referências
Sistemas de AC em automóveis	EUA	Fungos e Bactérias (biofilmes)	Métodos de cultura	Elevado número de colônias fúngicas. Fungos detetados: <i>Penicillium sp.</i> , <i>Methylobacterium sp.</i> , <i>Flavobacterium sp.</i> , <i>Cladosporium sp.</i> , <i>Alternaria sp.</i> , <i>Paecilomyces sp.</i> , <i>Acanthamoeba sp.</i>	Simmons et al., 1999
Sistemas de AC em automóveis	Alemanha	Microrganismos Matéria Particulada (PM)	Amostras de ar Métodos de cultura	Uma extrema humidade leva a um aumento de esporos fúngicos dentro do habitáculo (1400 UFC/m <sup>3</sup> ) antes do sistema de AC iniciar. Também o número de UFC e o número de partícula imediatamente caíram para níveis relativamente baixos. Quando testado com os filtros mais antigos o número de UFC e de partículas aumentou, e quando o filtro foi alterado a qualidade do ar interior melhorou. <b>Em 5 minuto:</b> Redução média de microrganismos: 81.7% Redução média de esporos fúngicos: 83.3% Redução média de partículas: 87.8%	Vonberg et al., 2010
Trabalhos de manutenção em sistemas de ventilação	Polónia	Fungos e bactérias	Amostras de ar (salas) e amostrador individual de aerossóis Amostras de superfícies Métodos de cultura	As concentrações médias de aerossóis bacterianos e fúngicos estão compreendidas entre 3.6×10 <sup>3</sup> – 2.3×10 <sup>4</sup> UFC/m <sup>3</sup> e 4.8×10 <sup>2</sup> – 4.6×10 <sup>3</sup> UFC/m <sup>3</sup> , respetivamente, nos postos de trabalho onde a limpeza mecânica dos sistemas de ventilação é realizada, e 2.3×10 <sup>4</sup> – 1.2×10 <sup>5</sup> UFC/m <sup>3</sup> e 2.9 – 4.6×10 <sup>3</sup> nos postos de trabalho onde os filtros foram substituídos. Nos postos de trabalho analisados, foram identificadas 22 espécies de bactérias que pertencem a 12 géneros, e 12 espécies de fungos que pertencem a 8 géneros: - <i>Staphylococcus</i> (7 espécies), <i>Micrococcus</i> (2 espécies) e <i>Bacillus</i> (7 espécies), e fungos filamentosos do género <i>Aspergillus</i> (3 espécies).	Golofit-Szymczak et al., 2013

### **3. Metodologia**

#### **3.1. Características e recolha dos filtros**

Os filtros do sistema de AC utilizados para o estudo foram recolhidos de 19 táxis e de 28 veículos pessoais, usados como controlo, de 3 cidades diferentes do distrito de Lisboa (Lisboa, Loures e Setúbal), entre os meses de janeiro e março do ano de 2017 (condições climatéricas registadas: inverno, com temperaturas a rondar os 10°C).

A amostragem passou pela remoção dos filtros do sistema de AC em cada veículo indicado. Os filtros foram cortados em 3 partes com 2 cm<sup>2</sup> cada (1.4 x 1.4 cm), e foram mantidos em refrigeração a 4° C antes de proceder à sua análise.

Os filtros dos táxis são compostos por carvão ativado e são classificados como “categoria 2” de proteção ao habitáculo (tipicamente com poros  $\geq 3.0 \mu\text{m}$ ), por forma a garantir a proteção do ar interior do mesmo contra partículas. Estes dados estão em conformidade com os requisitos de proteção definidos na EN 15695-1:2009. Os filtros foram utilizados no máximo até 15000 km, tal como estipulado no plano de manutenção preventiva da companhia de táxis. A ventilação fornecida para o interior do habitáculo é de 1 volume do habitáculo / minuto. Relativamente aos critérios de substituição dos filtros do sistema de AC, é considerada a frequência estabelecida pela marca do veículo para evitar o bloqueio do filtro, conforme se encontra estabelecido no plano de manutenção preventivo e também assegurado pela supervisão da companhia de táxis.

Os veículos usados como controlo apresentam as mesmas características técnicas e os mesmos critérios de substituição dos filtros do sistema de AC, exceto para medidas de controlo adicionais ao plano de manutenção preventiva (específica para cada marca e veículo e dependente do proprietário).

Adicionalmente, um filtro foi obtido com as mesmas características técnicas, mas sem uso prévio.

### 3.2. Amostragem de filtros

Uma parte do filtro foi lavado com 10 mL de solução salina Tween™ 80 a 0.1% (NaCl 0.9%) durante 30 min a 250 rpm num agitador orbital de laboratório (Edmund Bühler SM-30, Hechingen, Germany) (Viegas et al., 2017a), diluído e cultivado em 4 meios, para avaliação microbiológica (2% MEA com 0.05 g/L de cloranfenicol; DG18; TSA com 0.2% nistatina; VRBA).

Para a deteção molecular de *Aspergillus* sections foi utilizada a segunda parte do filtro com 5 mL de *PCR grade water* durante 10 min a 2500 rpm num agitador orbital de laboratório (Maxi Vortex). Procedeu-se de seguida à centrifugação de 10 mL de suspensão lavada a 3500 x g durante 30 min, tendo sido o sobrenadante descartado, à exceção dos 200 µL em que o sedimento celular foi ressuspenso. A extração do DNA foi realizada tal como descrito.

### 3.3. Caracterização da contaminação microbiana

As densidades fúngicas e bacterianas (unidade formadora de colónia (UFC) por 1 m<sup>2</sup> de área do filtro) foram determinadas nos diferentes meios de cultura. As espécies fúngicas foram identificadas microscopicamente utilizando lamelas com solução azul de lactofenol.

A identificação morfológica foi alcançada através das características macro e microscópicas, tal como descrito em De Hoog et al. (2000).

### 3.4. Deteção molecular de *Aspergillus sections*

A identificação molecular de espécies / estirpes fúngicas foi realizada através de *Real time PCR* (qPCR) utilizando o sistema *Via 7 Real-time PCR* (Applied Biosystems). As reações incluíram 1 x iQ *Supermix* (Bio-Rad), 0.5 µM de cada primer (Tabela 3), e 0.375 µM de TaqMan probe num volume total de 10 µL. A amplificação seguiu 3 passos de PCR: 50 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 30 s, annealing a 52 °C durante 30 s, e extensão a 72 °C durante 30s. Foi utilizado um controlo sem modelo em cada reação de PCR. Como controlo positivo das amplificações, foram obtidas amostras de DNA de estirpes de

referência do Laboratório de Microbiologia do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA).

**Tabela 3** – Sequência dos primers e TaqMan probes usados para qPCR.

<b>Aspergillus section</b>	<b>Sequências</b>	<b>Referências</b>
<b>Flavi (Estirpe toxigénica)</b> Forward primer Reverse primer Probe	5'-GTCCAAGCAACAGGCCAAGT-3' 5'-TCGTGCATGTTGGTGATGGT-3' 5'-TGTCTTGATCGGCGCCCG-3'	(Mayer et al., 2003)
<b>Fumigati</b> Forward primer Reverse primer Probe	5'-CGCGTCCGGTCCTCG-3' 5'-TTAGAAAAATAAAGTTGGGTGTCGG -3' 5'-TGTCACCTGCTCTGTAGGCCCG -3'	(Cruz-Perez et al., 2001)
<b>Circumdati</b> Forward primer Reverse primer Probe	5'-CGGGTCTAATGCAGCTCCAA-3' 5'-CGGGCACCAATCCTTTCA-3' 5'-CGTCAATAAGCGCTTTT-3'	(Viegas et al., 2017b)
<b>Versicolores</b> Forward primer Reverse primer Probe	5'-CGGCGGGGAGCCCT-3' 5'-CCATTGTTGAAAGTTTTGACTGATcTTA-3' 5'-AGACTGCATCACTCTCAGGCATGAAGTTCAG-3'	(EPA, 2017)

### 3.5. Análise estatística

O *software* para desenvolver a análise estatística usado foi o SPSS. Os resultados foram considerados significativos a um nível de significância de 5%. Foi utilizado o teste de *Shapiro-Wilk* por forma a testar a normalidade dos dados obtidos. A frequência da análise (n; %) e o cálculo dos valores mínimos e máximos foram realizados para os dados qualitativos e quantitativos, respetivamente.

Uma vez que a normalidade dos dados não foi verificada, foi utilizado o teste *Mann-Whitney* para comparar a contaminação fúngica (MEA e DG18) e a contaminação bacteriana (TSA).

## 4. Resultados

### 4.1. Caracterização da microbiota

Um total de 4 filtros de táxis, dos 19 em estudo (21.1%), apresentaram crescimento fúngico no meio de cultura em MEA, sendo que para o meio DG18 foram observados 6 filtros (31.6%). A nível de contaminação fúngica, ou da sua quantificação, foram registadas acima de 1000 UFC/m<sup>2</sup> em MEA, e 3000 UFC/m<sup>2</sup> em DG18. O crescimento fúngico foi mais prevalente nos veículos pessoais (15 dos 28 filtros em estudo (53.6%) em MEA e DG18), com uma contaminação fúngica acima de 68500 UFC/m<sup>2</sup> em MEA e 5500 UFC/m<sup>2</sup> em DG18.

*Cladosporium* sp. foi a espécie fúngica mais prevalente em MEA (71.4%) e em DG18 (76.2%), seguido de *Penicillium* sp. e *Aspergillus* section *Candidi* (tabela 3). Nos veículos controlo foi detetada uma microbiota mais diversificada, uma vez que foram identificadas 7 espécies fúngicas em MEA, e 4 em DG18. À semelhança dos filtros dos táxis, a espécie fúngica *Cladosporium* sp. foi a mais prevalente quer em MEA, quer em DG18 (85.4% e 72.7%, respetivamente). Foram também identificadas as seguintes espécies fúngicas em MEA: *Penicillium* sp., *Acremonium* sp., *Chrysosporium* sp., *Aureobasidium* sp., *Aspergillus* section *Candidi* e *Aspergillus* section *Nigri*; ao invés que em DG18 foram apenas identificadas *Penicillium* sp., *Aureobasidium* sp. e *Aspergillus* section *Versicolores* - Tabela 4.

*Aspergillus* sp. foi isolado em percentagens significativas no meio de cultura de DG18, com 14.3% nos filtros dos táxis e 15.6% nos veículos controlo, e ficou em segundo lugar entre os géneros fúngicos mais comuns detetados nos filtros dos táxis (*Aspergillus* section *Candidi*) e nos veículos controlo (*Aspergillus* section *Versicolores*).

Relativamente ao total de bactérias (em meio TSA), 12 de 19 filtros de táxis (63.2%) demonstraram contaminação bacteriana entre 0 a 47000 UFC/m<sup>2</sup>, sendo que nos veículos controlo 5 de 19 (26.3%) variou entre 0 e 17000 UFC/m<sup>2</sup>. Não foi observado contaminação bacteriana por Gram-negativa nos filtros analisados.

De referir que não foi observado, em qualquer meio de cultura, crescimento de microrganismos no filtro sem utilização prévia.

**Tabela 4 – Distribuição fúngica em filtros de táxis e do grupo controlo (MEA e DG18).**

<b>Espécies Fúngicas – Táxis</b>	<b>MEA (%; n)</b>	<b>DG18 (%; n)</b>
<i>Cladosporium sp.</i>	71.4; 2500	76.2; 8000
<i>Penicillium sp.</i>	28.6; 1000	9.5; 1000
<i>Aspergillus section Candidi</i>	0.0; 0	14.3; 1500
<b>Espécies fúngicas – Controlo</b>	<b>MEA (%; n)</b>	<b>DG18 (%; n)</b>
<i>Cladosporium sp.</i>	85.4; 82,000	72.7; 28,000
<i>Penicillium sp.</i>	13.0; 12,500	9.1; 3500
<i>Acremonium sp.</i>	8.8; 15,000	0.0; 0
<i>Chrysosporium sp.</i>	1.5; 2500	0.0; 0
<i>Aureobasidium sp.</i>	0.5; 500	2.6; 1000
<i>Aspergillus section Candidi</i>	0.5; 500	0.0; 0
<i>Aspergillus section Nigri</i>	0.5; 500	0.0; 0
<i>Aspergillus section Versicolores</i>	0.0; 0	15.6; 6000

n – Número de isolados

A contaminação fúngica em MEA foi significativamente superior nos veículos pessoais (grupo controlo) em comparação com o grupo dos táxis ( $U= 175$ ,  $p= 0.025$ ) - Tabela 5. Foram também detetadas uma significância positiva e uma correlação de intensidade fraca entre a contagem de fungos em MEA e em DG18 ( $r_s= 0.333$ ,  $p= 0.022$ ), o que significa que o número elevado em MEA está relacionado com um número elevado em DG18.

**Tabela 5** – Resultados do teste de Mann-Whitney para comparação entre o grupo alvo de estudo e o grupo controlo.

	Grupo	N	Ordens		Testes estatísticos	
			Média	Somatório	Mann-Whitney U	p
<b>Contaminação fúngica (MEA)</b> (UFC/m <sup>2</sup> )	Táxi	19	19.21	36500	175000	0.025*
	Controlo	28	27.25	76300		
	Total	47				
<b>Contaminação fúngica (DG18)</b> (UFC/m <sup>2</sup> )	Táxi	19	21.26	40400	214000	0.213
	Controlo	28	25.86	72400		
	Total	47				
<b>Contaminação bacteriana (TSA)</b> (UFC/m <sup>2</sup> )	Táxi	19	26.00	49400	228000	0.382
	Controlo	28	22.64	63400		
	Total	47				

\* Diferenças estatisticamente significativas num intervalo de significância de 5%.

#### 4.2. Detecção molecular de *Aspergillus sections*

A deteção molecular, através de qPCR, das espécies / estirpes fúngicas alvo do género *Aspergillus* foi negativa para todos os filtros analisados (táxis e controlo).

### 5. Discussão

O presente estudo teve como objetivo caracterizar a exposição ocupacional ao microbiota, existente nos filtros do sistema AVAC, em motoristas de táxis do distrito de Lisboa. Os sistemas de ar condicionado e humidificadores estão presentes nos mais diversos ambientes fechados com o objetivo de manter o ambiente confortável. Todavia, estes sistemas estão muitas vezes associados ao crescimento de microorganismos (Jo & Lee, 2008). De facto, os resultados obtidos no presente estudo demonstraram níveis elevados de fungos e bactérias nos filtros do sistema AVAC dos táxis, utilizados para o transporte de doentes nos arredores de Lisboa. Um estudo realizado igualmente em veículos automóveis revelou que as concentrações elevadas de fungos totais no ar foram

atingidas até 5 minutos depois do sistema AVAC ter sido ligado e que foi diminuído ao longo do tempo, sugerindo que estes estavam acumulados no filtro e que assim que o sistema AVAC foi ligado foram transportados para o habitáculo (Jo & Lee, 2008). Luo et al., (2016), referiu igualmente que os fungos têm a capacidade de proliferar nos filtros do sistema AVAC e nas respetivas tubagens, e que podem ser libertados para o ar interior.

A falta de planos de manutenção preventiva (Hamada & Fujita, 2002; Miąskiewicz-Peska, 2011; Viegas et al., 2018b) é o principal fator responsável pelo impacto dos sistemas AVAC na alteração da composição da contaminação microbiana no interior de habitações (Prussin & Marr, 2013) e dentro dos habitáculos dos veículos automóveis (Maus et al., 2001; Hamada & Fujita, 2002; Miąskiewicz-Peska, 2011; Prussin & Marr, 2013; Viegas et al., 2018b). O facto de vários passageiros entrarem no habitáculo do táxi durante um dia laboral pode potenciar a exposição ao microbiota, já que os clientes transportam os microrganismos no cabelo e roupas para dentro do veículo (Buttner & Stetzenbach, 1993; Goyer et al., 2001; Madureira et al., 2015; Ramos et al., 2016; Chmielowiec-Korzeniowska et al., 2016; Viegas et al., 2018b).

No presente estudo, a contaminação bacteriana foi mais prevalente nos filtros dos táxis que nos filtros dos veículos controlo. Este facto poderá ser explicado pela maior taxa de ocupação e rotação de ocupantes nos táxis, aliada à capacidade do sistema AVAC re-aerossolizar a biomassa presente nos tapetes, bancos de tecido e roupas dos ocupantes (Su et al., 2002; Li et al., 2016; Viegas et al., 2018b). De salientar que em ambos os grupos não foi observado o crescimento de bactérias Gram-negativas. Estas bactérias estão expostas ambientalmente a diversos fatores, nomeadamente, a alterações de temperatura e a disponibilidade de nutrientes e água (Ramos et al., 2001). Especificamente, Gram-negativas apresentam paredes celulares resistentes à temperaturas e pH extremos (Beveridge, 1999). Todavia, a desidratação produz danos ao nível do DNA e tem efeitos de desnaturação das proteínas (Ramos et al., 2001). Segundo Goyer (2001), estas bactérias apresentam uma parede celular frágil quando sujeitas a desidratação decorrente da exposição ao ar durante longos períodos de tempo. Tendo isto em linha de conta, a desidratação causada pelo sistema AVAC poderá ter sido o fator que inibiu o crescimento destas bactérias.

Os resultados obtidos foram diferentes quando utilizados vários meios de cultura, nomeadamente MEA e DG-18. A maioria das espécies de *Aspergillus* sp. isoladas foram apenas identificadas no meio de cultura DG-18 – *Aspergillus* section *Candidi* nos táxis, e *Aspergillus* section *Versicolores* nos veículos pessoais. Estes resultados corroboram a necessidade de utilizar outros meios além do MEA, nomeadamente o DG-18, mesmo que a contaminação fúngica entre os dois meios se correlacione positivamente. O meio de cultura MEA é largamente utilizado em estudos devido ao seu amplo espectro para deteção de fungos, e é, inclusive, recomendado pela *American Conference of Governmental Industrial Hygienist* (ACGIH) para a deteção e enumeração de fungos em ambientes interiores (Wu et al., 2000). Por outro lado, o meio DG-18 foi desenvolvido na década de 80, para a enumeração de fungos xerofílicos, que apresentem um crescimento mais lento quando comparado com outras espécies, e que por esse motivo o seu crescimento é inibido (Copetti et al., 2009). De facto, este meio restringe o tamanho das colónias das estirpes fúngicas com taxa de crescimento mais rápida (Bergwall & Stehn, 2002; Viegas et al., 2018b), possibilitando o crescimento de estirpes fúngicas diferenciadas e uma caracterização mais completa da contaminação fúngica em meios com elevadas taxas de contaminação (Viegas et al., 2017a).

A estirpe *Cladosporium* sp. foi a mais prevalente em todos os meios, e em ambos os grupos. Esta estirpe é ubíqua no meio ambiente e tem uma taxa de crescimento elevada (Luo et al., 2016). Trata-se de uma estirpe fúngica que é patogénica oportunista para o Homem, exceto em alguns casos de pacientes imunocomprometidos (Luo et al., 2016). É igualmente importante apontar que foram identificadas estirpes fúngicas potencialmente toxigénicas para a saúde humana (Varga et al., 2015) nos filtros dos táxis e dos veículos controlo, como *Penicillium* sp., *Aspergillus* section *Candidi*, *Aspergillus* section *Versicolores* e *Aspergillus* section *Nigri*. As estirpes fúngicas apontadas são conhecidas por serem produtoras de metabolitos secundários, micotoxinas, que têm impacto na saúde humana (Varga et al., 2015; IARC, 2012). As micotoxinas são consideradas contaminantes ambientais que podem ocorrer naturalmente, e serem amplamente encontradas em alimentos, nomeadamente, nozes, milho e amendoins (Fung & Clark, 2004; Mahoney & Molyneux, 2010). Devido à

exposição significativa a micotoxinas através de alimentos, o principal foco dos estudos realizados sobre micotoxinas tem em conta a via digestiva. Contudo, já existem alguns estudos realizados em ambientes ocupacionais e agrícolas por via inalatória. A inalação de bioaerossóis contaminados com micotoxinas representa uma via de exposição com um potencial de risco elevado (Hayes et al., 1984; Pependorf et al., 1985). *Aspergillus section Versicolores* está referenciada como produtora da micotoxina esterigmatocistina, considerada como tóxica e carcinogénica (Varga et al., 2015). É igualmente classificada pela IARC como 2b – potencialmente carcinogénica para humanos (IARC, 2012). Por sua vez, *Aspergillus section Nigri* e *Penicillium* sp. são produtoras de ocratoxina (OTA), que exhibe propriedades nefrotóxicas, imunossupressoras, tetrogénicas e carcinogénicas (Varga et al., 2015). Uma vez que os esporos têm a capacidade de agregar estas micotoxinas (Eduard, 2009), e que estes, uma vez formados, podem ser encaminhados pelas correntes de ar provenientes do sistema AVAC, estes dados corroboram o cenário, também encontrado em outros contextos ocupacionais, relativo à co-exposição a mais de um fator de risco – microbiota e metabolitos (micotoxinas) (Viegas et al., 2017a), e também a necessidade de desenvolver estudos que abranjam colheitas ambientais no interior dos habitáculos.

Dado que a prevalência de doenças fúngicas invasivas, como a aspergilose, está a aumentar, e representa um importante risco para a saúde da população, especialmente para indivíduos imunocomprometidos (Walsh et al., 2008; Kontoyiannis, 2012; Meletiadis & Roilides, 2013; Vermeulen et al., 2015), existe a necessidade de caracterizar o microbiota nos táxis destinados ao transporte de pacientes.

Estes dados apontam, igualmente, para a necessidade de ser implementadas medidas preventivas e de proteção, com o intuito de salvaguardar a saúde do grupo profissional – os taxistas (devido ao tempo de exposição), e dos ocupantes (já que podem ser pacientes imunocomprometidos).

Os métodos convencionais de cultura são de grande importância para identificar organismos viáveis, sendo fundamentais no estudo de organismos infecciosos (Samson et al., 2000; Eduard & Halstensen, 2009; Viegas et al., 2018b) e, conseqüentemente, nas avaliações de exposição ocupacional. No entanto, os

microrganismos viáveis constituem apenas uma pequena percentagem da contaminação microbiana, devido ao efeito seletivo do meio de cultura e das condições de cultivo (Amann et al., 1995; Heidelberg et al., 1997; Viegas et al., 2018b), levando à subestimação desse risco de exposição (Górny et al., 2016; Degois et al., 2017; Viegas et al., 2018b). Como tal, foram utilizadas ferramentas moleculares, como o qPCR. Não foi detetado, por qPCR, *Aspergillus* sections nos filtros avaliados. Isto pode estar relacionado com a inibição da amplificação por PCR devido à presença de substâncias ambientais complexas nas matrizes dos filtros, conforme relatado noutros estudos em ambientes altamente contaminados (Schrader et al., 2012; Viegas et al., 2014; Viegas et al., 2018b). De facto, os *primers* e sondas usados para amplificar as quatro sections de *Aspergillus*-alvo são específicos e possibilita detetar apenas uma espécie de cada vez, sendo mais sensíveis a potenciais inibidores de PCR.

Devido ao descrito anteriormente, o impacto do sistema AVAC na re-aerossolização do microbiota dentro do habitáculo, e a caracterização do mesmo, comprova que os filtros dos sistemas AVAC representam uma ferramenta adequada para estimar a exposição dos taxistas ao microbiota (bactérias e fungos) como um fator de risco ocupacional. A abordagem do presente estudo passou pela aplicação combinada de métodos convencionais de cultura com ferramentas moleculares, permitindo uma caracterização detalhada do microbiota. Embora não tenha sido bem-sucedido neste estudo, as técnicas de biologia molecular devem ser utilizadas, complementarmente aos métodos convencionais de cultura, em avaliações de exposição ocupacional onde espécies toxigénicas são esperadas (Viegas et al., 2017b; Viegas et al., 2018b). De facto, o microbiota detetado nos filtros do sistema AVAC pode ser considerado um bom indicador na estimativa da exposição do grupo profissional em estudo, dado que, com o potencial de transporte pelas correntes de ar para o interior do habitáculo, e conhecendo as estirpes que proliferam nestas matrizes, existe a probabilidade de estes estarem expostos a agentes microbiológicos. Adicionalmente, a caracterização efetuada permite definir uma metodologia a aplicar para a realização de avaliações ambientais.

Por fim, importa referir que o presente estudo apresenta limitações, concretamente no que respeita a metodologias de amostragem e de avaliação

dos potenciais efeitos na saúde dos trabalhadores. Para complementar toda a informação recolhida, e para reforçar a avaliação da exposição a este fator de risco, é de extrema importância perceber a exposição real a que o grupo profissional está sujeita, através da realização de uma amostragem ambiental, nomeadamente de ar e superfície. Esta informação vai permitir uma melhor compreensão da dose externa existente, ou seja, o que está “disponível” no ambiente para penetrar no organismo. Para finalizar qual o verdadeiro impacto da exposição, recomenda-se a realização de uma biomonitorização, com o objetivo de avaliar as concentrações que penetraram no organismo e estimar o efeito na saúde dos trabalhadores. Atualmente, por exemplo, já existem biomarcadores de exposição que utilizam matrizes biológicas como o sangue e a urina, para a determinação de algumas micotoxinas produzidas por espécies fúngicas, tais como, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp. (Vidal et al., 2018).

## 6. Conclusão

Os resultados deste estudo mostram que os fungos e as bactérias desenvolvem-se nos microambientes avaliados: táxis e veículos pessoais. Os géneros *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Penicillium* foram os mais prevalentes na caracterização microbiana realizada nos filtros dos sistemas AVAC. Estes filtros indiciam ser uma ferramenta adequada para caracterizar a proliferação de contaminação biológica nos veículos de transporte de passageiros, e, assim, viabilizar a avaliação da exposição ocupacional a microrganismos.

Os níveis de contaminação observados sugerem a necessidade de substituir os filtros com maior frequência, tanto nos táxis como nos veículos pessoais, a fim de evitar a proliferação de microrganismos e a re-aerossolização no habitáculo. Apesar de não ter sido possível detetar, através de qPCR, estirpes / espécies alvo do género *Aspergillus*, tal como descrito em bibliografia, o uso de métodos baseados em cultura em complemento com métodos moleculares, são ferramentas úteis para proceder a uma melhor caracterização do risco biológico.

## 7. Referências

- Abelho, M. (2010). Manual de monitorização microbiológica ambiental, 1–20.
- Amann, R.L., Ludwig, W., Schleifer, K.H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.*, 59: 143–169.
- Andon, B.M. (2006). Active Air vs. Passive Air (Settle Plate) Monitoring in Routine Environmental Monitoring Programs. *PDA J Pharm Sci and Tech*, 60: 350-355.
- Ando, N., Yoshino, H., Takari, R. (2009). Field survey on indoor microorganism in twenty-five residences in japan. In *Healthy Buildings, 9th international conference & exhibition*, Syracuse, NY, September (13-17): 708.
- Atkins, S., Clark, I.M. (2004). Fungal molecular diagnostics: a mini review. *J. Appl. Genet.*, 45(1): 3-15.
- Autoridade da Mobilidade e dos Transportes (AMT). Relatório Estatístico Serviços de Transporte em Táxi: A realidade atual e a evolução na última década. Observatório dos Mercados da Mobilidade, Preços e Estratégias Empresariais, abril de 2017.
- Baxi, S.N., Portnoy, J.M., Linnemann, D.L., Phipatanakul, W. (2016). Exposure and Health Effects of Fungi on Humans. *J Allergy Clin Immunol Pract.*, 4(3): 396–404.
- Bergwall, C., Stehn, B. (2002). Comparison of selective mycological agar media for the isolation and enumeration of xerophilic moulds and osmotolerant yeasts in granulated white sugar. *Zuckerindustrie*, 127: 259–264.
- Beveridge, T.J. (1999). Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles. *Journal of Bacteriology*, 181(6): 4725–4733
- Bosson-Rieutort, D., de Gaudemaris, R., Bicout, D.J. (2018). The spectrosome of occupational health problems. *PLOS ONE*, 13(1): e0190196.
- British Standards (BS) – BS EN 13098:2001: Workplace atmospheres, guidelines for measurement of airborne microorganisms and endotoxin. London, BS, 2001.

- Buttner, M., Stetzenbach, L. (1993). Monitoring airborne fungal spores in an experimental indoor environment to evaluate sampling methods and the effects of human activity on air sampling. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 219–226.
- Chmielowiec-Korzeniowska, A., Tymczyna, L., Drabik, A., Krzosek, L. (2016). Microbial contamination level of air in animal waste utilization plants. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 23: 54–58.
- Coppetti, M.V., Santurio, J.M., Cavalheiro, A.S., Alves, S.H., Ferreira, L. (2009). Comparison of different culture media for mycological evaluation of commercial pet food. *Acta Scientiae Veterinariae*, 37(4): 329-335.
- Cruz-Perez, P., Buttner, M.P., Stetzenbach, L.D. (2001). Detection and quantitation of *Aspergillus fumigatus* in pure culture using polymerase chain reaction. *Mol. Cell Probe*, 15: 81–88.
- De Conto, J., Gerges, S., Gonçalves, C.G.O. (2018). Hearing risk in motorcycle taxi drivers of a Southern Brazilian city. *Revista CEFAC*, 20(1): 29-36.
- De Hoog, G.S., Guarro, J., Gebé, J., Figueras, M.J. (2000). *Atlas of Clinical Fungi*, 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands (1-1126 ISBN: 9070351-43-9).
- Degois, J., Clerc, F., Simon, X., Bontemps, C., Leblond, P., Duquenne, F. (2017). First metagenomic survey of the microbial diversity in bioaerosol emitted in waste sorting plants. *Ann. Work Expo. Health*, 1–11.
- Douwes, J., Thorne, P., Pearce, N., Heederik, D. (2003). Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. *Ann. Occup. Hyg.*, 47 (3): 187–200.
- Eduard, W. (2009). Fungal spores: A critical review of the toxicological and epidemiological evidence as a basis for occupational exposure limit setting. *Critical Reviews in Toxicology*, 39(10): 799-864.
- Eduard, W., Douwes, J., Mehl, R., Heederik, D., Melbostad, E. (2001). Short term exposure to airborne microbial agents during farm work: exposure response relations with eye and respiratory symptoms. *Occup. Environ. Med.*, 58: 113–118.

Eduard, W., Halstensen, A. (2009). Quantitative exposure assessment of organic dust. *SJWEH*, 7: 30–35.

EPA, United States Environmental Protection Agency, 2017. About the National Exposure Research Laboratory (NERL). Available from: URL: (<http://www.epa.gov/nerlcwww/moldtech.htm>) (Accessed 19 June 2017).

Fogelmark, B., Sjostrand, M., Rylander, R. (1994). Pulmonary inflammation induced by repeated inhalations of  $\beta(1\rightarrow3)$ -D-glucan and endotoxin. *Int. J. Exp. Pathol.*, 75: 85–90.

Fung, F., Clark, R.F. (2004). Health Effects of Mycotoxins: A Toxicological Overview. *Journal of toxicology. Clinical toxicology*, 42(2): 217–234.

Golofit-Szymczak, M., Lawniczek-Walczyk, A., Górny, R.L. (2013). Exposure of ventilationsystem cleaning workers to harmful microbiological agents. *Medycyna Pracy*, 64(5): 613-623.

Górny, R.L., Dutkiewicz, J. (2002). Bacterial and Fungal Aerosols in Indoor Environment in Central and Eastern European Countries. *Ann Agric Environ Med*, 9: 17-23.

Górny, R.L., Harkawy, A., Ławniczek-Walczyk, A., Wlazło, A., Niesler, A., Golofit-Szymczak, M., Cyprowski, M. (2016). Exposure to culturable and total microbiota in cultural heritage conservation. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health*, 29: 255–275.

Goyer, N., Lavoie, J., Lazure, L., Marchand, G. (2001). *Bioaerosols in the workplace: Evaluations, Control and Prevention Guide*. Québec.

Hamada, N., Fujita, T. (2002). Effect of air-conditioner on fungal contamination. *Atmospheric Environment*, 36: 5443-5448.

Hayes, R.B., van Nieuwenhuize, J.P., Raatgever, J.W., et al. (1984). Aflatoxin exposures in the industrial setting: an epidemiological study of mortality. *Food Chem. Toxicol.*, 22: 39–43.

Heidelberg, J.F., Shahamat, M., Levin, M., Rahman, I., Stelma, G., Grim, C., Colwell, R.R. (1997). Effect of aerosolization on culturability and viability of gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 3585–3588.

Homna, Y., Hayashi, M., Hasegawa, K. (2009). Field measurement of airborne fungal spores of detached houses with insulated crawl space foundation in Japan. In *Healthy Buildings, 9th international conference & exhibition*, Syracuse, NY, September (13-17): 237.

IARC. (1993). Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monogr Eval Carcinogen Risks Hum*, 56: 1–599.

IARC. (2012). A review of human carcinogens. Vol. 100F: Chemical agents and related occupations. *IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, Lyon, France.

Jo, W.K., Lee, J.H. (2008). Airborne Fungal and Bacterial Levels Associated with the Use of Automobile Air Conditioners or Heaters, Room Air Conditioners, and Humidifiers. *Archives of Environmental & Occupational Health*, 63(3): 101-107.

Kampa, M., Castanas, E. (2008). Human health effects of air pollution. *Environmental pollution*, 151(2): 362-367.

Katsoyiannis, A., Birgul, A., Ratola, N., Cincinelli, A., Sweetman, A.J., Jones, K.C. (2012). Can car air filters be useful as a sampling medium for air pollution monitoring purposes? *Environmental International*, 48: 65-70.

Khan, A.A.H., Karuppayil, S.M. (2012). Fungal pollution of indoor environments and its management. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19: 405–426.

Kontoyiannis, D.P., (2012). Invasive mycoses: strategies for effective management. *Am. J. Med.*, 125: 25–38.

Levetin, E., Shaughnessy, R., Rogers, C.A., Scheir, R. (2001). Effectiveness of germicidal UV radiation for reducing fungal contamination within air-handling units. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 3712–3715.

Li, J., Li, M., Shen, F., Zou, Z., Yao, M., Wu, C. (2016). Characterization of biological aerosol exposure risks from automobile air conditioning system. *Environmental Science & Technology*, 47: 10660-10666.

Liu, C.M., Kachur, S., Dwan, M.G., Abraham, A.G., Aziz, M., Hsueh, P.R., Huang, Y.T., Busch, J.D., Lamit, L.J., Gehring, C.A., Keim, P., Price, L.B. (2012).

FungiQuant: a broad-coverage fungal quantitative real-time PCR assay. *BMC Microbiol.*, 12: 255.

Lugauskas, A., Jaskelevicius, B. (2007). Micromycetes hazardous to human health in buildings of various age and use in Vilnius. *Indoor and Built Environment*, 16(4): 358-370.

Luksamijarulkul, P., Sundhiyodhin, V., Luksamijarulkul, S., Kaewboonchoo, O. (2004). Microbial Air Quality in Mass Transport Buses and Work-Related Illness among Bus Drivers of Bangkok Mass Transit Authority. *J Med Assoc Thai*, 87(6): 697-703.

Luo, Y., Zhang, X., Gao, W. (2016). Characterization of Potential Pathogenic Cladosporium Exposure Risks from Heating, Ventilation and Air Conditioning (HVAC) in Two Cities, China. *Medical Mycology*, 2(3): 18.

Madsen, A.M., Alwan, T., Ørberg, A., Uhrbrand, K., Jørgensen, M.B. (2016). Waste workers' exposure to airborne fungal and bacterial species in the truck cab and during waste collection. *Ann Occup Hyg.*, 60(6): 651-68.

Madureira, J., Paciência, I., Rufo, J., Pereira, C., Teixeira, J.F.E. (2015). Assessment and determinants of airborne bacterial and fungal concentrations in different indoor environments: homes, child day-care centres, primary schools and elderly care centres. *Atmos. Environ.*, 109: 139–146.

Mahoney, N., Molyneux, R.J. (2010). A rapid analytical method for determination of aflatoxins in plant-derived dietary supplement and cosmetic oils. *J Agric Food Chem.*, 58: 4065-4070.

Mandal, J., Brandl, H. (2011). Bioaerosols in Indoor Environment - A Review with Special Reference to Residential and Occupational Location. *The Open Environmental & Biological Monitoring Journal*, 83-96.

Maus, R., Goppelsröder, A., Umhauer, H. (2001). Survival of bacterial and mold spores in air filter media. *Atmos. Environ.*, 35(1): 105–113.

Mayer, Z., Bagnara, A., FaÅNrber, P., Geisen, R. (2003). Quantification of the copy number of nor-1, a gene of the aflatoxin biosynthetic pathway by real-time

PCR, and its correlation to the cfu of *Aspergillus flavus* in foods. *Int J. Food Microbiol.*, 82: 143–151.

Meletiadis, J., Roilides, E. (2013). Rare invasive fungal infections: epidemiology, diagnosis and management. *Curr. Fungal Infect. Rep.*, 7: 351–360.

Mentese, S., Rad, A., Arisoy, M. (2009). Seasonal variation of bioaerosols in numerous indoor environments of a university campus. In *Healthy Buildings, 9th international conference & exhibition, Syracuse, NY, September, (13- 17)*: 331.

Miaśkiewicz-Peska, E. (2011). Effect of antimicrobial air filter treatment on bacterial survival. *Fibres Text. East Eur.*, 19: 73–77.

Miaskiewicz-Peska, E., Lebkowska, M. (2012). Comparison of aerosol and bioaerosol collection on air filters. *Aerobiologia*, 28: 185-193.

Morey, P.R., Hodgson, M.J., Sorenson, W.G., Kullman, G.K., Rhodes, W.W., Visvesvara, G.S. (1984). Environmental studies in moldy office buildings: Biological agents sources and preventive measures. *Ann Am Conf Gov Ind Hyg.*, 10: 21–34.

Must, A., Bloom, E., Sandberg, G. (2009). Determination of mycoflora and mycotoxins in concealed constructions and in the indoor occupational space. In *Healthy Buildings, 9th international conference & exhibition, Syracuse, NY, September, (13-17)*: 284.

Nowakowicz-Dębek, B., Pawlak, H., Wlazlo, L., Maksym, P., Kapica, J., Chmielowiec-Korzeniowska, A., Trawinska, B. (2017). Evaluating bioaerosol exposure among bus drivers in the public transport sector. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 14(11): 169-172.

Oppliger, A., (2014). Advancing the science of bioaerosol exposure assessment. *Ann. Occup. Hyg.*, 58, 661–663.

Oppliger, A., Duquenne, P. (2016). Highly Contaminated Workplaces. *Environmental Mycology in Public Health*, 8: 79-105.

Pastuszka, J.S., Kyaw Tha Paw, U., Lis, D.O., Wlazlo, A., Ulfig, K. (2000). Bacterial and fungal aerosol in indoor environment in Upper Silesia, Poland. *Atmos Environ.*, 34: 3833–3842.

- Perez, H.R., Zimmerman, N.J., Berhane, Z. (2006). Evaluation of culturable particle load on HVAC filters before and after remediation: a pilot study. *Indoor and Built Environment*, 15(6): 525-533.
- Pohanka, M. (2014). Spectrophotometric assay of aflatoxin B1 using acetylcholinesterase immobilized on standard microplates. *Analytical Letters*, 46: 1306-1315.
- Popendorf, W., Donham, K.J., Easton, D.N. et al. (1985). A synopsis of agricultural respiratory hazards. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 46: 154–61.
- Prakash, N.K.U., Bhuvaneshwari, S., Kumar, R., Lankesh, S., Rupesh, K. (2014). A study on the prevalence of indoor mycoflora in air-conditioned buses. *British Microbiology Research Journal*, 4(3): 282-292.
- Prussin, A., Marr, L.C. (2013). Sources of airborne microorganisms in the built environment. *Microbiome*, 22(3); 78.
- Ramos, C., Viegas, C., Cabo Verde, S., Wolterbeek, H.T., Almeida, M.A. (2016). Characterizing the fungal and bacterial microflora and concentrations in fitness centres. *Indoor Built Environ.*, 6: 1–11.
- Ramos, J.L., Gallegos, M.T., Marqués, S., Ramos-González, M.I., Espinosa-Urgel, M., Segura, A. (2001). Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors. *Current Opinion in Microbiology*, 4: 166–171.
- Ren, P., Jankun, T.M., Belanger, K., Bracken, M.B., Leaderer, B.P. (2001). The relation between fungal propagules in indoor air and home characteristics. *Allergy*, 56: 419–424.
- Rylander, R., Jacobs, R.R. (1997). Endotoxins in the environment: a criteria document. *Int. J. Occup. Environ. Health.*, 3: 1–48.
- Samson, R., Hoekstra, E., Frisvad, J. (2000). *Introduction to Food and Airborne Fungi*, 6th ed. Centraal bureau voor Schimmelcultures, Utrecht, pp. 1–282 (ASM Press, United StatesStates). (ISBN: 9070351420).
- Sánchez, M., Muñoz, M., González, A. (2009). Fungal indoor air characterization in an old and in a modern building of Madrid, Spain. In *Healthy Buildings*, 9th international conference & exhibition, Syracuse, NY, September, (13- 17): 706.

- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., Johne, R. (2012). PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.*, 113: 1014–1026.
- Simmons, R.B., Rose, L.J., Crow, S.A., Ahearn, D.G. (1999). The Occurrence and Persistence of Mixed Biofilms in Automobile Air Conditioning Systems. *Current Microbiology*, 39: 141-145.
- Su, H.J., Chen, H.L., Huang, C.F., Lin, C.Y., Li, F.C., Milton, D.K. (2002). Airborne fungi and endotoxin concentrations in different areas within textile plants in Taiwan: a 3–year study. *Environ. Res.*, 89: 58–65.
- Subbarao, P., Mandhane, P.J., Sears, M.R. (2009). Asthma:epidemiology, etiology and risk factors. *CMAJ*, 181 (9): 181–190.
- Szymczak, M., Cyprowski, M., 2016. Exposure to culturable and total microbiota in cultural heritage conservation. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 29, 255–275. <http://dx.doi.org/10.13075/ijomeh.1896.00630>.
- Tang, J.W. (2009). The effect of environmental parameters on the survival of airborne infectious agents. *Journal of the Royal Society Interface*, 1-10.
- United States Environmental Protection Agency (EPA). The Inside Story: A guide to indoor air quality. Last updated on April 27, 2018.
- Varga, J., Baranyi, N., Chandrasekaran, M., Vágvölgyi, C., Kocsubé, S. (2015). Mycotoxin producers in the *Aspergillus* genus: an update. *Acta Biol. Szeged.*, 59: 151–167.
- Vermeulen, E., Maertens, J., De Bel, A., Nulens, A., Boelens, J., Surmont, I., Mertens, A., Boel, A., Lagrou, K. (2015). Nationwide surveillance of azole resistance in aspergillus diseases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 59(8): 4569–4576.
- Vidal, A., Mengelers, M., Yang, S., De Saeger, De Boevre, M. (2018). Mycotoxin Biomarkers of Exposure: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(5): 1127-1155.
- Viegas, C., Faria, T., Aranha, L., Carolino, E., Quintal Gomes, A., Viegas, S., (2017b). *Aspergillus* prevalence in different occupational settings. *J. Occup. Environ. Hyg.*, 14 (10): 771–785.

- Viegas, C., Faria, T., Carolino, E., Sabino, R., Quintal Gomes, A., Viegas, S. (2016a). Occupational exposure to fungi and particles in animal feed industry. *Med.Pr.*, 67(2): 143–154.
- Viegas, C., Faria, T., dos Santos, M. (2015). Fungal burden in waste industry: an occupational risk to be solved. *Environ Monit Assess.*, 187(4): 199.
- Viegas, C., Faria, T., dos Santos, M., Carolino, E., Sabino, R., Gomes, A.Q., Viegas, S. (2016b). Slaughterhouses fungal burden assessment: a contribution for the Pursuit of A Better Assessment Strategy. *Int J. Environ. Res. Public Health*, 13: 297.
- Viegas, C., Faria, T., Pacifico, C., dos Santos, M., Monteiro, A., Lança, C., Carolino, E., Viegas, S., Cabo Verde, S. (2017c). Microbiota and particulate matter assessment in portuguese optical shops providing contact lenses services. *Healthcare*, 5: 24.
- Viegas, C., Gomes, A.Q., Abegão, J., Sabino, R., Graça, T., Viegas, S. (2014). Assessment of fungal contamination in waste sorting and incineration — case study in Portugal. *J. Toxicol. Environ. Health*, 77(1–3): 57–68.
- Viegas, C., Monteiro, A., dos Santos, M., Faria, T., Caetano, L.A., Carolino, E., Gomes, A.Q., Marchand, G., Lacombe, N., Viegas, S. (2018b). Filters from taxis air conditioning system: A tool to characterize driver's occupational exposure to bioburden? *Environmental Research*, 164: 522-529.
- Viegas, C., Moreira, R., Faria, T., Caetano, L. A., Carolino, E., Gomes, A. Q., Viegas, S. (2018a). Aspergillus prevalence in air conditioning filters from vehicles: taxis for patient transportation, forklifts, and personal vehicles. *Archives of Environmental & Occupational Health*, 1-9.
- Viegas, C., Ramalho I., Alves M., Faria T., Aranha, C.L., Viegas S. (2017a). Electrostatic dust cloth – A new sampling method for occupational exposure to bioaerosols in: *Proceedings of the International Symposium on Occupational Safety and Hygiene SHO2017*, Arezes, P. et al., Portuguese Society of Occupational Safety

Vonberg, R.P., Gastmeier, P., Kenneweg, B., Holdack-Janssen, H., Sohr, D., Chaberny, I.F. (2010). The microbiological quality of air improves when using air conditioning systems in cars. *BMC Infectious Diseases*, 10: 146-152.

Walsh, T.J., Anaissie, E.J., Denning, D.W., Herbetch, R., Kontoyiannis, D.P., Marr, V.A., Segal, B.H., Steinbach, W.J., Stevens, D.A., van Burik, J.A., Wingard, J.R., Patterson, T.F. (2008). Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the infectious diseases society of America. *Clin. Infect. Dis.*, 46(3): 327–360.

Wu, P.C., Su, H.J.J., Ho, H.M. (2000). A Comparison of Sampling Media for Environmental Viable Fungi Collected in a Hospital Environment. *Environmental Research Section A*, 82: 253-257.

## **8. Apêndice**

Artigo Científico – “*Filters from taxis air conditioning system: A tool to characterize driver's occupational exposure to bioburden?*”

Publicado em *Environmental Research*, 2018.



## Filters from taxis air conditioning system: A tool to characterize driver's occupational exposure to bioburden?



Carla Viegas<sup>a,b,\*</sup>, Ana Monteiro<sup>a</sup>, Mateus dos Santos<sup>a</sup>, Tiago Faria<sup>a,c</sup>, Liliana Aranha Caetano<sup>a,d</sup>, Elisabete Carolino<sup>a</sup>, Anita Quintal Gomes<sup>a,e</sup>, Geneviève Marchand<sup>f</sup>, Nancy Lacombe<sup>f</sup>, Susana Viegas<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> GIAS, ESTeSL - Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa, Lisbon, Portugal

<sup>b</sup> Centro de Investigação em Saúde Pública, Escola Nacional de Saúde Pública, Universidade NOVA de Lisboa, Portugal

<sup>c</sup> Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, E.N. 10 ao km 139,7, 2695-066 Bobadela LRS, Portugal

<sup>d</sup> Research Institute for Medicines (iMed.Ulisboa), Faculty of Pharmacy, University of Lisbon, Lisbon, Portugal

<sup>e</sup> University of Lisbon Institute of Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Lisbon, Portugal

<sup>f</sup> Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et sécurité du travail, Montréal, Canada

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Taxis drivers

Occupational exposure

Bioburden

Filters from air conditioning system

*Aspergillus* sp.

### ABSTRACT

Bioburden proliferation in filters from air conditioning systems of taxis represents a possible source of occupational exposure. The aim of this study was to determine the occurrence of fungi and bacteria in filters from the air conditioning system of taxis used for patient transportation and to assess the exposure of drivers to bioburden. Filters from the air conditioning systems of 19 taxis and 28 personal vehicles (used as controls) operating in three Portuguese cities including the capital Lisbon, were collected during the winter season. The occurrence and significance of bioburden detected in the different vehicles are reported and discussed in terms of colony-forming units (CFU) per 1 m<sup>2</sup> of filter area and by the identification of the most frequently detected fungal isolates based on morphology. Azole-resistant mycobiota, fungal biomass, and molecular detection of *Aspergillus* species/strains were also determined. Bacterial growth was more prevalent in taxis (63.2%) than in personal vehicles (26.3%), whereas fungal growth was more prevalent in personal vehicles (53.6%) than in taxis (21.1–31.6%). Seven different azole-resistant species were identified in this study in 42.1% taxi filters. Levels of fungal biomass were above the detection limit in 63% taxi filters and in 75% personal vehicle filters. No toxicogenic species were detected by molecular analysis in the assessed filters. The results obtained show that bioburden proliferation occurs widely in filters from the air conditioning systems of taxis, including the proliferation of azole-resistant fungal species, suggesting that filters should be replaced more frequently. The use of culture based-methods and molecular tools combined enabled an improved risk characterization in this setting.

### 1. Introduction

The use of taxis for non-emergency patient transportation is important as it allows ambulances, and other specially equipped vehicles, to be available for patients that require special medical care during transport (Syed et al., 2013). In addition, compared to other public transportation systems, the use of taxis is more comfortable for patients, while preventing healthy passengers to share a closed area with potentially infected ones. However, the taxi cabinet is a restricted and often shared space. Several reports indicate that both taxi drivers and passengers face a high risk of exposure to a mixture of biological and chemical agents (Jo and Lee, 2008; Knibbs and Morawska, 2012; Kumar et al., 1990; Brodzik et al., 2014; Stephenson et al., 2014; Wu et al.,

2010) with possible damage to health.

Bioaerosols are usually defined as aerosolized particles of biological origin. Examples of bioaerosols in occupational environments include fungal and bacterial spores/cells, fungal hyphae, pollen, viruses and amoebae, and also their metabolites (Eduard et al., 2012; Oppliger, 2014). Different adverse health effects due to the exposure to bioaerosols in occupational environments have been reported, including infectious diseases, acute toxic effects, allergies and cancer. Respiratory symptoms and lung function impairment are the most broadly studied and possibly among the most important bioaerosol-associated health effects (Rylander and Jacobs, 1997; Subbarao et al., 2009; Fogelmark et al., 1994; Eduard et al., 2001; Douwes et al., 2003). The microbiological contamination of air inside a vehicle may contribute to

\* Corresponding author at: GIAS, ESTeSL - Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa, Lisbon, Portugal.  
E-mail address: [carla.viegas@estesl.ipl.pt](mailto:carla.viegas@estesl.ipl.pt) (C. Viegas).

diverse symptoms and diseases in humans (Srikanth et al., 2008). Of note, bioaerosols present in the air of taxis cabinet can be especially hazardous to immunocompromised individuals (Ross et al., 2000; Prakash et al., 2014).

In order to protect vehicle occupants, filters from the air conditioning system in vehicles are intended to retain airborne bioburden. However, under favorable conditions, such as long periods of high relative humidity (> 80% R.H.), the bioburden proliferation on air filters and consequent release in the air stream to the vehicle cabinet represents a potential source of exposure to bioaerosols, especially if part of the respirable fraction (< 1.1 µm). Moreover, when the air conditioning system is turned on, the air stream passing through the filtration system could re-aerosolize the bioburden and consequently carry it into the vehicle interior (Li et al., 2016) increasing the exposure. Greater exposure should be expected for taxi drivers as taxis are their workplace, with regular work shifts of 8 h a day 5 days a week accounting for considerably more time spent inside the vehicles than the passengers (O'Donoghue et al., 2007; Som et al., 2007; Jo and Yu, 2001; Nowakowicz-Dębek et al., 2017). Occupational exposure to bioaerosols and consequent health problems suffered by taxi drivers during patient transportation should be, therefore, acknowledged and prevented (Nowakowicz-Dębek et al., 2017; Walser et al., 2015).

The assessment of occupational exposure to bioaerosols by active air sampling has been described in vehicles of different types and uses, mainly in buses (Prakash et al., 2014; Nowakowicz-Dębek et al., 2017; Luksamijarulkul et al., 2004, 2005; Wang, 2011; Wang et al., 2013) and personal vehicles (Jo and Lee, 2008; Vonberg et al., 2010). Recently, we have witnessed an increased awareness about the potential of passive sampling methods to overcome the limitations of active methods (Viegas et al., 2015, 2017b), such as the reports on the use of surface swabs in personal vehicles (Stephenson et al., 2014) and buses (Prakash et al., 2014), settled culture media plates (Kumar et al., 1990), and air conditioning filters from personal vehicles (Li et al., 2016; Simmons et al., 1999; Diekmann et al., 2013). An important difference between active and passive sampling methods is that air samples collected by active methods reflect the load from a short period of time (mostly minutes), whereas passive methods can collect contamination from a larger period of time (weeks to several months) (Viegas et al., 2015, 2017b). The same trend has been applied in indoor air quality (IAQ) assessments to recover the bioburden from heating ventilation and air conditioning (HVAC) filters in buildings (Pang and Mu, 2007; Goyal et al., 2011; Noris et al., 2011). However, limited attention has been given to occupational exposure assessments to bioaerosols.

The complementarity of culture based-methods and molecular tools for the characterization of fungal burden in different occupational environments has been reported (Viegas et al., 2016b, 2016c; Degois et al., 2017) as being necessary for a complete and accurate risk characterization in workplaces (Viegas et al., 2017a). A recent work from our group describes the use of air filters to characterize the occupational exposure to bioburden of workers in fork lifters (Viegas et al., 2017b). Moreover, the increased occurrence of opportunistic fungal infections in immunocompromised patients, and the emergence of antifungal resistance, namely of *Aspergillus* sp., both in the clinical and in the environment (Fairlamb et al., 2016; Nature Microbiology, 2017) emphasize the importance of addressing the prevalence of antifungal resistance and the molecular detection of target species in the assessments of occupational exposure to fungal burden (Viegas et al., 2016a, 2017a).

Thus, although the assessment of occupational exposure to chemical agents in taxis drivers has been reported (Pang and Mu, 2007; Knibbs et al., 2010; Janicka et al., 2011; Lewné et al., 2006; Son et al., 2004; Miller-Schulze et al., 2010), to our knowledge, this is the first study that evaluates the occupational exposure of taxi drivers to bioburden through the evaluation of filters from the air conditioning system of taxis used for patient transportation, by culture-based methods, molecular tools, and screening of azole-resistance.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Filters collection and characteristics

Nineteen taxis used for patients' transportation and 28 personal vehicles (used as controls) were prospected in three different cities around Lisbon (Lisbon, Loures and Setúbal) between January and March 2017 (winter season, temperatures ranging 10 °C). Sampling was performed by removing the filter from the air conditioning system in each vehicle. Filters were cut into three pieces of 2 cm<sup>2</sup> each (1.4 × 1.4 cm) and kept refrigerated at 4 °C before analysis.

Taxi filters were composed by activated charcoal and belonged to category 2 (typically ≥ 3.0 µm pores), in compliance with the protection requirements (EN 15,695) that ensure protection against dust inside the cabinet. Filters were used for a maximum of 15,000 kms, according to the preventive maintenance program in the taxi company. The ventilation provided for each taxi cabinet was one cabinet volume/minute. The criteria for filter replacement in the air conditioning system was the frequency established by the car brand to avoid filter blocking, as established in the preventive maintenance program and supervised by the taxis company.

Personal vehicle filters presented the same technical characteristics and replacement criteria than taxi filters, except for additional control measures to the preventive maintenance program (specific to each vehicle brand and dependent on the owner).

Additionally, one filter was obtained with the same technical characteristics but without prior use.

### 2.2. Filter sampling

One piece of filter was washed with 10 mL of 0.1% Tween™ 80 saline solution (NaCl 0.9%) for 30 min at 250 rpm on an orbital laboratory shaker (Edmund Bühler SM-30, Hechingen, Germany) (Viegas et al., 2017b), diluted and seeded on eight media: four for microbial screening (2% malt extract agar (MEA) supplemented with 0.05 g/L chloramphenicol; dichloran-glycerol agar (DG18); tryptic soy agar (TSA) supplemented with 0.2% nystatin; violet red bile agar (VRBA)); and four for azole-resistance screening (one Sabouraud agar; and three Sabouraud agars supplemented, respectively, with 4 mg/L itraconazole, 1 mg/L voriconazole, and 0.5 mg/L posaconazole (Arendrup et al., 2013)). MEA, DG18 and Sabouraud media supplemented with azole antifungals were incubated at 27 °C for 5–7 days, and TSA and VRBA media were incubated at 30 °C and 35 °C for 7 days, respectively.

For fungal biomass assay, a second filter piece was extracted with 5 mL of PCR grade water for 10 min at 2500 rpm on a Maxi Vortex orbital shaker. The washed suspension was centrifuged at 4200 ×g for 20 min; the supernatant was discarded except for 200 µL in which the cell pellet was re-suspended. The DNA was extracted using the ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep Kit (Zymo Research, Irvine, USA) according to the manufacturer's instructions.

For molecular detection of *Aspergillus* sections, a third filter piece followed the same extraction procedure. Ten milliliters of the washed suspension were centrifuged at 3500 ×g for 30 min; the supernatant was discarded except for 200 µL in which the cell pellet was re-suspended. The DNA extraction was performed as described.

### 2.3. Bioburden characterization

Fungal and bacterial densities (colony forming units (CFU) per 1 m<sup>2</sup> of filter area) were determined on the different culture media. Fungal species were identified microscopically using tease mount or Scotch tape mount and lactophenol cotton blue mount procedures. Morphological identification was achieved through macro and microscopic characteristics, as noted by De Hoog et al. (2000).

**Table 1**

Probe and primers used in the universal qPCR for the amplification of molds DNA from the filter (Adopted from Liu et al., 2016).

FungiQuant-F	GGR AAA CTC ACC AGG TCC AG
FungiQuant-R	GSW CTA TCC CCA KCA CGA
FungiQuant-Probe	TGG TGC ATG GCC GTT

R = A or G (puRine); W = A or T (Weak – 2H bonds); K = G or T (Keto).

#### 2.4. Fungal biomass assay

For each batch of extraction, a control was performed using only PCR water. The primers and probes of the amplification system used are shown in Table 1. The volume of the qPCR was 25  $\mu$ L. Each master-mix contained 2.5 units of HotStarTaq® mix (Qiagen, Limburg, Netherlands); 1.25  $\mu$ M of each primer (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA); 0.375  $\mu$ M of the probe; 2 mM of MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); 6.85  $\mu$ L of sterile PCR water and 2  $\mu$ L of DNA. A Master Cycler Realplex2 (Eppendorf, Hamburg, Germany) was used for amplification following this program: 15 min at 95 °C, followed by forty 15-s cycles at 94 °C; 30 s at 55.5 °C; and 15 s at 72 °C. In each 96-well plate, a standard curve was incorporated. The standard curve was made by serial dilutions of DNA coming from a suspension of *P. digitatum*. The DNA was extracted from a spore suspension to which the concentration was previously determined with a hemacytometer. The relation between the Ct obtained by the qPCR and the number of spores in the suspensions was obtained directly from that standard curve. The concentrations of the standard curve varied from 3  $\times$  10<sup>6</sup> to 30 spores/mL. The correlation coefficients of the standard curves needed to be higher than 0.96 and the PCR reaction efficiency needed to be better than 80%. All amplifications were duplicated and their average calculated. Negative and positive controls were added in all the plates. For the positive control, the 2  $\mu$ L of sample DNA was replaced by DNA from *P. digitatum*. For the negative control, the DNA was replaced by PCR grade water. All results are reported in spores per filter gram.

#### 2.5. Molecular detection of specific *Aspergillus* sections

Molecular identification of the different fungal species/strains was achieved by Real Time PCR (qPCR) using the Via 7 Real-time PCR System (Applied Biosystems). Reactions included 1  $\times$  iQ Supermix (Bio-Rad), 0.5  $\mu$ M of each primer (Table 2), and 0.375  $\mu$ M of TaqMan probe in a total volume of 10  $\mu$ L. Amplification followed a three-step PCR: 50 cycles with denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 52 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 30 s. A non-template control was used in

every PCR reaction. As positive controls of amplification, DNA samples were obtained from reference strains from the Mycology Laboratory from the National Institute of Health Doctor Ricardo Jorge (INSA).

#### 2.6. Statistical analysis

The SPSS statistical software for Windows was used for data analysis. The results were considered significant at the significance level of 5%. The Shapiro-Wilk test was used to test the normality of the data. Frequency analysis (n; %), and the calculation of the minimum and maximum, were performed for the qualitative and quantitative data, respectively. Since the assumption of normality was not verified, the Mann-Whitney test was used to compare fungal load (MEA and DG18) and bacterial load (TSA), and the Spearman correlation coefficient was used to study the relationship between filter weight, fungal load, fungal biomass and bacterial load.

### 3. Results

#### 3.1. Bioburden characterization

A total of four taxi filters of the 19 studied (21.1%) presented fungal growth in MEA, against six filters (31.6%) in DG18, with fungal contamination up to 1000 CFU/m<sup>2</sup> on MEA and 3000 CFU/m<sup>2</sup> on DG18. Fungal growth was more prevalent in personal vehicles (15 out of the 28 filters studied (53.6%) in MEA and DG18), with fungal contamination up to 68,500 CFU/m<sup>2</sup> on MEA and 5500 CFU/m<sup>2</sup> on DG18.

*Cladosporium* sp. was the most prevalent fungal species from taxi filters in MEA (71.4%) and in DG18 (76.2%), followed by *Penicillium* sp. and *Aspergillus* section *Candidi* (Table 3). A more diversified mycobiota was found on filters from personal vehicles, with seven fungal species identified on MEA, and four on DG18. *Cladosporium* sp. was the most prevalent fungal species from personal vehicles on MEA and DG18 (85.4% and 72.7%, respectively), with *Penicillium* sp., *Acremonium* sp., *Chrysosporium* sp., *Aureobasidium* sp., *Aspergillus* section *Candidi*, and *Aspergillus* section *Nigri* also identified on MEA, whereas only *Penicillium* sp., *Aureobasidium* sp. and *Aspergillus* section *Versicolores* were identified on DG18 (Table 3).

*Aspergillus* sp. were isolated in significant percentages in DG18 media, with 14.3% in taxis and 15.6% in personal vehicles, and it ranked second among the fungal genus most commonly found in taxis (*Aspergillus* section *Candidi*) and in personal vehicles (*Aspergillus* section *Versicolores*).

As for total bacteria counts (TSA medium), 12 out of 19 taxi filters (63.2%) showed bacterial contamination ranging from 0 to 47,000

**Table 2**

Sequence of primers and TaqMan probes used for Real Time PCR.

<i>Aspergillus</i> sections targeted	Sequences	Reference
<b><i>Flavi</i> (Toxigenic Strains)</b>		
Forward Primer	5'-GTCCAAGCAACAGGCCAAGT-3'	
Reverse Primer	5'-TCGTGCATGTTGGTATGGT-3'	(Mayer et al., 2003)
Probe	5'-TGCTCTGATCGGCCGCCG-3'	
<b><i>Fumigati</i></b>		
Forward Primer	5'-CGCGTCCGGTCTCTCG-3'	
Reverse Primer	5'-TTAGAAAAATAAAGTTGGGTGTCGG-3'	(Cruz-Perez et al., 2001)
Probe	5'-TGTCACCTGCTCTGATAGGCCG-3'	
<b><i>Circumdati</i></b>		
Forward Primer	5'-CGGGTCTAATGCAGCTCCAA-3'	
Reverse Primer	5'-CGGGCACC AATCCTTTCA-3'	(Viegas et al., 2017a)
Probe	5'-CGTCAATAAGCGCTTTT-3'	
<b><i>Versicolores</i></b>		
Forward Primer	5' – CGGCGGGGAGCCCT-3'	
Reverse Primer	5' – CCATTGTTGAAAGTTTTGACTGATcTTA-3'	(EPA, 2017)
Probe	5' – AGACTGCATCACTCTCAGGCATGAAGTTCAG-3'	

**Table 3**  
Fungal distribution on filters from taxis and controls (MEA and DG18 media).

Fungal species - Taxis	MEA (%; n)	DG18 (%; n)
<i>Cladosporium</i> sp.	71.4; 2500	76.2; 8000
<i>Penicillium</i> sp.	28.6; 1000	9.5; 1000
<i>Aspergillus</i> section <i>Candidi</i>	0; 0	14.3; 1500
Fungal species - Controls	MEA (%; n)	DG18 (%; n)
<i>Cladosporium</i> sp.	85.4; 82,000	72.7; 28,000
<i>Penicillium</i> sp.	13.0; 12,500	9.1; 3500
<i>Acremonium</i> sp.	8.8; 15,000	0; 0
<i>Chrysosporium</i> sp.	1.5; 2500	0; 0
<i>Aureobasidium</i> sp.	.5; 500	2.6; 1000
<i>Aspergillus</i> section <i>Candidi</i>	0.5; 500	0; 0
<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	0.5; 500	0; 0
<i>Aspergillus</i> section <i>Versicolores</i>	0; 0	15.6; 6000

n – isolates number.

CFU/m<sup>2</sup>, against five out of 19 (26.3%) personal vehicle filters ranging from 0 to 17,000 CFU/m<sup>2</sup>. No contamination by gram negative bacteria was observed in the analyzed filters.

No microbial growth was observed in the filter without prior use in all media.

### 3.2. Fungal biomass

Fungal biomass levels were below the detection limit (600 Spore/gr of filter) in seven out of 19 taxi filters (37%) and seven out of 28 control filters (25%). In the remaining filters, fungal biomass varied from  $6.43 \times 10^4$  to  $7.75 \times 10^6$  spores/gr in taxis, being slightly higher in the controls group ( $2.95 \times 10^5$  to  $4.42 \times 10^7$  spores/gr) (Table 4).

Fungal load on MEA was significantly higher in personal vehicles (control group) in comparison to taxis group ( $U = 175$ ,  $p = 0.025$ ) (Table 5). A significant positive and weak intensity correlation was found between fungal counts on MEA and fungal counts on DG18 ( $r_s = 0.333$ ,  $p = 0.022$ ), meaning that higher counts on MEA are related to higher load on DG18.

A significant negative correlation was found between fungal biomass and bacterial counts on TSA ( $r_s = -0.369$ ,  $p = 0.011$ ), meaning that higher concentrations of fungal biomass are related to lower total bacterial counts.

### 3.3. Molecular detection of specific *Aspergillus* sections

Molecular detection, by real time PCR, of the target fungal species/strains from *Aspergillus* genus was negative for all taxis and control filters analyzed.

### 3.4. Azole-resistant fungal species

Azole-resistant species were determined based on visible growth on Sabouraud agar media supplemented with 4 mg/L itraconazole, 1 mg/L voriconazole, or 0.5 mg/L posaconazole (Arendrup et al., 2013). Seven fungal species were identified on azole-supplemented media in eight out of the 19 studied (42.1%) filter samples from taxis, with azole-resistant fungal burden ranging from 0 to 3000 CFU (Table 6). *Cladosporium* sp. and *Penicillium* sp. were the most prevalent among isolates not susceptible to 1 mg/L voriconazole (3000 CFU and 2500 CFU, respectively), followed by *Alternaria* sp. and *Chrysosporium* sp. In filters from taxis, 1500 CFU of *Cladosporium* sp. and 500 CFU of *Aspergillus* section *Candidi* were not susceptible to 4 mg/L itraconazole, and 500 CFU of *Penicillium* sp. were not susceptible to 0.5 mg/L posaconazole.

Fungal growth in azole-supplemented media was higher (0–1750,000 CFU) and more prevalent (18 out of 28 filters; 64.3%) in personal vehicles than in taxis (Table 6). *Chrysonilia sitophila* was the most prevalent (1,750,000 CFU) in 1 mg/L voriconazole media,

**Table 4**  
Fungal burden characterization through culture based-methods and fungal biomass assay.

Taxis filters	Fungal load (CFU/m <sup>2</sup> )		Fungal biomass (Spore/gr of filter)
	MEA	DG18	
1	500	0	$< 6.00 \times 10^2$
2	0	0	$2.49 \times 10^5$
3	0	500	$6.15 \times 10^5$
4	0	0	$3.65 \times 10^5$
5	0	0	$< 6.00 \times 10^2$
6	0	0	$2.60 \times 10^5$
7	0	0	$< 6.00 \times 10^2$
8	0	0	$2.57 \times 10^5$
9	500	1000	$3.67 \times 10^5$
10	0	0	$1.55 \times 10^6$
11	0	0	$< 6.00 \times 10^2$
12	0	1000	$2.08 \times 10^5$
13	0	500	$< 6.00 \times 10^2$
14	1000	1000	$< 6.00 \times 10^2$
15	0	0	$1.61 \times 10^5$
16	1500	6500	$3.22 \times 10^4$
17	0	0	$< 6.00 \times 10^2$
18	0	0	$4.48 \times 10^5$
19	0	0	$4.08 \times 10^4$
Controls Filters	Fungal Load (CFU/m <sup>2</sup> )		Fungal Biomass (Spore/gr of filter)
	MEA	DG18	
1	0	0	$5.92 \times 10^4$
2	3000	1000	$< 6.00 \times 10^2$
3	0	1500	$3.63 \times 10^5$
4	0	500	$< 6.00 \times 10^2$
5	500	0	$3.71 \times 10^6$
6	1500	0	$< 6.00 \times 10^2$
7	500	0	$1.35 \times 10^6$
8	0	0	$9.60 \times 10^5$
9	11,000	5500	$8.66 \times 10^4$
10	500	0	$< 6.00 \times 10^2$
11	0	0	$< 6.00 \times 10^2$
12	0	0	$< 6.00 \times 10^2$
13	0	500	$2.39 \times 10^6$
14	0	500	$3.93 \times 10^5$
15	0	0	$2.38 \times 10^5$
16	0	500	$4.26 \times 10^5$
17	1500	0	$3.67 \times 10^5$
18	0	1000	$3.06 \times 10^6$
19	5000	4000	$8.83 \times 10^6$
20	500	4000	$2.43 \times 10^5$
21	500	500	$5.15 \times 10^4$
22	68,500	500	$7.10 \times 10^4$
23	500	0	$5.90 \times 10^4$
24	500	0	$< 6.00 \times 10^2$
25	500	0	$1.03 \times 10^6$
26	0	500	$6.04 \times 10^6$
27	0	500	$2.46 \times 10^6$
28	1500	1000	$1.64 \times 10^6$

followed by *Cladosporium* sp. (49,000 CFU), *Alternaria* sp. (33,500 CFU), and *Penicillium* sp. (11,000 CFU).

Two species were identified, either in taxis or personal vehicles, in more than one azole-supplemented media: *Penicillium* sp. resistant to 0.5 mg/L posaconazole, and to 1 mg/L voriconazole; *Cladosporium* sp. resistant to 0.5 mg/L posaconazole, to 1 mg/L voriconazole, and to 4 mg/L itraconazole. Of note, *Aspergillus* section *Candidi* resistant to 4 mg/L itraconazole was found both in taxis and personal vehicles (Table 6).

## 4. Discussion

This study reports the occurrence of high levels of fungi and bacteria in filters from the air conditioning system of taxis, used for patient transportation, in Lisbon surroundings and shows the presence of azole-resistant fungal species. The fact that several passengers enter the taxi cabinet during a day can increase exposure to the microbiota as

**Table 5**  
Results of the Mann-Whitney test for the comparison analyses between the taxis group and the control group.

	Group	N	Ranks		Test Statistics	
			Mean rank	Sum of ranks	Mann-Whitney U	P
<b>Fungal load (MEA)</b> (CFU.m <sup>-2</sup> )	Taxi	19	19,21	36,500	175,000	0025*
	Control	28	27,25	76,300		
	Total	47				
<b>Fungal load (DG18)</b> (CFU.m <sup>-2</sup> )	Taxi	19	21,26	40,400	214,000	0213
	Control	28	25,86	72,400		
	Total	47				
<b>Bacterial load (TSA)</b> (CFU.m <sup>-2</sup> )	Taxi	19	26,00	49,400	228,000	0382
	Control	28	22,64	63,400		
	Total	47				
<b>Filter weight (gr)</b>	Taxi	19	22,47	42,700	237,000	0530
	Control	28	25,04	70,100		
	Total	47				
<b>Fungal biomass (Spore/gr of filter)</b>	Taxi	19	22,58	42,900	239,000	0553
	Control	28	24,96	69,900		
	Total	47				

\* Significant differences at the 5% significance level.

customers carry the bioburden in hair and clothes into the vehicle (Goyer et al., 2001; Ramos et al., 2016; Madureira et al., 2015; Buttner and Stetzenbach, 1993; Chmielowiec-Korzeniowska et al., 2016). The impact of ventilation and air-conditioning systems on the modification of bioburden composition indoors (Prussin and Marr, 2013) and inside vehicles has also been described (Prussin and Marr, 2013; Miaškiewicz-Peska, 2011; Hamada and Fujita, 2002; Maus et al., 2001), mainly referring to lack of preventive maintenance (Miaškiewicz-Peska, 2011; Hamada and Fujita, 2002).

In this study, the bacterial contamination in filters from air conditioning system was more prevalent in taxis than in control vehicles for personal use. This can be explained by the higher occupancy and human rotation in taxis, coupled with the air conditioning ability to reaerosolize the bioburden from floor mats, textile seats and occupants' clothes (Li et al., 2016; Su et al., 2002), thus, boosting the occupational exposure to bioburden. The inexistence of gram negative bacteria in both groups (taxis and personal vehicles) can be explained by the more fragile cell wall that does not tolerate the dehydration suffered due to the air conditioning system (Goyer et al., 2001).

Among fungal bioburden, different results were obtained for fungal load and mycobiota diversity with MEA and DG18 media. The majority of the *Aspergillus* sp. isolates, for example, were only identified in DG18 - *Aspergillus* section *Candidi* in taxis, and *Aspergillus* section *Versicolores*

in personal vehicles. These results corroborate the need to use DG18 media besides MEA, even if fungal load in MEA and in DG18 was positively correlated. In fact, DG18 restricts the colony size of fast-growing genera (Bergwall and Stehn, 2002), thus, it enables the fungal growth of different species and a more complete characterization of fungal burden in highly contaminated matrices (Viegas et al., 2017b).

Noteworthy, fungal genera with toxigenic potential (Varga et al., 2015) were identified in filters from both taxis and personal vehicles: *Penicillium* sp. and *Aspergillus* sections *Candidi*, *Nigri* and *Versicolores*. These results corroborate the most common scenario, also found in other occupational environments, of co-exposure through filters from air conditioning systems to more than one risk factor – bioburden and metabolites (e.g., mycotoxins) (Viegas et al., 2017b).

Culture based-methods are of the most importance to identify viable organisms, being crucial in the study of infectious organisms (Eduard and Halstensen, 2009; Samson et al., 2000) and, consequently, in occupational exposure assessments. However, viable microorganisms constitute only a small percentage of the real bioburden, due to the selective effect of culture media and cultivation conditions (Amann et al., 1995; Heidelberg et al., 1997), leading to the underestimation of this exposure risk (Górny et al., 2016; Viegas et al., 2014; Degois et al., 2017). As such, molecular tools (qPCR) were used in parallel for the assessment of fungal biomass and detection/amplification of harmful fungal species/strains.

Fungal biomass was successfully measured by the qPCR assay (FungiQuant) through the detection of several fungal strains at the same time. The primers/probe used in this assay match up to 90% of approximately 2600 different fungal species (Liu et al., 2012). Considering the occupation rate, type of passengers, and passenger's rotation in taxis, a higher fungal load was expected in taxis. However, fungal load was significantly higher in MEA for personal vehicles, whereas no significant differences in fungal biomass were found between taxis and personal vehicles. The lack of filters maintenance could lead to favorable conditions for the bioburden proliferation (Maus et al., 2001). So it appears more likely that such higher fungal burden in personal vehicles may occur due to the absence of additional control measures, besides the preventive maintenance program from each car brand, leaving the owners the responsibility to comply with the periodicity for filter replacement. Negative correlation between fungal biomass and bacteria load on TSA can be due to competition reasons between microorganisms (Mille-Lindblom et al., 2006), as already reported in a different indoor environment (Viegas et al., 2017c).

No *Aspergillus* sections were amplified by qPCR in the assessed filters. This could be related to inhibition of PCR amplification due to the presence of complex environmental substances in the filter matrices, as previously reported for heavily contaminated environments (Schradler

**Table 6**  
Fungal distribution on azole-supplemented media from taxis and personal vehicles filters.

Fungal species	0.5 mg/L Posaconazole (%; n)	1 mg/L Voriconazole (%; n)	4 mg/L Itraconazole (%; n)	Sabouraud (%; n)
<b>Taxis</b>				
<i>Penicillium</i> sp.	100.0; 500	38.5; 2500	0.0; 0	44.4; 4000
<i>Cladosporium</i> sp.	.0; 0	46.2; 3000	75.0; 1500	44.4; 4000
<i>Alternaria</i> sp.	.0; 0	7.7; 500	0.0; 0	0.0; 0
<i>Chrysosporium</i> sp.	.0; 0	7.7; 500	0.0; 0	0.0; 0
<i>Aspergillus</i> section <i>Candidi</i>	0.0; 0	0.0; 0	25.0; 500	0.0; 0
<i>Acremonium</i> sp.	.0; 0	0.0; 0	0.0; 0	5.6; 500
<i>Aureobasidium</i> sp.	.0; 0	0.0; 0	0.0; 0	5.6; 500
<b>Fungal species Controls</b>				
	<b>0.5 mg/L Posaconazole (%; n)</b>	<b>1 mg/L Voriconazole (%; n)</b>	<b>4 mg/L Itraconazole (%; n)</b>	<b>Sabouraud (%; n)</b>
<i>Penicillium</i> sp.	25.0; 500	0.6; 11,000	0.0; 0	0.5; 9000
<i>Cladosporium</i> sp.	75.0; 1500	2.7; 49,000	60.0; 1500	0.6; 10,000
<i>Alternaria</i> sp.	.0; 0	1.8; 33,500	0.0; 0	0.0; 0
<i>Chrysonilia sitophila</i>	0.0; 0	94.9; 1,750,000	0.0; 0	98.8; 1,750,000
<i>Aspergillus</i> section <i>Candidi</i>	0.0; 0	0.0; 0	40.0; 1000	0.0; 500

n – Isolates number.

et al., 2012; Viegas et al., 2014). In fact, primers and probes used to amplify the four target *Aspergillus* sections are specific and can only detect one species at a time, being more sensitive to potential PCR inhibitors.

Regarding azole-resistance, *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., and *Aspergillus* section *Candidi* were the most prevalent non-azole-susceptible species in both taxi and personal vehicle filters. Approximately 200-fold higher fungal counts of non-susceptible species were found in personal vehicles in comparison to taxis. This might be due to the fact that taxis are obliged to replace air conditioning filters with higher and restricted periodicity than personal vehicles.

Since there is a lack of standardized protocols for the screening of azole-resistance in environmental samples, due to the heterogeneity of such matrices (Dudakova et al., 2017), the EUCAST clinical guidelines (Arendrup et al., 2013) were adapted and applied to identify fungal species not-susceptible to azole drugs in the air conditioning filters. The incubation of azole-supplemented media at 27 °C (and not at 34–37 °C, as described in clinical guidelines) allowed to unveil a wider mycobiota diversity without restricting the identification of non-susceptible fungal species to thermotolerant *Aspergillus* section *Fumigati* (Bhabhra and Askew, 2005). Of note, the number of non-susceptible isolates belonging to the genus *Aspergillus* may be underestimated, in general and in our study, due to the dominance of other genera in the azole-supplemented media with faster growth rates (Degois et al., 2017).

Invasive fungal diseases, such as aspergillosis, are increasing and represent an important health risk for the population, especially for immunocompromised individuals (Walsh et al., 2008; Kontoyiannis, 2012; Meletiadis and Roilides, 2013; Vermeulen et al., 2015). This assumes increased relevance in the case of taxis intended for patients' transportation. Therefore, the identification of *Aspergillus* sp. in filters from both taxis and personal vehicles is of concern. The presence of azole-resistant *Penicillium* sp. and *Aspergillus* section *Candidi* species indicates that preventive and protective measures should be implemented to protect the health of both taxi drivers (due to their increased exposure time) and occupants (since can be immunocompromised patients).

Due to the already reported impact of air-conditioning system in the bioburden reaerosolization inside a vehicle, filters from air conditioning systems represent a suitable tool to evaluate the exposure of taxi drivers to bioburden (bacteria and fungi) as an occupational risk factor. The herein described approach allowed the application of different assays combining culture-based methods with molecular tools, and the screening of azole-resistance screening for a detailed characterization of the mycobiota, according to a previously suggested protocol for the assessment of *Aspergillus* sp. burden (Viegas et al., 2017a). Although not successful in this study, molecular biology techniques should be used, complementary to culture-based methods, in occupational exposure assessments where toxigenic and cryptic species (often drug-resistant), or other azole-resistant species, are expected (Viegas et al., 2017a).

## 5. Conclusions

The results of this research show that fungi and bacteria occur widely in taxis and personal vehicles. The genera *Aspergillus*, *Cladosporium* and *Penicillium* were often detected. Filters from air conditioning system are an adequate tool to characterize bioburden proliferation in vehicles. The observed bioburden levels suggest a need to replace filters more frequently both in taxis and personal vehicles, in order to avoid bioburden proliferation and reaerosolization into the cabinet. The use of culture based-methods with selective and supplemented media, in parallel with molecular tools, enabled an improved risk characterization.

## Acknowledgments

The authors are grateful to Instituto Politécnico de Lisboa, Lisbon, Portugal for funding the Project "Waste Workers' Exposure to Bioburden in the Truck Cab during Waste Management - W2E Bioburden" (IPL/2016/W2E\_ESTeSL) and also to the companies that provided the taxis and control filters.

## Author Contributions

Carla Viegas and Susana Viegas conceived and coordinated the study, plus the discussion and conclusions; Carla Viegas lead the production of the paper; Carla Viegas, Ana Monteiro, Mateus dos Santos, Tiago Faria, Liliana Aranha Caetano, Anita Quintal Gomes, Geneviève Marchand, Nancy Lacombe and Susana Viegas contributed on field and lab work and data analyses; Elisabete Carolino ensured the statistical analyses from all data. All authors contributed to the final review.

## References

- Amann, R.L., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143–169.
- Arendrup, M.C., Rodriguez-Tudela, J.L., Lass-Flörl, C., Cuenca-Estrella, M., Donnelly, J.P., Hope, W., 2013. EUCAST technical note on anidulafungin. *Clin. Microbiol. Infect.* 19 (6), 278–280. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12148>.
- Bergwall, C., Stehn, B., 2002. Comparison of selective mycological agar media for the isolation and enumeration of xerophilic moulds and osmotolerant yeasts in granulated white sugar. *Zuckerindustrie* 127, 259–264.
- Bhabhra, R., Askew, D.S., 2005. Thermotolerance and virulence of *Aspergillus fumigatus*: role of the fungal nucleolus. *Med. Mycol.* 43 (1), 87–93. <http://dx.doi.org/10.1080/13693780400029486>.
- Brodzik, K., Faber, J., Łomankiewicz, D., Gołda-Kopek, A., 2014. In-vehicle VOCs composition of unconditioned, newly produced cars. *J. Environ. Sci.* 26 (5), 1052–1061. [http://dx.doi.org/10.1016/S1001-0742\(13\)60459-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1001-0742(13)60459-3).
- Buttner, M., Stetzenbach, L., 1993. Monitoring airborne fungal spores in an experimental indoor environment to evaluate sampling methods and the effects of human activity on air sampling. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 219–226.
- Chmielowiec-Korzeniowska, A., Tymczyna, L., Drabik, A., Krzosek, L., 2016. Microbial contamination level of air in animal waste utilization plants. *Ann. Agric. Environ. Med.* 23, 54–58. <http://dx.doi.org/10.5604/12321966.1196852>.
- Cruz-Perez, P., Buttner, M.P., Stetzenbach, L.D., 2001. Detection and quantitation of *aspergillus fumigatus* in pure culture using polymerase chain reaction. *Mol. Cell Probe* 15, 81–88. <http://dx.doi.org/10.1006/mcpr.2000.0343>.
- De Hoog, G.S., Guarro, J., Gebé, J., Figueras, M.J., 2000. *Atlas of Clinical Fungi*, 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands (1-1126 ISBN: 90-70351-43-9).
- Degois, J., Clerc, F., Simon, X., Bontemps, C., Leblond, P., Duquenne, F., 2017. First metagenomic survey of the microbial diversity in bioaerosols emitted in waste sorting plants. *Ann. Work Expo. Health* 1–11. <http://dx.doi.org/10.1093/annweh/wxx075>.
- Diekmann, N., Burghartz, M., Remus, L., Kaufholz, A.L., Nawrath, T., Rohde, M., Schulz, S., Roselius, L., Schaper, J., Mamber, O., Jahn, D., Jahn, M., 2013. Microbial communities related to volatile organic compound emission in automobile air conditioning units. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 8777–8793. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-012-4564-4>.
- Douwes, J., Thorne, P., Pearce, N., Heederik, D., 2003. Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. *Ann. Occup. Hyg.* 47 (3), 187–200. <http://dx.doi.org/10.1093/annhyg/meg032>.
- Dudakova, A., Spiess, B., Tangwattanachuleeporn, M., Sasse, C., Buchheidt, D., Weig, M., Groß, U., Badera, O., 2017. Molecular tools for the detection and deduction of azole antifungal drug resistance phenotypes in *aspergillus* species. *Clin. Microbiol. Rev.* 30 (4), 1065–1091. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00095-16>.
- Eduard, W., Douwes, J., Mehl, R., Heederik, D., Melbostad, E., 2001. Short term exposure to airborne microbial agents during farm work: exposure response relations with eye and respiratory symptoms. *Occup. Environ. Med.* 58, 113–118. <http://dx.doi.org/10.1136/oem.58.2.113>.
- Eduard, W., Halstensen, A., 2009. Quantitative exposure assessment of organic dust. *SJWEH* 7, 30–35.
- Eduard, W., Heederik, D., Duchained, D., Green, B.J., 2012. Bioaerosol exposure assessment in the workplace: the past, present and recent advances. *J. Environ. Monit.* 14 (2), 334–339. <http://dx.doi.org/10.1039/c2em10717a>.
- EPA, United States Environmental Protection Agency, 2017. About the National Exposure Research Laboratory (NERL). Available from: URL: <<http://www.epa.gov/nerlcwww/moldtech.htm>> (Accessed 19 June 2017).
- Fairlamb, A.H., Gow, N.A., Matthews, K.R., Waters, A.P., 2016. Drug resistance in eukaryotic microorganisms. *Nat. Microbiol.* 1 (7), 16092. <http://dx.doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.92>.
- Fogelmark, B., Sjöstrand, M., Rylander, R., 1994. Pulmonary inflammation induced by repeated inhalations of b(113)-D-glucan and endotoxin. *Int. J. Exp. Pathol.* 75, 85–90.
- Górny, R., Harkawy, A., Ławniczek-Wałczyk, A., Wlazło, A., Niesler, A., Gołofit-

- Szymczak, M., Cyprowski, M., 2016. Exposure to culturable and total microbiota in cultural heritage conservation. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 29, 255–275. <http://dx.doi.org/10.13075/ijomh.1896.00630>.
- Goyal, S.M., Anantharaman, S., Ramakrishnan, M.A., Sajja, S., Kim, S.W., Stanley, N.J., Farnsworth, J.E., Kuehn, T.H., Raynor, P.C., 2011. Detection of viruses in used ventilation filters from two large public buildings. *Am. J. Infect. Control* 39, 30–38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2010.10.036>.
- Goyer, N., Lavoie, J., Lazure, L., Marchand, G., 2001. *Bioaerosols in the workplace: evaluations, control and prevention guide*. IRSSST 83.
- Hamada, N., Fujita, T., 2002. Effect of air-conditioner on fungal contamination. *Atmos. Environ.* 36, 5443–5448. [http://dx.doi.org/10.1016/S1352-2310\(02\)00661-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1352-2310(02)00661-1).
- Heidelberg, J.F., Shahamat, M., Levin, M., Rahman, I., Stelma, G., Grim, C., Colwell, R.R., 1997. Effect of aerosolization on culturability and viability of gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3585–3588.
- Janicka, A., Reksa, M., Sobianowska-Turek, A., 2011. The volatile organic compounds concentration in microenvironment of a car vehicle cabin versus car class. *Pol. J. Environ. Stud.* 20 (4A), 100–103.
- Jo, W.K., Lee, J.H., 2008. Airborne fungal and bacterial levels associated with the use of automobile air conditioners or heaters, room air conditioners, and humidifiers. *Arch. Environ. Occup. Health* 63 (3), 101–107. <http://dx.doi.org/10.3200/AEOH.63.3.101-107>.
- Jo, W.K., Yu, C.H., 2001. Public bus and taxicab drivers'work-time exposure to aromatic volatile organic compounds. *Environ. Res.* 86, 66–72. <http://dx.doi.org/10.1006/enrs.2001.4257>.
- Knibbs, L.D., De Dear, R.J., Morawska, L., 2010. Effect of cabin ventilation rate on ultrafine particle exposure inside automobiles. *Environ. Sci. Technol.* 44, 3546–3551. <http://dx.doi.org/10.1021/es9038209>.
- Knibbs, L.D., Morawska, L., 2012. Traffic-related fine and ultrafine particle exposures of professional drivers and illness: an opportunity to better link exposure science and epidemiology to address an occupational hazard? *Environ. Int.* 49, 110–114. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2012.08.013>.
- Kontoyiannis, D.P., 2012. Invasive mycoses: strategies for effective management. *Am. J. Med.* 125, 25–38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjmed.2011.10.009>.
- Kumar, P., Lopez, M., Fan, W., Cambre, K., Elston, R.C., 1990. Mold contamination of automobile air conditioner systems. *Ann. Allergy* 64 (2), 174–177.
- Lewné, M., Nise, G., Lind, M.L., Gustavsson, P., 2006. Exposure to particles and nitrogen dioxide among taxi, bus and lorry drivers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 79, 220–226. <http://dx.doi.org/10.1007/s00420-005-0047-6>.
- Li, J., Li, M., Shen, F., Zou, Z., Yao, M., Wu, C., 2016. Characterization of biological aerosol exposure risks from automobile air conditioning system. *Environ. Sci. Technol.* 47, 10660–10666. <http://dx.doi.org/10.1021/es402848d>.
- Liu, C.M., Kachur, S., Dwan, M.G., Abraham, A.G., Aziz, M., Hsueh, P.R., Huang, Y.T., Busch, J.D., Lamit, L.J., Gehring, C.A., Keim, P., Price, L.B., 2012. FungiQuant: a broad-coverage fungal quantitative real-time PCR assay. *BMC Microbiol.* 12, 255. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-12-255>.
- Luksamijarulkul, P., Arunchai, N., Luksamijarulkul, S., Kaewboonchoo, O., 2005. Improving microbial air quality in air-conditioned mass transport buses by opening the bus exhaust ventilation fans. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 36 (4), 1032–1038.
- Luksamijarulkul, P., Sundhiyodhin, V., Luksamijarulkul, S., Kaewboonchoo, O., 2004. Microbial air quality in mass transport buses and work-related illness among bus drivers of Bangkok mass transit authority. *Med. Assoc. Thai.* 87 (6), 697–703.
- Madureira, J., Paciência, I., Rufo, J., Pereira, C., Teixeira, J.F.E., 2015. Assessment and determinants of airborne bacterial and fungal concentrations in different indoor environments: homes, child day-care centres, primary schools and elderly care centres. *Atmos. Environ.* 109, 139–146. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2015.03.026>.
- Maus, R., Goppelsröder, A., Umhauer, H., 2001. Survival of bacterial and mold spores in air filter media. *Atmos. Environ.* 35 (1), 105–113. [http://dx.doi.org/10.1016/S1352-2310\(00\)00280-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1352-2310(00)00280-6).
- Mayer, Z., Bagnara, A., FaÅNrbler, P., Geisen, R., 2003. Quantification of the copy number of nor-1, a gene of the aflatoxin biosynthetic pathway by real-time PCR, and its correlation to the cfu of *Aspergillus flavus* in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 82, 143–151. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00250-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00250-7).
- Meletiadi, J., Roilides, E., 2013. Rare invasive fungal infections: epidemiology, diagnosis and management. *Curr. Fungal Infect. Rep.* 7, 351–360. <http://dx.doi.org/10.1007/s12281-013-0155-9>.
- Miaskiewicz-Peska, E., 2011. Effect of antimicrobial air filter treatment on bacterial survival. *Fibres Text. East Eur.* 19, 73–77.
- Mille-Lindblom, C., Fischer, H.J., Tranvik, L., 2006. Antagonism between bacteria and fungi, substrate competition and a possible tradeoff between fungal growth and tolerance towards bacteria. *Oikos* 113, 233–242. <http://dx.doi.org/10.1111/j.2006.0030-1299.14337.x>.
- Miller-Schulze, J.P., Paulsen, M., Toriba, A., Tang, N., Hayakawa, K., Tamura, K., Dong, L., Zhang, X., Simpson, C.D., 2010. Exposures to particulate air pollution and nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons amongst taxi drivers in Shenyang, China. *Environ. Sci. Technol.* 44 (1), 216–221. <http://dx.doi.org/10.1021/es802392u>.
- Nature Microbiology, 2017. Stop neglecting fungi. *Nat. Microbiol.* 25 (2), 17120. <http://dx.doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.120>.
- Noris, F., Siegel, J.A., Kinney, K.A., 2011. Evaluation of HVAC filters as a sampling mechanism for indoor microbial communities. *Atmos. Environ.* 45, 338–346. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2010.10.017>.
- Nowakowicz-Dębek, B., Pawlak, H., Wlaziło, L., Maksym, P., Kapica, J., Chmielowiec-Korzeniowska, A., Trawińska, B., 2017. Evaluating bioaerosol exposure among bus drivers in the public transport sector. *J. Occup. Environ. Hyg.* 26, 0. <http://dx.doi.org/10.1080/15459624.2017.1339165>.
- O'Donoghue, R.T., Gill, L.W., Mckevitt, R.J., Broderick, B., 2007. Exposure to hydrocarbon concentrations while commuting or exercising in Dublin. *Environ. Intern.* 33, 1–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2006.05.005>.
- Oppliger, A., 2014. Advancing the science of bioaerosol exposure assessment. *Ann. Occup. Hyg.* 58, 661–663. <http://dx.doi.org/10.1093/annhyg/meu042>.
- Pang, X., Mu, Y., 2007. Characteristics of carbonyl compounds in public vehicles of Beijing City: concentrations, sources, and personal exposures. *Atmos. Environ.* 41, 1819–1824. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2006.10.057>.
- Prakash, N.K.U., Bhuvaneshwari, S., Kumar, M.R., Lankesh, S., Rupesh, K., 2014. A study on the prevalence of indoor mycoflora in air conditioned buses. *Br. Microbiol. Res. J.* Title 4 (3), 282–292. <http://dx.doi.org/10.9734/BMRJ/2014/5380>.
- Prussin, A., Marr, L.C., 2013. Sources of airborne microorganisms in the built environment. *Microbiome* 22 (3), 78. <http://dx.doi.org/10.1186/s40168-015-0144-z>.
- Ramos, C., Viegas, C., Cabo Verde, S., Wolterbeek, H.T., Almeida, M.A., 2016. Characterizing the fungal and bacterial microflora and concentrations in fitness centres. *Indoor Built Environ.* 6, 1–11. <http://dx.doi.org/10.1177/1420326x15587954>.
- Ross, M.A., Curtis, L., Scheff, P.A., Hryhorczuk, D.O., Ramakrishnan, V., Wadden, R.A., Persky, V.W., 2000. Association of asthma symptoms and severity with indoor bioaerosols. *Allergy* 55 (8), 705–711. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1398-9995.2000.00551.x>.
- Rylander, R., Jacobs, R.R., 1997. Endotoxins in the environment: a criteria document. *Int. J. Occup. Environ. Health* 3, 1–48. <http://dx.doi.org/10.1177/096805199700400510>.
- Samson, R., Hoekstra, E., Frisvad, J., 2000. *Introduction to Food and Airborne Fungi*, 6th ed. Centraal bureau voor Schimmelcultures, Utrecht, pp. 1–282 (ASM Press, United StatesStates), (ISBN: 9070351420).
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., John, R., 2012. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.* 113, 1014–1026. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>.
- Simmons, R.B., Rose, L.J., Crow, S.A., Ahearn, D.G., 1999. The occurrence and persistence of mixed biofilms in automobile air conditioning systems. *Curr. Microbiol.* 39, 141–145. <http://dx.doi.org/10.1007/s002849900435>.
- Som, D., Dutta, C., Chatterjee, A., Mallick, D., Jana, T.K., Sen, S., 2007. Studies on commuters' exposure to BTEX in passenger cars in Kolkata. *India. Sci. Total Environ.* 372, 426–432. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.09.025>.
- Son, B., Yang, W., Breysse, P., Chung, T., Lee, Y., 2004. Estimation of occupational and nonoccupational nitrogen dioxide exposure for Korean taxi drivers using a micro-environmental model. *Environ. Res.* 94, 291–296. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2003.08.004>.
- Srikanth, P., Sudharsanam, S., Steinberg, R., 2008. Bio-aerosols in indoor environment: composition, health effects and analysis. *Indian J. Med. Microbiol.* 26, 302–312. <http://dx.doi.org/10.4103/0255-0857.43555>.
- Stephenson, R.E., Gutierrez, D., Peters, C., Nichols, M., Boles, B.R., 2014. Elucidation of bacteria found in car interiors and strategies to reduce the presence of potential pathogens. *Biofouling* 30 (3), 337–346. <http://dx.doi.org/10.1080/08927014.2013.873418>.
- Su, H.J., Chen, H.L., Huang, C.F., Lin, C.Y., Li, F.C., Milton, D.K., 2002. Airborne fungi and endotoxin concentrations in different areas within textile plants in Taiwan: a 3-year study. *Environ. Res.* 89, 58–65. <http://dx.doi.org/10.1006/enrs.2002.4345>.
- Subbarao, P., Mandhane, P.J., Sears, M.R., 2009. Asthma: epidemiology, etiology and risk factors. *CMAJ* 181 (9), 181–190. <http://dx.doi.org/10.1503/cmaj.080612>.
- Syed, S.T., Gerber, B.S., Sharp, L.K., 2013. Traveling towards disease: transportation barriers to health care access. *J. Community Health* 38 (5), 976–993. <http://dx.doi.org/10.1007/s10900-013-9681-1>.
- Varga, J., Baranyi, N., Chandrasekaran, M., Vágvolgyi, C., Kocsubé, S., 2015. *Mycotoxin producers in the Aspergillus genus: an update*. *Acta Biol. Szeged.* 59, 151–167.
- Vermeulen, E., Maertens, J., De Bel, A., Nulens, A., Boelens, J., Surmont, I., Mertens, A., Boel, A., Lagrou, K., 2015. Nationwide surveillance of azole resistance in aspergillus diseases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59 (8), 4569–4576. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00233-15>.
- Viegas, C., Gomes, A.Q., Abegão, J., Sabino, R., Graça, T., Viegas, S., 2014. Assessment of fungal contamination in waste sorting and incineration — case study in Portugal. *J. Toxicol. Environ. Health A* 77 (1–3), 57–68. <http://dx.doi.org/10.1080/15287394.2014.865583>.
- Viegas, C., Pinheiro, C., Sabino, R., Viegas, S., Brandão, J., Veríssimo, C., 2015. *Environmental mycology in public health: fungi and mycotoxins risk assessment and management*. Academic Press, London (ISBN: 9780124115354).
- Viegas, C., Meneses, M., Viegas, S., 2016a. Climate changes influence in occupational exposure to fungi and mycotoxins. In: *Azees, I.V. (Ed.), Occupational Safety and Hygiene*. Taylor and Francis Group, London, pp. 11–15. <http://dx.doi.org/10.1201/b21172-4>.
- Viegas, C., Faria, T., Carolino, E., Sabino, R., Quintal Gomes, A., Viegas, S., 2016b. Occupational exposure to fungi and particles in animal feed industry. *Med. Pr.* 67 (2), 143–154. <http://dx.doi.org/10.13075/mp.5893.00289>.
- Viegas, C., Faria, T., dos Santos, M., Carolino, E., Sabino, R., Quintal Gomes, A., Viegas, S., 2016c. Slaughterhouses fungal burden assessment: a contribution for the Pursuit of A Better Assessment Strategy. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 13, 297. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph13030297>.
- Viegas, C., Faria, T., Aranha, L., Carolino, E., Quintal Gomes, A., Viegas, S., 2017a. *Aspergillus* prevalence in different occupational settings. *J. Occup. Environ. Hyg.* 14 (10), 771–785. <http://dx.doi.org/10.1080/15459624.2017.1334901>.
- Viegas, C., Ramalho I., Alves M., Faria T., Aranha Caetano L., Viegas S., 2017b. Electrostatic dust cloth – A new sampling method for occupational exposure to bioaerosols In: *Proceedings of the International Symposium on Occupational Safety and Hygiene SHO2017*, Azees, P. et al., Portuguese Society of Occupational Safety

- and Hygiene: 40–41. ISBN 978-989-98203-7-1.
- Viegas, C., Faria, T., Cebola de Oliveira, A., Aranha Caetano, L., Carolino, E., Quintal-Gomes, A., Twarużek, M., Kosicki, R., Soszczyńska, E., Viegas, S., 2017b. A new approach to assess fungal contamination and mycotoxins occupational exposure in forklifts drivers from waste sorting. *Mycotoxin Res.* 1–11. <http://dx.doi.org/10.1007/s12550-017-0288-8>.
- Viegas, C., Faria, T., Pacifico, C., dos Santos, M., Monteiro, A., Lança, C., Carolino, E., Viegas, S., Cabo Verde, S., 2017c. Microbiota and particulate matter assessment in Portuguese optical shops providing contact lenses services. *Healthcare* 5, 24. <http://dx.doi.org/10.3390/healthcare5020024>.
- Vonberg, R.P., Gastmeier, P., Kenneweg, B., Holdack-Janssen, H., Sohr, D., Chaberny, I.F., 2010. The microbiological quality of air improves when using air conditioning systems in cars. *BMC Infect. Dis.* 10, 146. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-10-146>.
- Walser, S.M., Gerstner, D.G., Brenner, B., Bünger, J., Nowak, F., Raulf, M., et al., 2015. Evaluation of exposure-response relationships for health effects of microbial bioaerosols - a systematic review. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 218 (7), 577–589. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2015.07.004>.
- Walsh, T.J., Anaissie, E.J., Denning, D.W., Herbetich, R., Kontoyiannis, D.P., Marr, V.A., Segal, B.H., Steinbach, W.J., Stevens, D.A., van Burik, J.A., Wingard, J.R., Patterson, T.F., Infectious Diseases Society of America, 2008. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the infectious diseases society of America. *Clin. Infect. Dis.* 46 (3), 327–360. <http://dx.doi.org/10.1086/525258>.
- Wang, Y.F., 2011. Seasonal difference of airborne bacteria and fungi in commuter buses. *Environ. Eng. Sci.* 28 (6), 461–467. <http://dx.doi.org/10.1089/ees.2009.0362>.
- Wang, Y.F., Tsai, C.H., Huang, Y.T., Chao, H.R., Tsou, T.C., Kuo, Y.M., Wang, L.C., Chen, S.H., 2013. Size distribution of airborne fungi in vehicles under various driving conditions. *Arch. Environ. Occup. Health* 68, 95–100. <http://dx.doi.org/10.1080/19338244.2011.650798>.
- Wu, F.F.S., Wu, M.W., Chang, C.F., Lai, S.M., Crane, J., Siebers, R., 2010. Endotoxin and  $\beta$ -(1,3)-glucan levels in automobiles: a pilot study. *Ann. Agric. Environ. Med* 17 (2), 327–330.