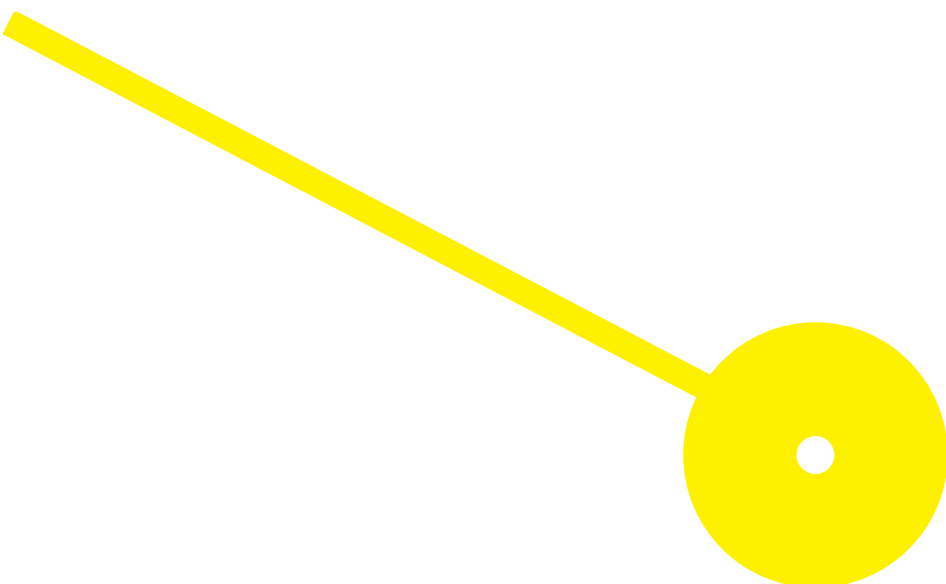




Revisão da literatura sobre contaminação microbiológica de superfícies em contexto hospitalar

José Carlos Moreira Teixeira

07/2020





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**



Revisão da literatura sobre contaminação microbiológica de superfícies em contexto hospitalar

Autor

José Carlos Moreira Teixeira

Orientadores

Doutora Cristiana Maria da Costa Pereira | Investigadora Auxiliar | Departamento de Saúde
Ambiental | Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
Professora Especialista Manuela Amorim Sousa | ESS|P.Porto

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários
à obtenção do grau de Mestre em **Análises Clínicas e Saúde Pública** –
Área de Especialização em **Microbiologia e Saúde Pública** pela Escola
Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à Doutora Cristiana Pereira, pela oportunidade de poder realizar este estágio no laboratório, bem como pelo empenho para que se desenvolvesse o melhor possível. Agradecer pela aprendizagem que foi profundamente enriquecedora. Queria ainda agradecer pelo carinho e amizade com que me acolheu e tratou ao longo de todo o tempo, o apoio incondicional e indispensável na realização e orientação deste relatório. O meu muito obrigado pela dedicação.

Aos meus colegas de mestrado pelo acompanhamento, pelo carinho, pela boa disposição e pelo sentido de camaradagem, sobretudo à Francisca Mendes, amiga de coração, sempre presente em tudo.

Aos meus amigos pelo ânimo e presença constante.

À minha família pelo apoio incondicional, por serem o pilar da minha vida. Ao meu avô com saudade.

À Doutora Especialista Manuela Amorim, à Prof^a Doutora Marlene e demais professores, pela atenção e acompanhamento dados.

A todos e todas de um ou de outro modo se fizeram presentes na minha vida e no meu crescer enquanto pessoa.

A todos sem exceção o meu muito obrigado.

Esta página foi deixada propositadamente em branco

“Porque eu sou do tamanho do que vejo.

E não do tamanho da minha altura...”

(Fernando Pessoa)

Mesmo sendo grande, Habitas em mim.

Esta página foi deixada propositadamente em branco

Resumo

As superfícies hospitalares são um reservatório de microrganismos quer pela mão de profissionais de saúde, visitantes e doentes, bem como pela reutilização de material como panos e águas de limpeza que proliferam para outras superfícies e locais diferentes, cruzando-se com outros microrganismos, conduzindo à formação de comunidades bacterianas heterogéneas e biofilmes, que protegem as bactérias e dificultam o acesso aos produtos de limpeza e desinfeção não permitindo assim a sua eliminação.

A disseminação de bactérias no ambiente hospitalar, a instalação de biofilmes, o acréscimo de doentes em imunossupressão, o aumento de técnicas mais invasivas, a falha de métodos de controlo microbiológico e da eficácia de produtos e técnicas de limpeza permitem a acumulação microbiana e, consequentemente, de IACS, que conduzem a um aumento de morbilidade, mortalidade e gastos económicos com internamento.

Várias técnicas são já empregues para avaliação da flora microbiana, usando desde métodos diretos a métodos indiretos de colheita de amostras de superfícies, e análise por métodos de cultura microbiológica ou métodos moleculares como a PCR.

O objetivo desta revisão da literatura foi verificar e analisar o método de recolha microbiológica mais usado e adequado para avaliação da contaminação microbiológica em contexto hospitalar, bem como identificar as zonas críticas.

A literatura indica que a falta de *guidelines* não permite a uniformização de dados e técnicas apropriadas, ressaltando apenas assim vantagens e desvantagens de cada método que devem ser pensadas aquando da escolha. Quanto às zonas críticas, a casa de banho apresenta elevada carga microbiana, em contraste com as enfermarias e as unidades de cuidados intensivos, com valores na sua maioria inferiores a 5 UFC/cm².

Palavras-chave: Amostragem de superfície, Ambiente hospitalar, UFC, Bactéria

Abstract

Hospital surfaces are a reservoir of microorganisms that, by the hand of health professionals, visitors and patients, or the reuse of material such as cloths and cleaning water, proliferate to other surfaces and different places, crossing with other microorganisms, leading to the formation of heterogeneous bacterial communities and biofilms, which protects the bacteria and hinder access to cleaning and disinfection products, preventing their elimination.

The dissemination of bacteria circulating in the hospital environment, the installation of biofilms, the addition of immunosuppressive patients, the increase of more invasive techniques, the failure of microbiological control methods and the lack of effectiveness of cleaning products and techniques, allow microbial accumulation and consequently, IACS which lead to an increase in morbidity, mortality and economic expenses with hospitalization.

Several techniques are already employed for the evaluation of microbial flora, using direct methods or indirect methods of collecting samples from surfaces, and analysis by microbiological culture methods or molecular methods such as PCR.

The purpose of this literature review was to verify and analyze the microbiological collection method most used and suitable for the evaluation of microbiological contamination in the hospital setting as well as identify critical areas.

The literature indicates that the lack of guidelines does not allow the standardization of appropriate data and techniques, emphasising only the advantages and disadvantages, when it comes to choose the best method. As for the critical areas, bathroom has a higher microbial load, in contrast to the wards and intensive care units, where most of the values are less than 5 CFU/cm².

Keywords: Surface sampling, Hospital environment, CFU, Bacteria

Índice

Índice de acrónimos, siglas e sinais.....	IX
Índice de Figuras.....	XI
Índice de Tabelas.....	XII
1. Introdução.....	1
1.1. Métodos indiretos de recolha.....	10
1.1.1. Zaragatoa.....	10
1.1.2. Esponja ou pano.....	11
1.2. Métodos diretos de recolha.....	13
1.2.1. RODAC.....	14
1.2.2. <i>Dipslides</i>	14
1.2.3. Petrifilm™.....	14
1.3. Outros Métodos.....	15
1.3.1. Lavagem e métodos imersão.....	15
1.3.2. Sonicação.....	15
1.3.3. Raspagem e moagem.....	16
2. Metodologia.....	17
2.1. Recolha de dados.....	17
2.2. Seleção dos estudos.....	17
2.3. Análise de dados e estatística.....	19
3. Resultados.....	21
4. Discussão.....	25
5. Conclusão.....	39
Referências Bibliográficas.....	42
Anexos.....	51

Índice de acrónimos, siglas e sinais

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina Trifosfato
cm ²	Centímetro quadrado
DGS	Direção Geral de Saúde
ECDC	Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doença, do inglês <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EPA	Agência de Proteção Ambiental, do inglês <i>Environmental Protection Agency</i>
g	Gramas
HPV	Vapores de Peróxido de Hidrogénio
IACS	Infeções Associadas aos Cuidados de Saúde
IgG	Imunoglobulina G
LCR	Reação em cadeia da ligase, do inglês <i>Ligase Chain Reaction</i>
LFIA	Imunoensaio de fluxo lateral, do inglês <i>Lateral Flow Immuno-Assay</i>
LPG-ISAM	Camadas auto-montadas iónicas, do inglês <i>Ionic Self-Assembled Multilayer of a Long-Period Grating</i>
MALDI-TOF	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz, do inglês <i>Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight</i>
MD	Método Direto
MI	Métodos Indireto
MRD	Diluyente de Máxima Recuperação

MRSA	<i>Staplylococcus aureus</i> resistente à metilina
NaDCC	Dicloroisocianurato de Sódio
NaClO	Hipoclorito de Sódio
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês <i>Polymerase chain reaction</i>
PD	País Desenvolvido
PED	País em Desenvolvimento
PX-UVD	Dispositivo de Luz Ultravioleta Pulsada de Xénon
QDS	<i>Quantum Dots</i>
RODAC	Deteção e contagem de organismos replicados, do inglês <i>Replicate Organism Detection And Counting</i>
s	Segundos
SEB	Enterotoxina Estafilocócica B
<i>spp</i>	Várias Espécies
UCI	Unidade de Cuidados Intensivos
UFC	Unidade Formadora de Colónias
UK	Reino Unido
UVC	Luz Ultravioleta C
VPN	Rede Privada Virtual
VRE	<i>Enterococcus</i> Resistente à Vancomicina

Índice de Figuras

Figura 1– Os 10 principais agentes causadores de IACS por ordem de prevalência, em Portugal.....	2
Figura 2–Distribuição Relativa da Prevalência das Infecções associadas aos Cuidados de Saúde em Unidades de Cuidados Continuados Integrados em Portugal em 2017	3
Figura 3– Desenvolvimento de um biofilme.....	5
Figura 4– Fluxograma para seleção de estudo.....	19
Figura 5– Escolha de métodos de recolha bacteriana	26
Figura 6– Comparação entre métodos de recolha direto e indireto em função do local.....	27
Figura 7– Comparação entre desenvolvimento dos países e o grau de contaminação	28
Figura 8– Concentração bacteriana em função do tipo de método usado em diferentes zonas.....	29
Figura 9– Comparação do grau de contaminação de superfícies em função da área hospitalar	30

Índice de Tabelas

Tabela 1– Bactéria e duração de persistência em superfícies inanimadas	4
Tabela 2– Tipo de agente e o neutralizador.....	9
Tabela 3– Sistematização das variáveis em análise.....	22
Tabela 4– Análise estatística descritiva do grupo mobília.....	51
Tabela 5– Análise estatística descritiva do grupo cama.....	51
Tabela 6– Análise estatística descritiva do grupo Paredes	51
Tabela 7– Análise estatística descritiva do grupo Casa de Banho.....	52
Tabela 8– Análise estatística descritiva do grupo Equipamentos.....	52
Tabela 9– Análise estatística descritiva para Países desenvolvidos (PD) e em desenvolvimento (PED).52	
Tabela 10– Análise estatística de Países desenvolvidos (PD) e em desenvolvimento (PED) por áreas....	53
Tabela 11– Análise multicomparativa entre áreas hospitalares.....	54
Tabela 12– Análise estatística de Mobília com remoção de outliers.....	55
Tabela 13– Análise estatística de Métodos diretos e indiretos por área.....	56

1. Introdução

As superfícies hospitalares são um reservatório de microrganismos, sendo por isso uma via de transmissão, proliferação e propagação de bactérias causadoras de Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde (IACS), agravando o estado de saúde dos doentes bem como os gastos económicos com terapias e internamentos (1,2).

Apesar do grande avanço científico e tecnológico atual, os microrganismos continuam a ser dos seres mais desafiantes quer pela dificuldade no seu tratamento, quer pela sua capacidade de adaptação rápida. O aumento de resistência aos antibióticos tem sido de grande preocupação para a comunidade científica pelo risco que representa para adquirir infeções, sobretudo infeções associadas aos cuidados de saúde.

Segundo a Direção Geral de Saúde (DGS), a Infecção Associada aos Cuidados de Saúde (IACS) "é uma infeção adquirida pelos doentes em consequência dos cuidados e procedimentos de saúde prestados e que pode, também, afetar os profissionais de saúde durante o exercício da sua atividade." O termo mais usado é infeções nosocomiais, contudo esta definição exclui o ambulatório, sendo por isso o termo IACS mais abrangente e mais correto já que engloba todas as unidades prestadoras de cuidados de saúde. Apesar de 1/3 das IACS poderem ser evitáveis, o aumento da esperança de vida, as terapias de imunossupressão e as terapias invasivas fazem aumentar a sua incidência entre doentes mais vulneráveis (3).

O ambiente hospitalar é um potencial reservatório de microrganismos patogénicos, constituindo uma importante via de transmissão de infeções (4). Não obstante, as mãos dos profissionais de saúde constituem também uma importante rede de transmissão de infeções cruzadas, bem como os dispositivos usados pelos mesmos, sobretudo por falta de higienização entre doentes (5).

O Programa Nacional de Controlo de Infecção de 2012, "Estudo Nacional de Prevalência de Infecção Associada aos Cuidados de Saúde e do Uso de Antibióticos em Unidades de Cuidados Continuados", reporta que 22% dos doentes em cuidados continuados tinha mais de 85 anos, aliado a isso, 72,1% apresentava mobilidade diminuída, 65,8% incontinência urinária e/ou fecal, 15,5% dos doentes estavam algaliados e, em 86,3% destes a algália estava presente há mais de 3 meses. Em 15,4% registou-se a presença de úlceras de pressão e em 13,2% a presença de outro tipo de feridas. Todos estes fatores tornam os doentes mais vulneráveis a adquirirem uma IACS (6).

Em Portugal, o relatório do Programa Nacional de Prevenção e Controlo da Infecção Associada aos Cuidados de Saúde de 2007, dava conta que a prevalência verificada foi de 8.4% de doentes com IACS, sendo que a infeção por *Staphylococcus aureus* metilicina-resistente (MRSA) representa cerca de 50% desse valor (3,6).

Segundo o relatório "The european centre for disease prevention and control (ECDC) Pilot point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use" de 2011, as IACS representam um desafio em relação à segurança e qualidade dos cuidados de saúde em todo o mundo, com uma prevalência de 5,7% na Europa, o que significa 81.089 doentes com uma IAC por dia em hospitais europeus de cuidados agudos, onde o valor mais alto correspondia a Portugal com 10,8% e o valor mais baixo à Letónia com 2,3% (7). A prevalência de IACS é definida como "o número de episódios de infeção ou doentes infetados por 100 doentes presentes nos estabelecimentos de saúde ou enfermaria em determinado momento" (8).

Apesar dos grandes avanços as IACS ainda são um problema sério para os cuidados de saúde.

Alguns estudos mostram que os microrganismos mais frequentemente associados a IACS são: *Escherichia coli* (15.9%), *Staphylococcus aureus* (12.3%), *Enterococcus spp.* (9.6%), *Pseudomonas aeruginosa* (8.9%) *Klebsiella spp.* (8.7%), *Staphylococcus coagulase-negativa* (7.5%), *Candida spp.* (6.1%), *Clostridium difficile* (5.4%), *Enterobacter spp.* (4.2%), *Proteus spp.* (3.8%) and *Acinetobacter spp.* (3.6%), estando ainda presentes bactérias com resistências a antibióticos (9).

Em Portugal a percentagem de bactérias causadoras de IACS varia ligeiramente em relação à média europeia (Figura 1)(10).

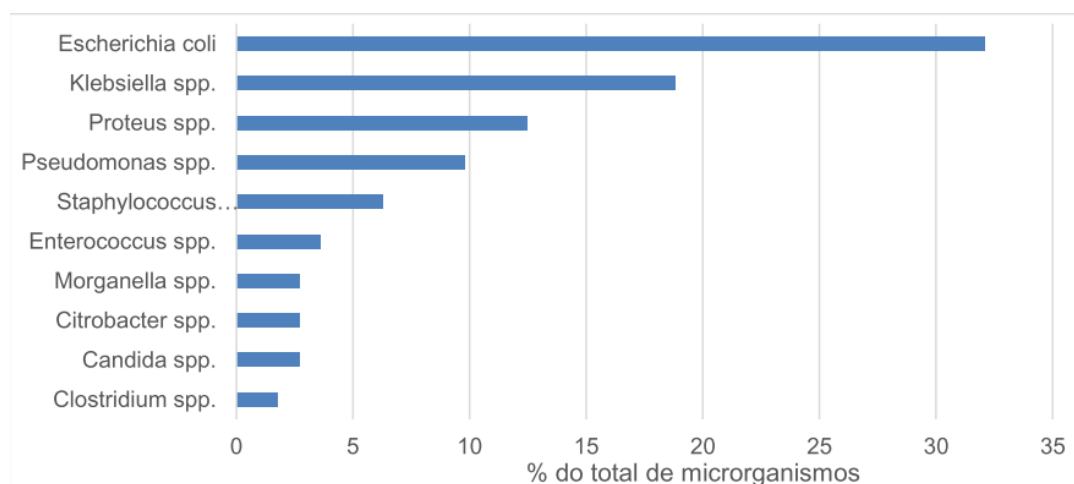


Figura 1– Os 10 principais agentes causadores de IACS por ordem de prevalência, em Portugal (retirado de DGS 2015)(10)

Entre 2009 e 2018, em Portugal, a adesão global ao programa de higienização das mãos teve um aumento de 38,75%, atingindo em 2018 os 75,1%, entre as unidades de saúde que participavam na monitorização da higiene das mãos. No mesmo passo, notou-se uma redução de IACS, como é o caso da pneumonia associada ao ventilador que reduziu em 36,6%, da infeção associada ao cateter intravascular central em UCI de adultos reduziu em 57,1%, da infeção do local cirúrgico de cólon e reto reduziu em 13,5%, da infeção do local cirúrgico de prótese de joelho reduziu em 52,9%, da infeção associada ao cateter intravascular central em unidades de internamento reduziu em 45,0%, face ao mesmo período(11–13).

Em Portugal, a resistência aos antibióticos diminuiu em 20.1% face a *Staphylococcus aureus* resistente à Metilina (MRSA) entre 2011–2016, mas aumentou em 73% em *K. pneumoniae* resistente a carbapenemos, entre 2009 e 2016. As resistências de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter*, *S. aureus*, *Enterococcus* têm mostrado tendência para diminuir, o oposto se verifica para *K. pneumoniae*. Para *Streptococcus pneumoniae* não se verificaram alterações que permitam prever o seu comportamento futuro(11).

Quanto ao uso de antibióticos verificou-se uma prevalência de 9,4% em Portugal, sendo a média europeia de 6,5%, tendo-se observado diferenças significativas entre países (mínimo 1,4% na Alemanha e máximo 19,4% na Irlanda do Norte)(6). Como se pode verificar, embora não seja uma diferença muito grande, face à média europeia, Portugal apresenta uma prevalência maior de IACS, bem como um maior do uso de antibióticos.

Dados relativos a 2017 para a prevalência das IACS em unidades de cuidados continuados, em Portugal, mostram que a infeção urinária associada à utilização de cateter e a infeção respiratória decorrente do uso de instrumentos de contato direto com as vias respiratórias, são as mais prevalentes (Figura 2)(13).

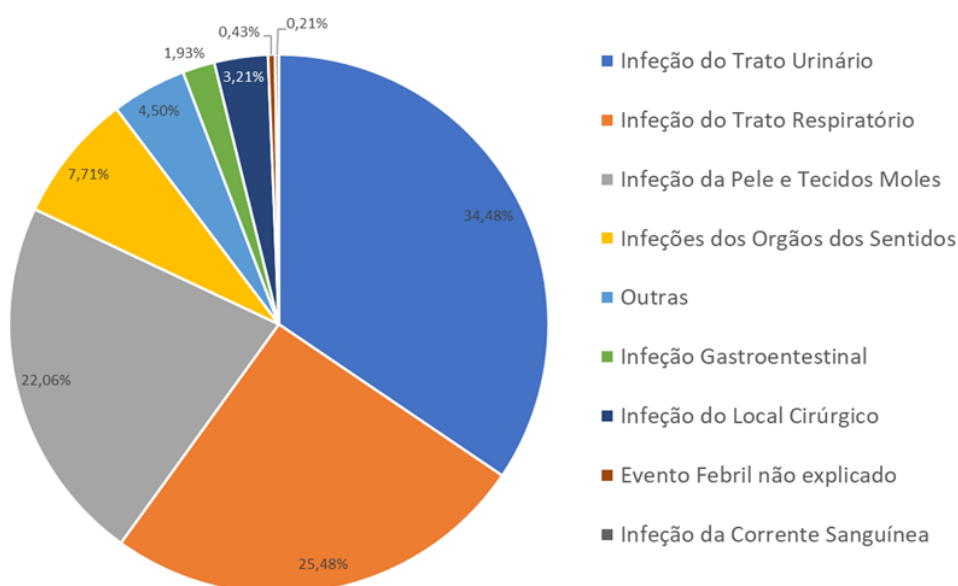


Figura 2–Distribuição Relativa da Prevalência das Infeções associadas aos Cuidados de Saúde em Unidades de Cuidados Continuados Integrados em Portugal em 2017 (retirado de DGS 2018)(13)

Estas infeções podem ser transmitidas em ambientes hospitalares contaminados, com origem sobretudo nas chamadas “superfícies de alto toque” incluindo maçanetas, camas, interruptores, grades de proteção nos corredores e mesas de doentes internados (14). As superfícies de alto toque próximas dos doentes têm maior carga microbiológica e podem contribuir para uma transmissão secundária pelo contato direto com o doente ou pelas mãos de profissionais de saúde e visitantes, estimando-se que cerca de 30–40% das IACS sejam transmitidas pelas mãos dos profissionais de saúde (2,15). Além disso,

estima-se ainda que 20% a 25% sejam devido a terapêutica antibiótica sucessiva e prolongada, 20% a 25% podem resultar do contacto com microrganismos adquiridos na comunidade e 20% têm origem desconhecida (3).

As bactérias podem permanecer viáveis em superfícies inanimadas desde alguns dias até semanas e meses, conforme a Tabela 1 apresenta (16).

Tabela 1– Bactéria e duração de persistência em superfícies inanimadas (adaptada de Kramer *et al.* (2006))(16)

Bactéria	Duração da persistência
<i>Acinetobacter spp</i>	3 dias a 5 meses
<i>Clostridium difficile (spores)</i>	5 meses
<i>Escherichia coli</i>	1,5 horas a 16 meses
<i>Enterococcus spp.</i> incluindo VRE e VSE	5 dias a 4 meses
<i>Klebsiella spp.</i>	2 horas a 30 meses
<i>Proteus vulgaris</i>	1–2 dias
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 horas a 16 meses; chão seco 5 semanas
<i>Staphylococcus aureus</i> , incluindo MRSA	7 dias a 7 meses

A limpeza e desinfecção hospitalar sobretudo nas áreas envolventes ao doente ou tocadas pelo pessoal clínico devem ser desinfetadas com vista à redução de probabilidade de transmissão. Rawlinson *et al.* (2019) referem um aumento de 73% de probabilidade de um novo doente desenvolver uma IACS se o doente anterior tiver tido uma IACS (17).

Enquanto o uso de detergentes permite sobretudo remover a sujidade, a gordura e o pó, são os desinfetantes quem têm efeito bactericida contra a maioria dos microrganismos presentes. Os microrganismos são capazes de viver nas mais variadas superfícies, sejam elas de plástico, aço, madeira, vidro e em muitos outros materiais e locais considerados inóspitos para a sua sobrevivência. Esta sobrevivência está muitas vezes relacionada com a capacidade de formar biofilmes. Quanto mais uma superfície é áspera, porosa ou irregular mais fácil será a acumulação de bactérias e, por outro lado, mais difícil será manter o seu estado de limpeza e desinfecção. A humidade assume também um papel importante já que a presença de água potencia a propagação microbiológica (18–21).

Biofilme define-se como uma comunidade bacteriana, isto é, agregação de uma ou mais espécies de bactérias. A primeira fase, adesão (Etapa 1, Figura 3), depende de elementos microbianos bem como do tipo de superfície e ambiente em que esta se encontra. As bactérias que estão em circulação livre são

chamadas bactérias planctônicas e quando aderidas a uma superfície denominam-se bactérias sésseis. A adesão pode dar-se ao acaso ou ser induzida por quimiotaxia em função das características físico-químicas da superfície, resultando em ligações eletrostáticas ou hidrofóbicas. De seguida, a segunda fase chamada de ancoragem (Etapa 2, Figura 3), as células passam a segregar uma matriz extracelular de polissacarídeo e formar um agregado entre si e aderente a uma superfície abiótica ou biótica. Os elementos de virulência como adesinas, pili e fimbrias atuam nesse sentido. Enquanto a primeira fase é considerada reversível, a partir da segunda fase a adesão é irreversível. Diversos fatores interferem na velocidade da formação do biofilme, entre eles, a temperatura, a taxa de adesão, a presença de antimicrobianos e a composição nutricional da superfície (22–26).

A terceira fase passa pela formação de uma microcolônia ou biofilme imaturo (Etapa 3, Figura 3), que com o passar do tempo irá organizar-se e tornar-se um biofilme maduro (Etapa 4, Figura 3), com uma estrutura semelhante a cogumelo, envoltos em substâncias sobretudo açúcares e rodeado de poros e canais de água que funcionam como um sistema de troca de oxigênio, de nutrientes e metabólitos. Além disso, a camada externa protege as células ao atuar como meio de defesa, dificultando a penetração de agentes germicidas. Quando o ambiente não se torna mais propício à manutenção do biofilme ou o biofilme decide dispersar-se, são segregados mini-agregados bacterianos que poderão invadir uma nova superfície e recomeçar o ciclo de um biofilme (22–26).

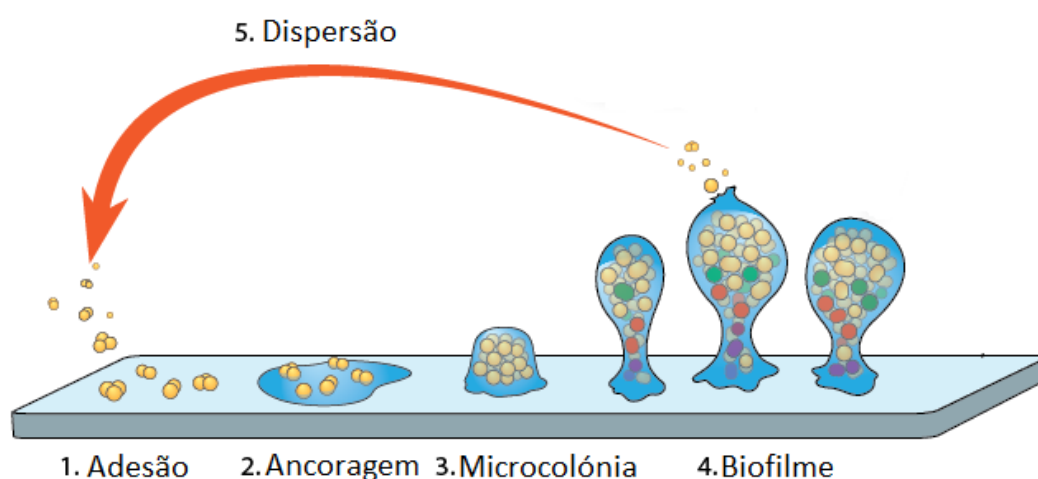


Figura 3– Desenvolvimento de um biofilme (Adaptada)(27)

No entanto, o amplo uso de desinfetantes químicos apresenta riscos para o meio ambiente. Além disso, as bactérias podem adaptar-se a uma variedade de condições físicas e químicas ambientais, tendo por isso sido relatados casos de resistência a antissépticos e desinfetantes amplamente utilizados (9).

Servem de exemplo os álcoois (Isopropílico, álcool etílico), compostos quaternários de amônia (Alquil-dimetil-benzilo cloreto de amônio, alquil-dimetil-etilbenzil cloreto de amônio, fenóis (Benzil-4-clorofenol, Amilfenol, fenilfenol) e iodo, sendo usado em limpeza detergentes e desinfetantes com cloro(2,28).

Nos espaços envolventes é sugerido ao doente o uso de desinfetantes designados, pela *Environmental Protection Agency* (EPA), de nível baixo ou intermédio como álcool etílico ou isopropílico (70-90%), Hipoclorito de sódio (5,25-6,15%, diluído 1: 500 fornece > 100ppm de cloro disponível), solução de detergente germicida fenólico (diluição segundo informação do fabricante) ou solução detergente germicida de iodo (diluição segundo informação do fabricante)(29).

Na maioria dos casos os produtos de limpeza são eficazes contra os microrganismos mas muitas vezes não contra os seus esporos, sendo por isso recomendável o uso combinado de esporicidas(30).

A descontaminação nos cuidados de saúde é assim um ponto crítico na prevenção e controlo de transmissão de infeções. Estudos mostram que 50% das superfícies de alto toque em torno das áreas dos doentes não são devidamente desinfetadas por erro humano ou inacessibilidade, e 5-30% das superfícies permanecem contaminadas pela ineficácia dos detergentes em fórmulas que referem destruir os biofilmes (2,4).

Estudos mostraram que quando um pano é usado para limpar diferentes superfícies, a contaminação é transferida nessa superfície e nas mãos da pessoa que segura o pano. Embora esteja presente o desinfetante, a eficácia deste depende de outros fatores como a sua concentração, o tempo de contato com superfícies, os tipos de bactérias ou vírus, e os cuidados com os esfregões ou panos. A reutilização de panos concomitantemente com a não alteração da solução pode, além de não desinfetar, espalhar e potenciar a contaminação. Assim, recomenda-se que a solução seja substituída após cada três a quatro salas com intervalos não superiores a 60 min (15).

Vários estudos mostram que muitas das práticas de limpeza e desinfeção não são suficientes, sendo ainda difíceis de monitorizar uma vez que não existem padrões mensuráveis, nem *guidelines* que permitam determinar que valores são considerados satisfatórios para cada zona, potenciando a não uniformização de valores e práticas (19,31,32).

À parte dos blocos operatórios e salas limpas, para as quais já foram definidos valores limite e procedimentos relativamente à contaminação microbiológica (25), nas restantes áreas hospitalares há uma lacuna no que se refere a valores admissíveis para a presença de microrganismos, o que resulta numa dificuldade acrescida em estabelecer metodologias de amostragem e procedimentos validados para obtenção de resultados microbiológicos quantitativos, sendo difícil a comparação inter e intra-hospitalar, bem como diferenciar valores aceitáveis entre uma análise casual ou de rotina (29,32).

Dancer *et al.* (2004), referem que valores superiores a 1 UFC/cm² deveriam ser um sinal para a necessidade de se verificar ou repetir os processos de limpeza (32) e Dolan *et al.* (2011) assumem o

mesmo valor, mas para a presença de bactérias multirresistentes (34). Contudo, este valor não é consensual; nos EUA o valor está definido como $<5 \text{ UFC/cm}^2$ e no Reino Unido $<2,5 \text{ UFC/cm}^2$. No entanto $<5 \text{ UFC/cm}^2$ é considerado internacionalmente como o valor aceitável para contagens totais (32,34,35).

Comparativamente à análise de superfícies para manuseamento de alimentos, já estão definidos valores de conformidade para a presença de microrganismos e procedimentos validados que garantem que a quantidade, o local de colheita, as condições de incubação e todas as demais variáveis estão bem definidas, permitindo a obtenção de amostras representativas, mensuráveis e qualificáveis (36,37).

No caso das análises de limpeza e desinfecção em contexto hospitalar, sem um procedimento devidamente validado, o método usado pode não ser o mais indicado, não sendo pois representativo da verdadeira população microbiana presente, conduzindo a conclusões erróneas que poderão afetar severamente a saúde dos doentes e a segurança hospitalar (38,39).

As necessidades de controlo variam de acordo com o ambiente em questão. Por exemplo, quando se fala de um ambiente farmacêutico entende-se que a presença microbiológica tem de ser reduzida a zero, uma vez que se manipulam químicos e terapêuticas que vão ser administradas a doentes. No entanto, quando se fala de indústrias, o critério de aceitação não é zero, mas sim que não se verifiquem contaminações cruzadas, ou seja, que estejam no local da produção e armazenamento apenas os microrganismos ligados aos processos de fabrico. Já no caso dos serviços hospitalares, a intenção é não só rastrear a eficácia dos processos de desinfecção, mas sobretudo atuar ao nível da deteção de patógenos que, se não controlados, podem ser causadores de problemas de saúde pública. De facto, as superfícies parecem ser potenciais reservatórios de microrganismos patogénicos, sendo por isso necessário controlá-los e até mesmo eliminá-los. Assim, podemos verificar que as necessidades se alteram conforme se alteram os ambientes e os objetivos (19,40,41).

No último século têm sido usadas várias técnicas de deteção de amostras microbiológicas em superfícies, desde recolhas com zaragatoas até placas de contato.

A recuperação total de microrganismos presentes nunca é conseguida por nenhum método. A eficiência da recuperação de um método de amostragem é influenciada por vários fatores como as interações entre os materiais e o organismo, a própria superfície e o material em si, da capacidade de recolha, acessibilidade e facilidade de desprendimento; a presença de matéria orgânica e de outros organismos; as condições de transporte e de armazenamento (tempo, temperatura, meios de transporte) que podem danificar ou adulterar a composição do local de amostragem. Como a amostra equivale a um pequeno número de organismos ou à análise de uma pequena área, os procedimentos devem ser aplicados uniformemente, de modo a obter valores representativos de toda a superfície (42,43).

Todas as variáveis devem ser pensadas e ponderadas, de modo a escolher-se um método eficaz que forneça dados credíveis, aplicáveis e cientificamente significantes.

Como forma de garantir estes objetivos deve atender-se a alguns fatores como: qualificação do pessoal que efetua a colheita e análise; qualificação do laboratório; políticas e procedimentos de segurança apropriados; registo e documentação; garantia de qualidade e procedimentos de verificação da mesma; e, compreensão cuidada dos resultados obtidos.

Em qualquer circunstância, o uso de técnicas assépticas e de materiais estéreis é essencial para garantir a viabilidade dos resultados, de forma a garantir que nenhuma contaminação adicional intervém durante o processo de recolha, sendo por isso a amostra representativa do local analisado. Além disso, antes da amostragem deve ser pensado o local onde a amostra será recolhida (a distribuição microbiológica não é na maioria dos casos homogénea em toda a superfície) e a quantidade de amostras que deverão ser recolhidas (42).

Muitas variáveis podem interferir no processo, como seja:

- a) a capacidade de alguns agentes sobreviverem e produzirem toxinas nas superfícies por longos períodos de tempo;
- b) a interferência de outras partículas, organismos, inibidores de crescimento, ou inibidores da amostra;
- c) propriedades aderentes dos microrganismos;
- d) o tamanho da superfície a ser analisada (a taxa de recuperação diminui quando se aumenta a área);
- e) condições de transporte e acondicionamento;
- f) o tempo, temperatura; e,
- g) os métodos de deteção usados no laboratório (42,44).

Quando o objetivo da amostragem é fornecer indicações da presença ou ausência de determinado organismo, diz-se ser um método qualitativo; quando se pretende determinar o número de microrganismos detetados na superfície, usam-se métodos quantitativos que resultam na obtenção de um número por área dada ou por peça.

A presença de resíduos de desinfetantes deve ser tida em conta na escolha dos meios de transporte/meios de recolha de amostra, uma vez que estes podem conduzir a efeitos tóxicos e reduzir o número de microrganismos ou conduzir a resultados erróneos, os falsos negativos. Assim, aquando da recolha de amostras, na presença de desinfetantes à base de hipoclorito de sódio, compostos quaternários de amónio, peróxido de hidrogénio, e compostos fenólicos, deve ser considerada a adição de agentes neutralizadores adequados para cada tipo, conforme apresentado na Tabela 2. Servem de exemplo a lecitina, a histidina, o Polisorbato 80 e o tiosulfato de sódio que neutralizam desinfetantes e antissépticos comumente usados. A escolha do neutralizante deve ser baseada na compatibilidade deste para o ensaio, na sua toxicidade para o organismo pretendido e no tipo de desinfetante usado para a

descontaminação. A adição de surfactantes na mistura pode mudar a hidrofobicidade da membrana, a interação entre microrganismos, a interação dos materiais de amostra e dos equipamentos, podendo aumentar a capacidade de dispersão e diminuir a aderência(45,46).

Tabela 2– Tipo de agente e o neutralizador (adaptada de Baldock *et al.* 1974 e Shintani *et al.* 2015)(47,48)

Agente	Neutralizante
Compostos de amónio quaternário	Lecitina e Polisorbato 80
Desinfetantes fenólicos	Polisorbato 80, carvão, cloreto de ferro, lecitina
Etanol	Lecitina em Polisorbato 80
Formaldeído	lões de amónio, Polisorbato 80, sulfito de sódio
Halogéneos	Tiosulfato de sódio
Hexaclorofeno	Polisorbato 80, lecitina,
Mercúrio	Tioglicolato de sódio, sulfito de sódio
Peróxido de hidrogénio	Catalase, tiosulfato de sódio
Iodo	Polisorbato
Hipoclorito de sódio	Tiosulfato de sódio

A incorporação de espécies controlo na amostra pode ajudar o operador a avaliar a eficácia e a toxicidade bem como as propriedades bacteriostáticas e fúngicas do neutralizante. Os meios usados devem ainda ser verificados quanto à sua esterilidade e capacidade de crescimento microbiológico (43,45,49).

A análise oportuna da amostra é importante para obter resultados precisos; além disso as condições de transporte devem ser tidas em conta e, se possível evitadas as variações extremas de temperatura durante o transporte, quer pelas temperaturas sazonais quer pelas condições de transporte ou da própria embalagem. As temperaturas ótimas, meios de transporte, e o tempo de espera pode variar conforme o tipo de organismo, contudo, esta é por norma recomendável próxima de 5 °C, com meios de transporte como Meio de Stuart, Meio de Amies com ou sem carvão, Meio de Cary-Blair sendo a análise feita em menos de 24h. Se as amostras contêm organismos patogénicos ou substâncias tóxicas, devem ser reportados e transportados de modo conforme (19,31,41,44,50,51).

Enquanto um resultado positivo é evidente, um resultado negativo pode não significar que o organismo não está presente, mas sim que não foi possível detetá-lo ou quantificá-lo de acordo com o método usado e as suas capacidades e especificações. Assim, é preciso ter em conta a sensibilidade, precisão, seletividade, exatidão, limiares analíticos, reprodutibilidade, repetibilidade, desvios e erros associados.

Os métodos de recolha de amostra podem ser agrupados em indiretos ou diretos conforme o tratamento da amostra necessário.

1.1. Métodos indiretos de recolha

Os métodos indiretos de recolha, são métodos que requerem o tratamento da amostra. A amostra é retirada da superfície em análise, de seguida acondicionada corretamente (com ou sem meio de transporte) e levada para laboratório onde é processada. O processamento envolve a extração do microrganismo do material de recolha com recurso a agitação ou vórtex, permitindo o desprendimento da amostra numa solução de tampão (PBS ou água peptonada, por exemplo). Da solução mãe são preparadas diluições, e da suspensão mãe e de cada uma das diluições preparadas, retira-se assepticamente o volume pretendido, para ser plaqueado em placas de agar conforme o microrganismo pretendido. Meios não seletivos serão escolhidos para crescimento total, ao passo que, meios seletivos e diferenciais serão usados para deteção de microrganismos específicos uma vez que são suplementados de acordo com as necessidades do mesmo. O resultado pode ser apresentado em UFC/cm², por área de análise ou utensílio (17–19,31,41,50).

Uma vez que requerem tratamento de amostra, os métodos indiretos estão mais sujeitos a contaminação (17). De entre os métodos indiretos destacam-se a zaragatoa, esponjas e panos a seguir discriminados.

1.1.1. Zaragatoa

O uso de zaragatoa, ou também chamado de método de esfregaço, é considerado o método mais convencional e por isso recomendado, sendo usado na maioria das superfícies, sejam elas plástico, aço, madeira ou até mesmo para estudos de campo (21,52), para áreas de 20cm² a 100cm²(53). Permite o acesso a áreas de difícil alcance, tais como cantos e fendas, e áreas inacessíveis aos dispositivos maiores.

Este método é usado na indústria alimentar para deteção de bactérias patogénicas (19,54).

Por convenção usa-se uma zaragatoa estéril, em que a cabeça é de algodão (55) e a haste de madeira, no entanto outros tipos de materiais podem ser usados quer ao nível da cabeça (poliéster e alginato de sódio, em que o último permite uma maior libertação de microrganismos por dissolver-se no meio) quer ao nível da haste (madeira, plástico)(56). Pode ainda ser usado a seco (se a superfície está húmida) ou pode ser molhado em 0,1% de água peptonada estéril em Diluente de Máxima Recuperação (MRD)(57) ou noutro tampão de extração tendo em conta que se há presença de vestígios de detergentes ou desinfetantes, um neutralizador deve ser incorporado (21). Se se pretender uma avaliação quantitativa o fluido não deve conter nutrientes que promovam o crescimento durante o transporte para o laboratório.

A eficiência de cada material pode variar uma vez que a aderência à superfície do meio ambiente e a adesão ao material são determinados pelas interações físicas e químicas do organismo com a superfície e o material de zaragatoa, variando de organismo para organismo (58,59). O método de zaragatoa apresenta taxas de recuperação entre 22% e 58% (17).

As zaragatoas de recuperam significativamente mais colônias quando usadas em superfícies húmidas. Enquanto a zaragatoa de *Nylon* recupera 43,6%, a zaragatoa de *Dacron* e poliéster apresentam taxas mais baixas, 24,1% e 14,1%, respetivamente (60). Rawlinson *et al.* (2019) corroboram a mesma conclusão ao afirmar que é encontrada maior recuperação na zaragatoa de *Nylon* (55,4%) face à de *Rayon* (19,7%) (17).

A zaragatoa é então esfregada pela superfície de interesse e de seguida colocada num meio de extração que permita a agitação da zaragatoa (manual ou mecânica) para libertar os microrganismos para o meio, ou seja, recuperá-los, sendo de seguida em laboratório plaqueadas a partir do meio de extração ou então, de diluições desse. O algodão tem a capacidade de capturar bactérias e esporos de fungos (56).

O vórtex (agitação mecânica) melhora a recuperação em zaragatoas em flocos de 60% a 76%, mas não a partir de zaragatoas de *Rayon*. No geral, este dá os melhores resultados, exceto para as zaragatoas de poliéster, em que a sonicação se mostrou mais adequada. Um tempo ideal de 2 min de vórtex mostrou-se superior a 12 min de sonicação, seguido de agitação (17). O método de inoculação direta em comparação com o uso de uma membrana filtrante, mostrou que este último apresenta maior taxa de recuperação (29,4%) face ao outro (24%) (60).

O tipo de material deve ser escolhido tendo em conta o que se pretende analisar. Se por um lado o alginato pode aumentar a recuperação de microrganismos, por outro lado, em alguns casos pode mostrar-se tóxico (54,55,57).

Como este método depende em grande parte do operador, torna-se difícil a sua padronização pois depende do grau de pressão aplicada, da quantidade de tempo gasto, o grau de rotação de zaragatoa, entre outras. Esta variabilidade entre os indivíduos pode ser minimizada com um programa de treino eficaz. Além disso está limitada a área de análise. Por outro lado, é versátil tanto para análises moleculares como análises a microrganismos: bactérias, fungos, vírus e toxinas biológicas (31).

1.1.2. Esponja ou pano

O método de lavagem é mais utilizado quando se requer a análise de áreas maiores (> 100cm²), fazendo uso de esponjas ou tecidos estéreis para a recolha. Podem ser usados materiais como algodão, mas também celulosas que se têm mostrado eficazes (61). Há ainda uma maneira mais vigorosa, que passa pelo uso de uma escova de dentes (que facilitará a quebra de aderência dos microrganismos às superfícies) seguindo-se do uso de toalhetes (62).

Esta técnica é muito usada na área alimentar, em ambientes artesanais ou indústrias de fabrico de queijos e laticínios para recolher os microrganismos em caso de contaminação suspeita (18,19,54).

Apesar deste método se mostrar eficaz na recuperação de microrganismos, apresentando taxas de recuperação de 40,5–98,3% em várias superfícies (17), apresenta algumas limitações como é o caso da fraca reprodutibilidade, pois há diferenças ao nível da pressão que é exercida entre operadores e até entre o mesmo operador (63). A permanência dos microrganismos aderidos às esponjas ou tecidos, pode fazer diminuir a recuperação o que requer o uso de agitação ou vórtex. A eficiência da recuperação parece estar mais ligada à textura e não à porosidade, além disso, um resultado negativo pode não implicar a ausência de microrganismos devido ao limite de deteção (18).

Apesar destas limitações continua a ser o mais usado para superfícies de difícil acesso ou irregulares, que não possibilitam o uso de métodos de contacto, uma vez que permite detetar vários microrganismos (bactérias, fungos, vírus) quando se suspeita que a contaminação seja heterogénea, bem como toxinas (31). Não permite contudo avaliar as camadas internas (como é o caso da madeira)(18,54). Não obstante, permite a análise de múltiplos locais (19).

1.2. Métodos diretos de recolha

Os métodos diretos de recolha, são métodos práticos, simples e que não requerem tratamento de amostra. A amostra permanece no mesmo meio em que é retirada da superfície em análise, sendo posteriormente incubada tendo em conta a análise pretendida e o microrganismo presente. Assim como nos métodos indiretos, nos métodos diretos podem ser usados meios não seletivos para crescimento total e meios seletivos e diferenciais para deteção de microrganismos específicos. O resultado é apresentado em UFC por área da placa (17–19,31,41,50).

Uma vez que não requerem tratamento de amostra, os métodos diretos estão menos sujeitos a contaminação, uma vez que não existe extração nem diluições que acumulam erros (17). São usados para a verificação da eficiência da higiene (19).

Em caso de contaminação excessiva, estes métodos não permitirão a quantificação pela ocorrência de sobreposição de colónias na placa, impossibilitando a contagem, sendo por isso mais usado em superfícies “limpas”, uma vez que nestas deverá resultar um número de colónias possível de contar (64).

O método consiste assim em pressionar as placas de meio seletivo ou não seletivo nas superfícies e incubar as mesmas de seguida. Está assim limitada em termos de área e de microrganismos viáveis capazes de crescer no meio (19). Tende a ser usado em grandes superfícies ambientais como hospitais ou indústrias em alternativa ao esfregaço. Na maioria dos casos tratando-se de áreas grandes faz-se a recolha de 5 placas de contato de 5 locais distintos da superfície para um melhor recobrimento e obtenção de um perfil mais representativo e fidedigno da superfície (64).

Este método é usado em contexto alimentar e ocasionalmente na clínica (18,19). Contudo, devido à falta de acessibilidade aos microrganismos em meios porosos ou irregulares ou em superfícies muito contaminadas, este método nem sempre pode ser usado (65).

A reprodutibilidade pode ser conseguida pelo uso de um aplicador de força constante (peso ou mola). Como alternativa surge ainda um método que consiste em verter o agar diretamente sobre a superfície, no entanto, quase impossível de usar em contexto industrial (18,66).

De entre os métodos diretos destacam-se as placas *Replicate Organism Detection and Counting* (RODAC), *Dipslides* e placas Petrifilm™.

1.2.1. RODAC

Este método permite a quantificação e análise da viabilidade com 20–26 cm² para as placas RODAC (19).

As placas de contato são convexas na parte inferior e a superfície do ágar estende-se ligeiramente para além das paredes laterais da placa, permitindo o contacto com superfícies sólidas. Não requer assim preparação de amostra, apenas incubação e a própria placa servirá para contagem de UFC. O seu método de aplicação é simples, rápido e ideal para medir a contaminação de grandes áreas onde muitas amostras são necessárias para se poder realizar validação estatística (18,19,31,54).

1.2.2. *Dipslides*

Dipslides ou "*coupon-printing*" (camada fina de plástico coberta com um meio de cultura em ambos os lados), apresentam percentagens de recuperação inferiores (67), no entanto permitem analisar superfícies irregulares como maçanetas, com uma análise por placa de 7–12 cm² (19).

Inicialmente desenvolvidos para a deteção de microrganismos em líquidos, mais tarde foram adotados para uso em superfícies de amostragem. O facto de terem uma estrutura plástica exterior permite manter o *Dipslide* em estado asséptico (18,19,31,54).

1.2.3. Petrifilm™

As placas de Petrifilm™ destinam-se a ser utilizadas como substituição conveniente para métodos convencionais de espalhamento, com uma área de 7–12 cm², consistindo numa fina camada de meio desidratado sobre um suporte de papel e filme transparente. O meio é reidratado com 1 ml de água tamponada e deixado em repouso por 15 minutos. De seguida a placa Petrifilm™ pode ser usada como uma placa de contacto, pressionando suave e uniformemente a superfície a ser amostrada. Após a remoção da superfície, o filme plástico transparente é cuidadosamente rolado sobre a superfície do ágar para selar a umidade (18,19,31,54).

1.3. Outros Métodos

É importante serem referidos a seguir ainda outros métodos, que são aplicados sobretudo para superfícies mais porosas, apresentando alguns uma destruição do objeto de análise, sendo por isso menos usados face aos métodos anteriormente descritos. Além disso, são por vezes usados como meios auxiliares aos anteriores (18,31).

1.3.1. Lavagem e métodos imersão

O método de lavagem e imersão é usado para detetar e enumerar bactérias que estejam presentes durante o processamento alimentar ou no ambiente de transporte, existindo para o efeito muitas alternativas (18).

Geralmente a zaragatoa ou esponja (ou algum material do equipamento) é colocado dentro do saco de plástico estéril. De seguida é calculado o seu peso e, posteriormente, adicionada uma solução tampão (por exemplo, citrato de sódio a 1%, água destilada, água peptonada) e agitada conforme o necessário e possível. Este passo é crucial para a libertação dos microrganismos da superfície em estudo para o tampão. Seguidamente, o líquido do saco é plaqueado diretamente e/ou com diluições (18).

Apesar de permitir o acesso a poros e superfícies irregulares apresenta menor eficácia que os restantes métodos destrutivos. Só é exequível para peças de menor calibre, além de danificar a mesma.

1.3.2. Sonicação

A sonicação é usada para romper membranas celulares, agregados celulares e também para a desagregação e libertação de biofilmes, através da emissão de ultrassons que podem variar de 28Hz até 280Hz de 4 min a 10 segundos, respetivamente (18)

É usada para monitorização de microrganismos em superfícies sólidas para questões de higiene e saúde, para desalojar o biofilme da superfície de implantes que foram removidos e para avaliar o material de revestimento na indústria agroalimentar. A sonicação é atualmente utilizada, juntamente com métodos de imersão e agitação, para recuperar as bactérias patogénicas em biofilmes de superfícies sólidas que são frequentemente feitos de metal ou de aço inoxidável (20,68,69).

Este método pode ainda ser acoplado com pressão de vácuo para superfícies mais porosas como é o caso da madeira, permitindo recuperar bactérias e os esporos de fungos, mostrando rendimentos mais elevados quando comparado com a moagem (18).

Apesar de mostrar uma elevada recuperação de microrganismos, torna-se mais eficaz quando acoplado com imersão, lavagem ou a pressão de vácuo. No entanto, é de difícil uso fora do contexto

laboratorial porque requer a retirada de peças, está limitado a peças de menor dimensão, além de poder estragar a superfície por estar em contacto com líquidos. O método é assim moroso, mas a aplicação de sonicação seguida de esfregaço parece mostrar melhores rendimentos de recuperação. A vantagem do método reside ainda no facto de não apresentar mortalidade e permitir uma extração profunda (18).

1.3.3. Raspagem e moagem

De todos os métodos destrutivos, a raspagem e moagem apresentam as maiores taxas de recuperação para materiais de superfície que são irregulares ou porosas, como o caso da madeira. Um estudo realizado mostra que os microrganismos penetram apenas até 2-3 mm da superfície (62).

Contudo, este método não pode ser usado em superfícies como o aço e superfícies plásticas, dada a sua dureza. Por outro lado, a moagem raramente pode ser usada a nível industrial uma vez que conduz à perda total da amostra (70).

O método consiste assim na raspagem da amostra em estudo seguindo-se da moagem do mesmo para reduzir o mais possível de modo a obter-se também mais carga microbiana, ou seja, uma extração mais profunda.

A par de todos estes métodos podem ser usados métodos de deteção genómica, isto é, de deteção de ADN, que embora sejam precisos, não permitem geralmente quantificar a carga microbiana sobretudo pela não separação entre bactérias vivas ou mortas. Além destes podem ser usados métodos ainda mais rápidos como biossensores ou método de deteção por ATP bioluminescência, sendo que este apenas dá resultados de microrganismos totais viáveis (14,38).

A presente revisão da literatura teve assim como objetivo verificar, analisar e sistematizar informação sobre qual o método de recolha microbiológica mais usado e adequado para avaliação da contaminação microbiológica em contexto hospitalar, bem como identificar as zonas críticas.

2. Metodologia

A metodologia de investigação baseia-se na revisão sistemática da literatura incide sobre os métodos de colheita de superfícies para análise microbiológica utilizados em contexto hospitalar, bem como nas superfícies selecionadas para a colheita, as áreas hospitalares de maior contaminação, a existência de coerência entre os artigos sobre os métodos e resultados, bem como na existência de orientações para tal. A pesquisa incluiu todos os artigos sem limite cronológico.

Para cada referência incluída na revisão verificou-se qual o método de recolha usado, a consistência e a expressão dos resultados.

Para a realização deste estudo formulou-se a seguinte questão de investigação: Qual o método de recolha microbiológica mais usado e qual o mais adequado para avaliação da contaminação microbiológica de superfícies em contexto hospitalar? E uma segunda pergunta: Quais as zonas mais críticas?

A metodologia utilizada para a realização desta revisão sistemática encontra-se detalhada nas subsecções seguintes.

2.1. Recolha de dados

Os artigos utilizados foram obtidos através da pesquisa avançada, recorrendo às palavras-chave "*surface sampling*" e "*hospital environment*" e "*CFU*" e "*bacteria*". A pesquisa foi efetuada na base de dados NCBI, limitando à base de dados *PubMed* para garantir que os artigos estariam ligados ao contexto médico-hospitalar. Uma segunda pesquisa foi realizada na base de dados *Web of Science*. As pesquisas foram realizadas a 18 de maio de 2020.

2.2. Seleção dos estudos

Da pesquisa feita na *PubMed* resultaram 98 artigos. Da base de dados *Web of Science* 35. Um total de 133 artigos foram considerados, destes foram excluídos 35 por se encontrarem repetidos. Foram lidos todos os *abstracts* e aplicados os critérios inclusão e exclusão abaixo descritos.

Para a seleção dos artigos a incluir na revisão definiram-se os seguintes critérios de inclusão:

- Análise a superfícies hospitalares;
- Referência ao método de amostragem;
- Referência às zonas que foram analisadas;

- Resultados mensuráveis para bactérias totais e expressos em UFC por unidade de área ou área deduzível.

E, como critérios de exclusão:

- Estudos onde foram apenas avaliadas algumas espécies de microrganismos e não a carga total de bactérias;
- Estudos onde não são referidos resultados mensuráveis de bactérias totais;
- Estudos onde não são analisadas superfícies hospitalares (excluindo estetoscópios e luvas, por exemplo);
- Estudos onde são feitas análises exclusivamente a água ou ar.

Assim, aplicando os critérios de inclusão e exclusão foram eliminados 35 artigos pela leitura do *abstract* e 33 artigos pela leitura completa do trabalho. Outros 7 artigos, por inacessibilidade mesmo usando a VPN do Instituto Politécnico do Porto da Escola Superior de Saúde, foram também eliminados. A presente revisão sistemática da literatura resumiu-se assim a 23 artigos, que incluem artigos unicamente em língua inglesa (Figura 4).

Para análise dos artigos foi criada uma base de dados no Excel identificando autores, ano, área hospitalar analisada, tipo de superfície analisada, valores de UFC/cm², método e técnica de recolha, criando-se grupos como "Cama", "Mobília", "Equipamentos", "Casa de Banho", "Paredes" e "Outras superfícies".

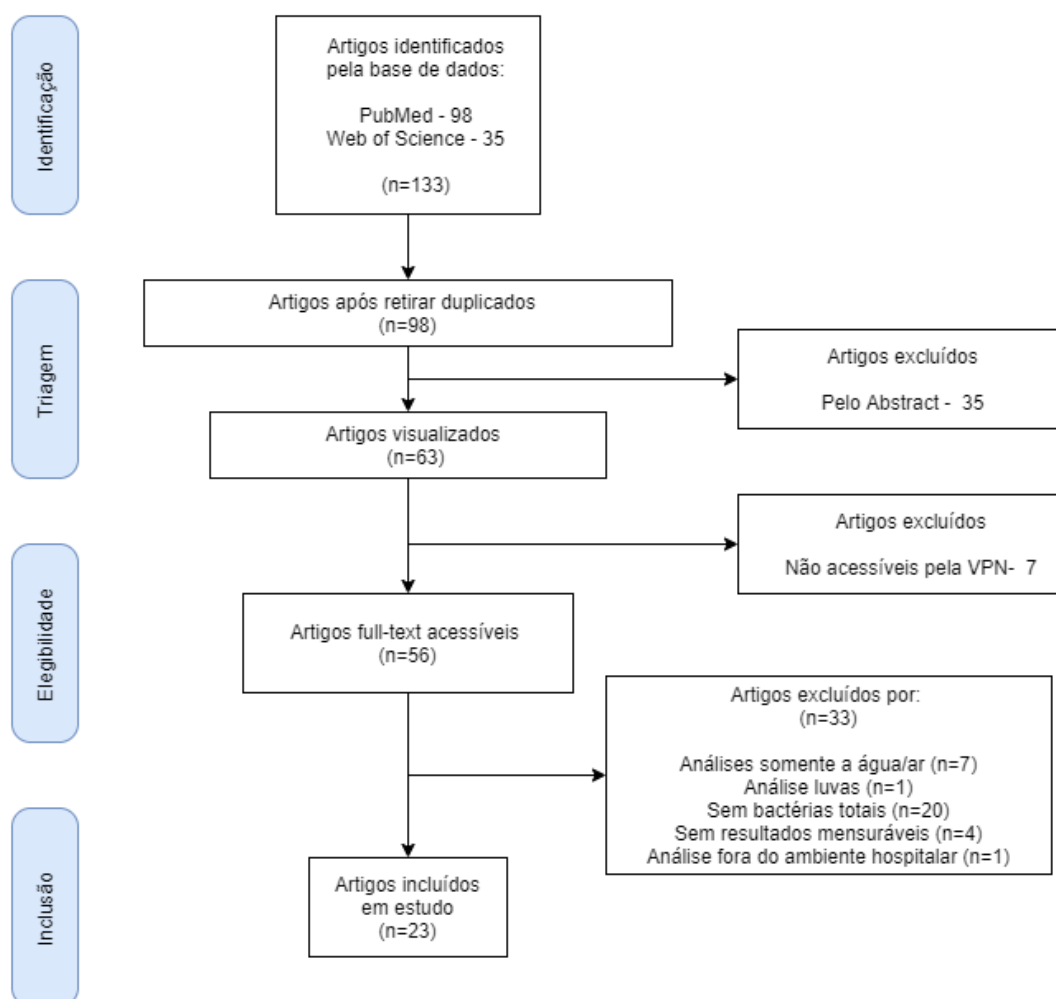


Figura 4- Fluxograma para seleção de estudo

2.3. Análise de dados e estatística

Para sistematizar a informação recolhida para análise das variáveis em estudo dos artigos, foi criada uma base de dados no Excel, agrupando em Autor(es), País, Zona hospitalar, Método de recolha, Cama, Móveis, Paredes (incluindo maçanetas, interruptores, portas, chão), Casas de banho, Equipamentos (equipamentos usados no hospital), Outras superfícies (superfícies não especificadas ou conjunto de superfícies) e Geral (valor único apresentado pelos autores para a análise feita).

A análise estatística foi efetuada pela análise descritiva dos dados, e estatística inferencial para observar se existem diferenças significativas entre os grupos definidos. A análise de significância foi efetuada com *T-test Student* e ANOVA ($p < 0,05$). Ao avaliar métodos diretos e métodos indiretos, foram definidos os grupos: 'Móvel', 'Cama', 'Casa de Banho', 'Paredes', 'Equipamentos', 'Outras Superfícies'. Este último grupo refere-se a superfícies não especificadas pelos autores dos artigos ou unicamente a uma média apresentada pelos autores para as superfícies analisadas, sendo para tal considerados aqueles que

se enquadravam na análise. A análise estatística e os gráficos foram realizados com o software *GraphPad Prism 8 for Windows 64-bit*, versão 8.4.3. Cada conjunto de dados foi testado usando *T-test student*.

Para a análise entre países desenvolvidos e em desenvolvimento, a separação foi baseada no "*World Economic Situation and Prospects- Country classifications*" de 2019 (71). A análise estatística e o gráfico foram realizados com o software *GraphPad Prism 8 for Windows 64-bit*, versão 8.4.3, sendo realizado um *T-test student*.

Ao analisar o grau de contaminação de superfícies em função da área hospitalar, foram realizados quatro grupos, 'Enfermaria', 'Cuidados Intensivos', 'Casa de Banho' e 'Vários' (incluindo neonatal, pediatria, geriatria, unidades de avaliação médica aguda, consulta externa ou outras áreas não especificadas pelos autores). A análise estatística e os gráficos foram realizados com o software *GraphPad Prism 8 for Windows 64-bit*, versão 8.4.3, sendo realizado um teste ANOVA, com multiteste Tukey's.

Todos os dados com as particularidades da sua análise encontram-se nos anexos, expressos em tabelas de análise descritiva, que incluem Média, Desvio-Padrão, Mínimo, Máximo e Intervalo de Confiança.

3. Resultados

Os 23 artigos incluídos nesta revisão, foram analisados quanto ao país do estudo, zona hospitalar, método de colheita e tipo de superfície analisada. A maioria dos artigos são oriundos dos Estados Unidos da América, seguindo-se o Reino Unido (UK-United Kingdom). Os valores retirados de cada um e o método de recolha são apresentados abaixo na Tabela 3 onde para cada um foi feita uma conversão para CFU/cm². É de ressaltar que a análise é limitada, sobretudo pela falta de artigos que se apliquem e que apresentem valores mensuráveis, pelo que, sendo o $n < 30$ não é possível efetuar uma análise estatística robusta, com recursos a métodos paramétricos.

Tabela 3- Sistematização das variáveis em análise

Autor(es)	País	Zona hospitalar	Método	Cama	Mobílias	Paredes	Casas de banho	Equipamentos	Outras superfícies	Geral
Schmidt et al. (1984) (22)	América	Cuidados intensivos	Placas de contato	- ¹	-	-	-	-	-	2,05
Willis et al. (2007) (80)	Inglaterra	Enfermaria	Zaragatoa	-	-	10,72	4,79	1,58	2	-
Al-hamad et al. (2008) (71)	UK	Cuidados intensivos	Dipslide	-	-	-	-	-	-	2,89
										3,45
Andersen et al. (2009) (73)	Noruega	Geriatría	Placas de contato	-	-	-	-	-	-	4,22
Hedin et al. (2010) (81)	Suécia	Enfermaria	Placa de contato	0,44	-	-	-	-	-	-
			Zaragatoa direto	0,32	-	-	-	-	-	-
			Zaragatoa c/libertação	0,4	-	-	-	-	-	-
Casey et al. (2010) (74)	UK	-	Zaragatoa	-	-	-	-	-	-	18,83
Schmidt et al. (2012) (68)	América	Cuidados intensivos	Pano- zaragatoa	173,36	37,52	71,18	-	49,56	-	-
Hsueh et al. (2013) (67)	Taiwan China	Cuidados intensivos	Zaragatoa	0,31	0,38	0,03	0,33	0,1	-	0,5
Claro et al. (2015) (75)	Irlanda	Enfermaria/ gabinete médico	Placas de contato/Petrifilm™	7,34	2,63	-	7,97	2,41	-	-

¹ Na falta de informação foi colocado o sinal (-)

Autor(es)	País	Zona hospitalar	Método	Cama	Mobílias	Paredes	Casas de banho	Equipamentos	Outras superfícies	Geral
Gonsu et al. (2015) (66)	África-Cameron	Cirurgia/cuidados intensivos	Zaragatoa	-	-	-	-	-	-	5,31
Shams et al. (2016) (33)	América	Cuidados agudos	Esponjas	-	-	-	-	-	-	27
Ho et al. (2016) (32)	Taiwan China	-	Zaragatoa	15	21,78	30,45	27,85	7,7	-	-
Hosein et al. (2016) (4)	UK	Unidades de avaliação médica aguda	Placas de contato	0,65	0,39	-	0,94	-	-	-
Best et al. (2016) (64)	UK/França	Casa de banho	Esponjas	-	-	-	168,75 102,5 683,75 697,5	-	-	-
Ali et al. (2017) (72)	UK	-	Placas de contato	-	0,86	4,04	3,49	1,28	1,32	-
Torkar et al. (2017) (79)	Eslovénia	Enfermarias de oncologia, pediatria e psiquiatria	Zaragatoa	-	-	-	-	-	2,6	-
Shek et al. (2017) (77)	Canadá	"Zona de trauma"/ enfermaria	Placas de contacto	-	-	3,06	-	-	-	-
Shek et al. (2018) (1)	Canadá	Unidade de queimados	Placas de contacto	-	-	1,91	-	-	-	-
Simmons et al. (2018) (78)	América (Texas)	Sala de operação	Placas de contacto	-	73,52	-	-	87,6	-	-

Autor(es)	País	Zona hospitalar	Método	Cama	Mobílias	Paredes	Casas de banho	Equipamentos	Outras superfícies	Geral
Dippenaar et al. (2018) (65)	Sul África	Neonatal, pediatria, cuidados intensivos (preparação de alimentos)	Zaragatoa	-	-	-	-	-	-	544
Smith et al. (2018) (69)	Escócia	Cuidados intensivos	Dipslides	42,48	-	-	-	-	-	-
Vilaccis et al. (2019) (70)	Equador	Sala de operação, Cuidados intensivos	Placas de contato	1,32	-	-	-	0,54	2,19	-
		UCI, cirurgia, neonatal		0,48	0,67	-	-	0,68	-	-
Rawlinson et al. (2019) (76)	UK	Hematoncologia/ consulta externa	Placas de contacto	-	1,69	1,36	-	-	-	0,51

4. Discussão

Os métodos validados e acreditados têm sempre especial atenção e preferência por parte dos laboratórios e comunidade científica, uma vez que os resultados obtidos podem ser comparáveis assim como a avaliação dos laboratórios por ensaios interlaboratoriais é muito mais simples.

A escolha entre os métodos disponíveis, resume-se a três fatores principais: (a) o que se sabe da superfície ou se espera provar, (b) a acessibilidade à técnica disponível com equipamentos e competência (c) qual o grau de precisão pretendida.

Os métodos diretos (placas de contato, Petrifilm™ e *Dipslides*) permitindo uma análise mínima de 7cm² e máxima de 26cm², são utilizados sobretudo para monitorizar a higiene ambiental (ar e superfícies) e validar as operações de limpeza e desinfeção. Além de permitirem reduzir o trabalho laboratorial necessário (já que não requer tratamento da amostra), a mesma placa de colheita torna-se na placa de contagem de UFC, reduzindo também o material (19,31).

Já no que toca aos métodos indiretos (Zaragatoa, Esponja, pano), o material usado para recolha de amostra tem de ser acondicionado numa solução libertadora de bactérias, para que estas, aderidas ao utensílio se desprendam deste para a solução. O método envolve esfregar uma zaragatoa estéril humedecida sobre a superfície de teste e colocá-lo em um frasco de diluição. Além disso, a solução obtida, chamada solução mãe, por conter na maioria dos casos elevada carga microbiana requer diluições seriadas para ser possível depois da sementeira, obter placas com limites de contagem entre 30–300 UFC por placa. Não obstante, entre os passos de recolha e plaqueamento, é necessário por vezes fazer passos de enriquecimento, quando se trata de microrganismos fastidiosos ou em níveis baixos de concentração. Tendo em conta o tempo desde a colheita até à análise deve ponderar-se o uso de meio de transporte. Convém ressaltar que o tempo excessivo entre uma etapa e outra pode levar a morte celular ou crescimento excessivo, contribuindo para resultados também incongruentes (17–19,31).

Soluções e diluentes humectantes, usadas em métodos indiretos, podem ajudar ou dificultar a recuperação, dependendo do organismo-alvo. Na maioria dos organismos o simples facto de usar superfícies humedecidas permitiu aumentar a recuperação entre 25–30%, contudo pode não ser linear, já que em *E. coli* ocorre diminuição (17).

Todos estes passos podem levar a que se comentam erros, sobretudo incremento de contaminações que conduzirão a resultados não representativos da população da amostra. Por outro lado, além de serem capazes de analisar áreas maiores que 100 cm², por geralmente exigirem a fricção entre o utensílio e a superfície amostrada, geram melhores resultados de recuperação e desprendimento de biofilmes (17–19).

Na maioria dos estudos as incubações dão-se a 37°C por 24–48h e alguns a 35°C durante o mesmo período de tempo. Para patógenos clínicos usa-se temperaturas entre 25–45°C (17).

Algumas técnicas de amostragem não são apropriadas para superfícies com alta carga biológica. Para superfícies altamente contaminadas, as esponjas foram significativamente melhores do que as placas de contato. Nestes casos, métodos diretos podem não ser os mais indicados, já que poderá haver crescimento exagerado e impossível de contar, levando assim a contagens imprecisas. Superfícies mais lisas são geralmente mais fáceis de recuperar. Alguns métodos de amostragem são inadequados para superfícies irregulares ou ásperas, como placas de contato. Alguns métodos são mais adequados para áreas menores e irregulares, como zaragatoas. Se for amostrada uma grande área de superfície, a escolha do método deve ser tida em conta, e o uso de esponjas e/ou panos podem facilmente servir de amostragem de grandes áreas de superfície. Alguns métodos, como placas de contato, permitem amostragem rápida e fácil interpretação e requerem menos preparação técnica. Outras técnicas, como as zaragatoas, podem ter variabilidade no método entre os técnicos e requerem alguma habilidade para permitir a recuperação adequada da amostra (17,18).

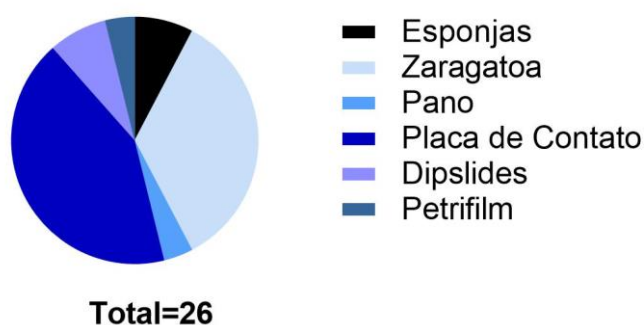


Figura 5– Escolha de métodos de recolha bacteriana

O método mais escolhido é a placa de contato, seguido de zaragatoa, com 11 e 9 vezes utilizados, respetivamente (Figura 5). O menos utilizado foi o Petrifilm™ e Pano com apenas uma referência de cada. Esponjas e *Dipslides* apresentam o mesmo número (n=2) de utilizações. Nota-se uma utilização maior de métodos diretos, provavelmente pela facilidade de uso face a métodos indiretos, mas sem diferença significativa.

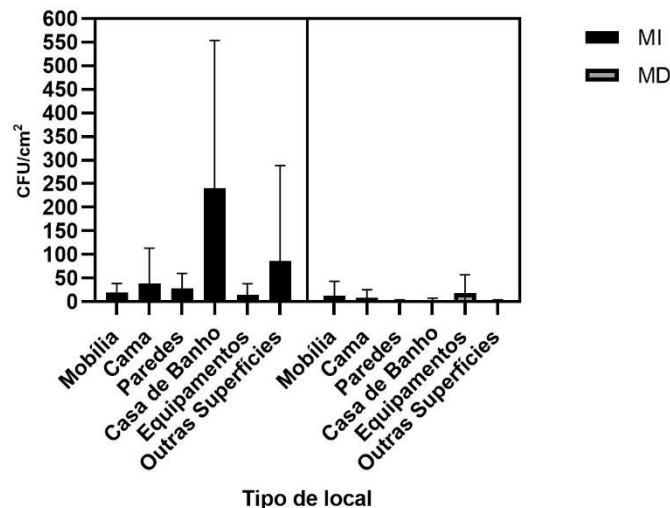


Figura 6– Comparação entre métodos de recolha direto e indireto em função do local

Legenda: (MI– Método indireto, MD– Método direto)

Pela análise dos resultados da figura 6, é possível verificar que a escolha de métodos de recolha indiretos mostram uma recuperação maior em termos de UFC face a métodos de recolha diretos. Quer o uso de meios de enriquecimento, a própria manipulação de amostra requerida, desde a extração até às diluições sucessivas e plaqueamento, podem levar ao aumento de bactérias recuperadas por contaminação da amostra. Não obstante, convém realçar que em métodos indiretos fazem-se análises de áreas superiores o que permite colmatar a diversidade no local de recolha, uma vez que nem todos os locais apresentam o mesmo grau de contaminação, e a mesma superfície apresenta zonas mais e menos contaminadas. Assim, pela análise de áreas maiores será possível recuperar mais bactérias que pelo uso de métodos diretos que se restringem a uma área menor, por isso, existe maior probabilidade de a amostra recolhida não ser representativa da população amostrada. Por outro lado, métodos indiretos geralmente são usados sobre superfícies húmidas ou humedecidas o que permite uma maior libertação e desprendimento da superfície da amostra, sendo importante sobretudo ao nível dos biofilmes, que devido às suas propriedades estabelecem ligações fortes e resistentes com a superfície, que um simples contacto não será capaz de desprender, enquanto um esfregaço o poderá ser. A diferença de resultados pode ainda ser justificada pelo facto dos métodos diretos, sobretudo zaragatoa, serem mais usados e, por isso, de forma mais correta, ao passo que, os métodos indiretos como requerem uma correta aplicação, sobretudo de tempo e pressão, podem conduzir à obtenção de resultados inferiores aos valores reais. A dificuldade de recuperação em métodos diretos pode também justificar-se pelo *stress* causado nas bactérias e pela não germinação dos esporos. A suplementação com lisozima, induz a germinação de esporos permitindo maiores taxas de recuperação (72).

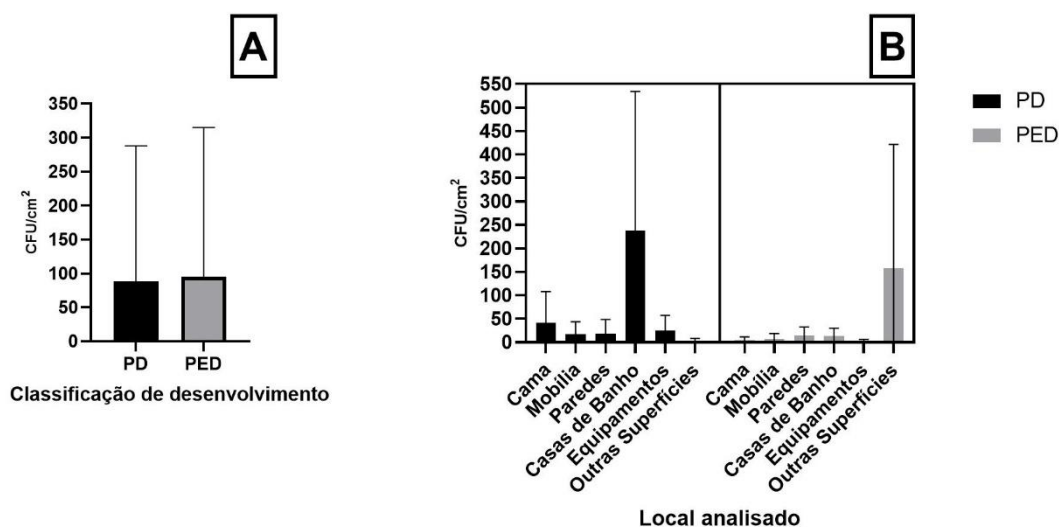


Figura 7– Comparação entre desenvolvimento dos países e o grau de contaminação

Legenda: A- Comparação de grau de contaminação de superfícies totais em função do desenvolvimento dos países, B- Comparação do grau de contaminação de superfícies por zona analisada, em função do desenvolvimento dos países. Legenda: PD- Países desenvolvidos, PED- Países em desenvolvimento

Quanto à diferença entre países desenvolvidos ou em desenvolvimento (Figura 7), não se apresentam valores muito distantes, o que não era esperado, já que os países desenvolvidos evidenciam maior controlo e preocupação em relação a IACS e contaminação de superfícies, contudo não houve diferença estatisticamente significativa (14,73–76). Nos países desenvolvidos a área mais contaminada é a 'Casa de banho' ao passo que nos países em desenvolvimento a área mais contaminada é 'Outras Superfícies'.

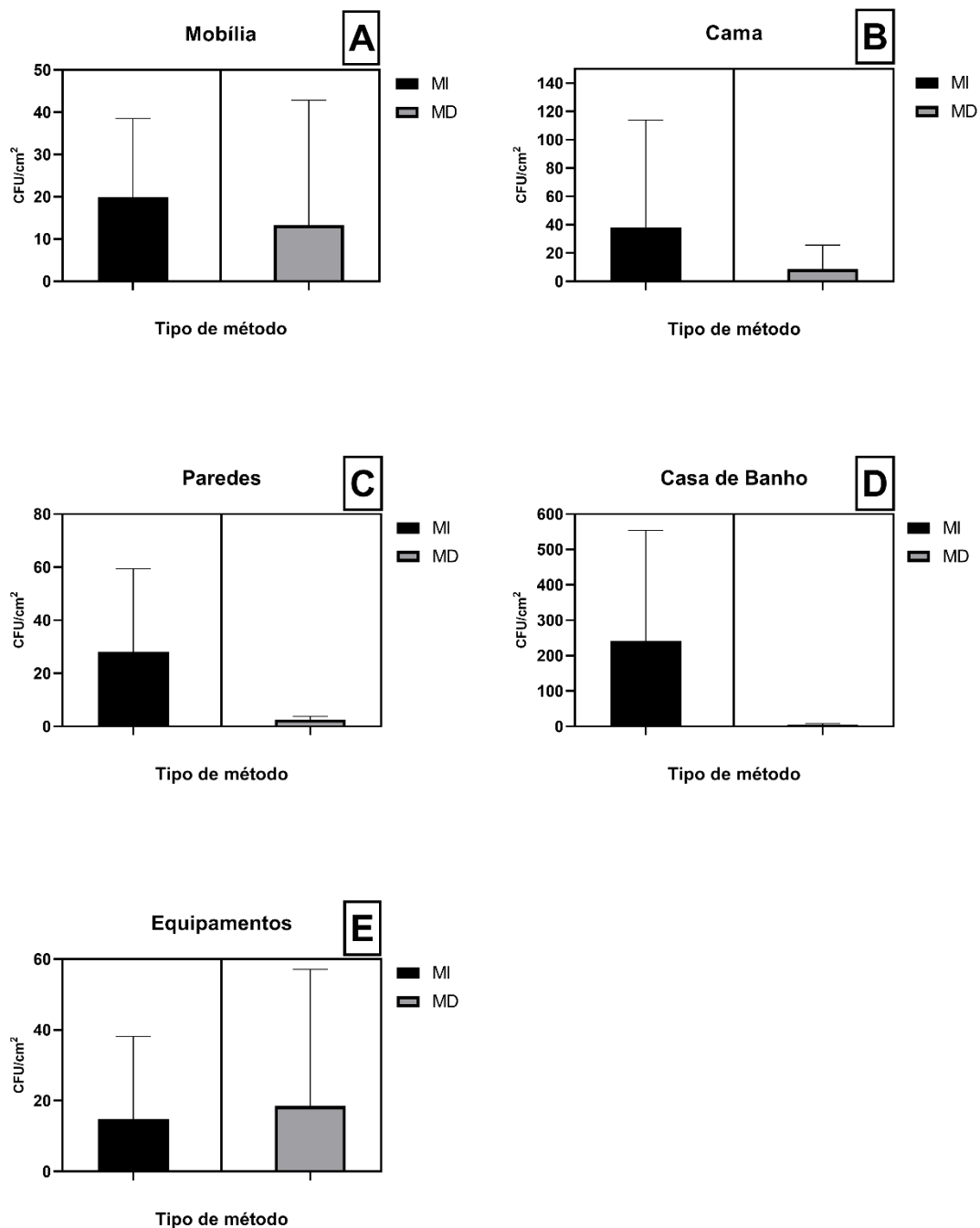


Figura 8– Concentração bacteriana em função do tipo de método usado em diferentes zonas
 Legenda: MI– Métodos indiretos; MD– Métodos diretos; A– Mobília; B– Cama; C– Paredes; D– Casa de Banho; E– Equipamentos

Quanto às subsecções, Mobília, Cama, Casa de Banho, Equipamentos E Paredes, apresentam maiores resultados para métodos indiretos à exceção de Equipamentos, contudo sem diferença estatística (Figura 8). No grupo dos Equipamentos convém ressaltar que existem zonas mais tocadas que outras, restringindo-se os métodos diretos à análise de zonas de alto toque. Nos métodos indiretos, a área analisada é maior e por isso serão concomitantemente analisadas áreas de alto toque e áreas de menor toque ou ausência de toque, o que fará baixar o grau de contaminação. Por outro lado, alguns

equipamentos são de plástico, outros ainda revestidos com plástico, o que com uso de zaragatoa húmida torna difícil a extração bacteriana pela elevada aderência dos plásticos à humidade. Quando realizado testes de remoção de *outliers*, permaneceu a ausência de diferenças estatísticas significativas para intervalo de confiança usado. Contudo aplicado intervalo de confiança de 90%, o subgrupo Móvel mostrou diferença estatística significativa com um valor próximo dos 95% ($p=0,0558$).

Equipamentos eletrónicos e computadores perto da cama do doente contribuem para a transmissão de patógenos causadores de infeção no hospital, sendo encontrados em mais de 50% dos computadores. Como se trata de algo tocado por diferentes profissionais de saúde e por estar perto do doente devem ser limpos várias vezes e tocados preferencialmente usando luvas, para evitar cruzamentos e proliferação de bactérias (77).

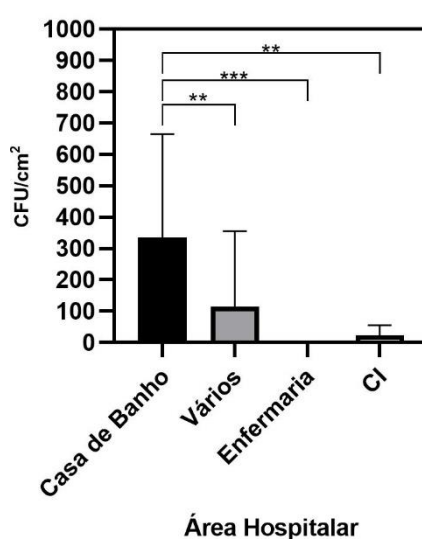


Figura 9– Comparação do grau de contaminação de superfícies em função da área hospitalar
Legenda: **– $p<0,01$, ***– $p<0,001$

Efetuada uma análise estatística com o teste ANOVA (Figura 9), observaram-se diferenças significativas entre UFC de Casa de banho e Cuidados intensivos ($p=0,0011$), entre 'Casa de banho' e 'Vários' ($p=0,0061$) e entre 'Casa de banho' e 'Enfermaria' ($p=0,0008$). A média mais baixa é apresentada pelas enfermarias, seguida de vários e cuidados intensivos.

Estes resultados vêm comprovar aquilo que já a literatura havia concluído que zonas não-clínicas (zonas sem cuidados médicos invasivos) apresentam maiores taxas de contaminação, uma vez que são mais descuidadas quanto à limpeza, feitas sobretudo por pessoal sem conhecimento técnico ou microbiológico. Além disso, são zonas com menos controlo microbiológico, ao contrário de zonas clínicas (zonas de cuidados invasivos), que além de serem mais controladas, são limpas com maior regularidade e acompanhadas por pessoal técnico (enfermeiras, médicos) que apresentam mais conhecimento sobre o cuidado necessário, o risco associado, bem como a biodiversidade e comportamento das bactérias.

Um caso simples refere-se, por exemplo, a zonas de sala de espera, onde as revistas são uma fonte de patógenos, nem sempre valorizada, mas que apresenta risco. A implementação de desinfecção de mãos antes e depois da utilização assume assim grande importância. Além disso, a higienização das mãos deveria ser obrigatória para todas as áreas hospitalares antes de entrar e ao sair para evitar proliferação de patógenos quer entre unidades, quer entre pessoas, quer entre comunidade e hospital (78).

Da mesma forma, enquanto que os produtos de limpeza de zona clínica, sobretudo panos e esponjas são utilizados de forma única, os mesmos produtos na zona não-clínica são usados em locais diferentes, o que conduz a uma potencial fonte de transmissão e cruzamento de espécies diferentes, aumentando a carga microbiana, mas também a resistência associada. Uma única colónia multirresistente pode ser transferida para um local diferente, proliferar e tornar-se causa de infeção. Além de reutilização de produtos, águas de limpeza são comumente reutilizadas para áreas diferentes o que não sucede em zonas não-clínicas. Para limpar e desinfetar superfícies ambientais tradicionalmente usa-se um método de duas etapas, detergente e subsequente desinfetante, com panos descartáveis ou reutilizáveis. Para evitar a propagação da contaminação, os panos reutilizáveis devem ser adequadamente limpos e desinfetados. Panos descartáveis podem resolver essa potencial fraqueza, contendo solução de H_2O_2 a 0,5% ou hipoclorito de sódio <3% que até é mais eficaz que o processo tradicional de duas etapas. Siani *et al.* (2018) e Casini *et al.* (2018) demonstraram que o uso de um o produto de limpeza pré-impregnado proporcionou um melhor controlo da carga microbiana nas superfícies, procedimentos de desinfecção simplificados face à prática de usar solução diluída de hipoclorito em um balde em combinação com pano (79,80).

Por outro lado, embora ambas as zonas sejam acessíveis por profissionais de saúde, em zonas não-clínicas, a interação é feita com uso de material de proteção, mais relevante, de luvas, o que impede a transmissão entre doentes e entre profissionais de saúde, ao passo que zonas não-clínicas, o contato é mais descuidado, sem utilização de luvas, fazendo uso de estetoscópios não desinfetados entre doentes diferentes, potenciando a contaminação e aquisição de IACS. Por fim, zonas não-clínicas, permitem o acesso de visitas, ou seja, portas de entrada de infeções da comunidade para o meio hospitalar, bem como o contato com as superfícies permite troca de bactérias entre áreas diferentes do hospital (quarto, casa de banho, salas de espera). O contrário, infeções do contexto hospitalar para a comunidade, são igualmente preocupantes, quer pela sua propagação, quer pelo ganho de resistência e dificuldade de tratamento (81,82).

Diferentes técnicas de amostragem recuperam espécies diferentes com sucesso variável, além de que o mesmo organismo pode recuperar-se de maneira diferente com técnicas diferentes (17). Para *C. difficile* as esponjas apresentaram maior recuperação face às zaragatoas, 52% e 0% respetivamente. Por outro lado, as zaragatoas são melhores do que as placas de contato para a recuperação de bactérias Gram-negativo. As placas de contato TSA foram melhores para *Acinetobacter sp.* e *Pseudomonas spp.*

Para Enterobacteriaceae, os *dipslides* deram maiores recuperações. Para *P. aeruginosa* e *Salmonella sp.*, as zaragatoas eram melhores do que as placas de contato (17). *Dipslides* têm muito potencial sobretudo pela sua flexibilidade, pelo que devem ser estudadas para uso hospitalar. Zaragatoas de *Nylon* são melhores que as restantes. *Petrifilm™* é melhor para *S.aureus* metecilina-resistente (17).

Claro *et al.* (2014) quando comparam os 3 métodos (*Petrifilm™*, placas de contato e zaragatoa), concluem que a recuperação mais inferior se deu para as zaragatoas (83). No entanto, Dolan *et al* (2011) mostraram que o uso de neutralizante se mostrou mais sensível que uso de solução salina, mostrando ainda que zaragotas de *Macrofoam*, seguida de zaragatoa de *Nylon*, apresentaram melhores resultados que placa de contato na deteção de *S. aureus*. As zaragatoas são frequentemente usadas para obter superfícies ambientais, mas o material da zaragatoa desempenha um papel importante, mas muitas vezes esquecido. O uso de zaragatoas de *Nylon* e zaragatoas de *Macrofoam*, apesar do custo extra, apresentam melhor desempenho. Ao que tudo indica, zaragatoas de algodão apresentam os piores resultados (34). Aires-de-Sousa *et al.* (2018), mostraram que o uso de gazes humedecidas foi melhor que uso de toalhetes ou zaragatoa de algodão na recuperação de *S.aureus* (84).

As células adsorvidas são melhor recuperadas com métodos de contato direto, como placas de contato e *Dipslides*. No entanto, convém relembrar que pressão insuficiente não recuperará todos os organismos da superfície, sendo aconselhado o treino constante para aplicação de força necessária ou uso de aplicador de pressão. O tempo de contato de 10s deve ser respeitado para obter a máxima recuperação, com um peso de 500 g (17).

Estes métodos tradicionais são métodos muito sensíveis, relativamente baratos e eficientes, permitem o isolamento de mais do que um microrganismo patogénico ou indicador e podem ser usados quer para identificação, quer para contagem de microrganismos em estudo. No entanto, estes métodos são lentos, implicam um trabalho intenso como a preparação e inoculação de meios de cultura e a contagem de colónias, sendo necessário um grande treino de qualificação. Outra desvantagem apontada aos métodos dependentes de cultura deve-se ao facto de as células stressadas poderem não ser facilmente recuperáveis, pelo que não são detetadas em meios seletivos, o que leva a falsos negativos e à dificuldade em detetar alguns organismos com crescimento fastidioso, como *Campylobacter jejuni* (45,61,85)

Embora se faça uso de métodos acreditados e validados, a falta de uniformidade entre análises, a falta de *guidelines* e orientações sobre o tipo de local a amostrar, procedimento e tipo de técnica a utilizar para cada espaço, bem como periodicidade da análise torna impossível a comparação de resultados, além de deixar a área hospitalar vulnerável à instalação e proliferação de patógenos causadores de IACS pela falta de controlo. No que toca à área alimentar, tudo está definido e regulamentado, como por exemplo, o diluente usado deve ser água peptonada tamponada, numa solução de 1g/L ou solução de Ringer com um quarto de força com neutralizantes também definidos. Em caso de deteção de microrganismos define-se

uma área entre 1000cm² e 3000cm² enquanto para enumeração é definido 100cm². Se as amostras não são feitas rotineiramente, devem ser recolhidas em dias diferentes da semana para compensar as mudanças que possam existir como manutenção, aumento de uso, etc. As placas só devem ser usadas em superfícies planas e pressionadas por 10s a uma pressão de 500g, as zaragotas para áreas <100cm² e esponjas para largas áreas como >100cm². Nas zaragatoas devem ser passadas em superfícies planas 10 vezes em cada direção, vertical e horizontal. As placas devem ser transportadas a temperaturas entre 1-8°C e incubadas até 48h da amostragem, as zaragatoas até 24h. A expressão de resultados esta também definida, existindo fórmula para cálculo (37).

Segundo a literatura o espaço não-clínico é o que apresenta maior contaminação microbiológica, seguido do lavatório e da cama. Estas conclusões justificam-se pelo facto de estas zonas não serem controladas diariamente, ao contrário do espaço clínico para o qual existem *guidelines* que obrigam a que sejam realizadas as análises e cuidados previstos de forma a terem evidencias para a sua garantia da qualidade dos serviços (82).

Normalmente a deteção de microrganismos faz-se com recurso a cultura microbiológica, contudo, requer trabalho intensivo de laboratório e alguns dias de espera para obtenção do resultado. Há métodos alternativos de biologia molecular, como a *ligase chain reaction* (LCR), *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) *Microarrays* e *Polymerase chain reaction* (PCR), que demoram apenas algumas horas. No entanto, são métodos dispendiosos quando não aplicados a grande escala e necessitam de pessoal e equipamento especializado para o seu processamento.

A PCR baseia-se na amplificação de um gene ou sequência de ADN específica e previamente conhecida (ADN alvo), dentro de determinadas condições estipuladas, combinando a temperatura e o tempo de reação. Existem essencialmente dois tipos de PCR, o convencional (requer posterior eletroforese em gel) e o PCR em tempo real, através da deteção de fluorescência, faz uso de sondas ou agentes intercalantes que permitem a deteção de fluorescência e quantificação do ADN alvo presente na amostra, isto é, com o aumento do número de cópias, há uma maior fluorescência emitida. Quando a sequência está presente, os *primers* (cadeia nucleotídica complementar) hibridizam, havendo amplificação e fluorescência. Quando não existe, não há amplificação nem fluorescência (86).

A LCR é um processo de amplificação que difere da PCR na medida em que envolve uma ligase termoestável para unir duas sondas ou outras moléculas que podem ser amplificadas pelo ciclo padrão de PCR. Assim, a LCR requer duas enzimas completamente diferentes para operar adequadamente: ligase, para unir moléculas da sonda e uma polimerase termoestável (por exemplo, Taq polimerase) para amplificar as moléculas envolvidas na ligação bem-sucedida. As sondas envolvidas na ligação são projetadas de modo que a extremidade 5' de uma sonda é diretamente adjacente à extremidade 3' da outra sonda, fornecendo assim os substratos necessários do grupo 3' -OH e 5' -PO₄ para a ligase. No final com

uso de anticorpos, só se verifica fluorescência quando as duas sondas estão ligadas (87). Assim, a LCR não é necessariamente uma alternativa, mas um complemento, à PCR.

A tecnologia de *microarrays* resume-se a poços onde existem sondas nucleotídicas. O ADN da amostra é colocado em contato com as sondas, e, caso seja complementar emparelha indicando a presença daquela sequência genética, sendo depois analisado por emissão de fluorescência. Assim, com uso de sondas específicas para genes de determinados microrganismos, consegue-se identificar com precisão qual está presente (88).

O ELISA, é um teste muito sensível e usado para detetar e quantificar substâncias, incluindo anticorpos, antígenos, proteínas, glicoproteínas e hormonas. A deteção desses produtos é realizada pela complexação de anticorpos e antígenos para produzir um resultado mensurável. Um anticorpo é um tipo de proteína produzida pelo sistema imunológico de um indivíduo. Esse tipo de proteína possui regiões específicas que se ligam a antígenos. Um antígeno é uma proteína que pode vir de alguma fonte estranha, no caso bactéria, que quando ligada a um anticorpo, induz uma cascata de eventos através do sistema imunológico do corpo. Essa interação é utilizada no teste ELISA e permite a identificação de anticorpos e antígenos específicos de proteínas, com apenas pequenas quantidades de uma amostra de teste. A ligação é normalmente visualizada pela conjugação de fluorescência ao anticorpo, em que este, quando ligado emite fluorescência que pode ser vista e quantificada (89,90).

Em casos mais raros, é usado *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight* (MALDI-TOF) e consiste num sistema no qual o material biológico, no caso, o inóculo bacteriano, é colocado numa matriz polimérica, sendo posteriormente irradiado com um laser que vaporiza a amostra causando ionização de várias moléculas, que são aspiradas num tubo de vácuo e levadas a um detetor. O tempo que a molécula demora até chegar ao detetor, chamado *time of flight*, é único tal como uma impressão digital permitindo rapidamente obter com certezas de que estirpe bacteriana se trata. Obtém-se um gráfico de picos característico com análise computadorizada (78,91,92).

Recentemente têm sido introduzidas técnicas de sequenciação de AND, permitindo substituir a caracterização convencional de patógenos pela morfologia, propriedades de coloração e critérios metabólicos, sendo estes identificados pelo genoma (93).

O desenvolvimento de métodos que permitam instantaneamente obter uma resposta da presença ou não do microrganismo, e a possibilidade de quantificar de forma específica e sensível, tornam-se cruciais. Assim, as técnicas de deteção ideais seriam simples, portáteis, rápidas, sensíveis e quantificáveis.

Um dos métodos mais recentes é a *zaragatoa* de bioluminescência de ATP (adenosina trifosfato). O ATP está presente em todos os organismos biologicamente ativos, incluindo microrganismos, sendo assim possível verificar a presença de microrganismos vivos nas superfícies hospitalares recorrendo à deteção de ATP. A técnica requer o uso de *zaragatoa*, seguida de reação de ATP com enzima luciferina e

luciferase, resultando na emissão de luz (um fóton por cada molécula de ATP presente), sendo a luz detetada por um luminómetro portátil. Além de ser rápido, portátil e de fácil uso, com resposta em poucos segundos, permite ainda a adoção de medidas corretivas que evitem problemas posteriores. A técnica torna-se inovadora pelo facto de permitir visualizar o estado de limpeza. A zaragatoa de bioluminescência não apresenta resultados significativamente diferentes quando comparado com a zaragatoa comum. Como desvantagens apresenta o facto de não diferenciar microrganismos patogénicos de comensais, nem mesmo bactérias de fungos, pelo que a análise resulta em valores de microrganismos totais, não substitui os métodos microbiológicos clássicos no isolamento de espécies patogénicas e determinação de uma cadeia de contaminação cruzada (57,85,94,95). Griffith *et al.* (2002) e Malik *et al.* (2003) demonstraram que a zaragatoa de bioluminescência de ATP é um indicador útil de limpeza no ambiente hospitalar, dando uma indicação de que essa técnica pode ser útil como uma ferramenta educacional (35,54). Douglas and Rothwell (1991) mostraram ser útil na visualização da limpeza em clínicas dentárias (94).

Outro exemplo de técnica rápida é o uso de biossensores. Os biossensores são constituídos por uma molécula de origem biológica (anticorpo, enzima, ácido nucleico, etc.) conjugada com um sistema físico-químico que reconhece um sinal, permitindo assim a observação da interação entre antígeno-anticorpo. Além de serem rápidos, sensíveis, de fácil uso, versáteis, flexíveis e portáteis, permitem obter uma fluorescência estável. Como se trata de análises de superfícies, o uso deste método em alguns casos requer um passo extra de preparação de amostra, ou seja, a amostra poderá ser colhida com uma zaragatoa, mas esta terá de ser agitada em tampão e uma alíquota desta suspensão analisada, o que poderá conduzir a erros técnicos, contaminação ou alíquota ter concentração insuficiente para ser detetada (89,96–99).

Lateral flow immuno-assay (LFIA) com *quantum dots* (QDs), baseia-se na ligação de anticorpos. No mesmo biossensor, na primeira linha (linha de teste) são colocados adsorvidos anticorpos para ligação ao microrganismo alvo e uma segunda linha (linha de controlo) com anticorpos para ligação a um segundo anticorpo que está presente na solução de tampão. Quando colocada a amostra, adiciona-se a solução de tampão/solução de corrida que contém anticorpos com especificidade para se ligar ao microrganismo e ao anticorpo adsorvido na linha de controlo. Quando o microrganismo está presente, será possível visualizar o aparecimento de duas linhas fluorescentes com recurso a lâmpada ultravioleta, quando ausente apenas ficará visível uma linha. Os biossensores mostraram propriedades únicas de fluorescência, em particular sinais de fluorescência fortes e estáveis, sendo a intensidade do sinal proporcional à concentração (89). Hu *et al.* (2020) mostrou que o seu uso foi eficaz na deteção de *Salmonella typhimurium*, sendo sensível, específico e preciso. No mesmo biossensor, é comparado o sinal de *S. typhimurium* na presença de *E. coli* e *S. aureus* (89). Se há diferenças entre *S. typhimurium* e os restantes microrganismos, então é possível afirmar que cada microrganismo terá a sua própria emissão

de fluorescência. Assim, poder-se-á futuramente num mesmo biossensor fazer análise de diferentes microrganismos, o que é de extrema importância sobretudo pela rapidez de obtenção de resposta para uso em contexto hospitalar.

Na mesma linha de pensamento, Suaifan *et al.* (2017), desenvolveram também um biossensor, com uma sonda magnética de nanoesferas de péptidos, que são clivados especificamente por proteases. No presente estudo foram usadas proteínas que seriam clivadas por proteases de virulência de *S. aureus*. Essa sonda, então integrada a uma plataforma de detecção permite fornecer um biossensor de diagnóstico em formato de tira específico e econômico para a detecção qualitativa e quantitativa de *S. aureus*, podendo ser lido a olho nu (100).

Bandara *et al.* (2015), usou um outro método de biossensor, o sistema *ionic self-assembled multilayer of a long-period grating* (LPG-ISAM) que fornece uma detecção específica de MRSA numa hora. Este ensaio pode ser operado por pessoal não especializado e permite a determinação precisa do MRSA com tratamento mínimo da amostra. O ensaio também pode ser aplicado a uma variedade de outros agentes infecciosos como sugere o autor (98).

Cooper *et al.* (2011) desenvolveu sondas oligonucleotídicas para detecção de *F. tularensis* obtendo resultados consistentes e específicos, sem amplificação por PCR. As sondas portáteis de detecção com a ligação de sondas de ADN ou imunoglobulinas (IgG) diretamente à superfície da fibra permitem que cada sonda possa consistir em um número de fibras multiplexadas juntas, cada uma visando uma sequência ou antígeno de ADN diferente. Durante o teste das amostras, a ligação/hibridação do antígeno alterará as propriedades e produzirá uma saída observável indicando a presença e a concentração de cada antígeno alvo. O ensaio não requer marcação, pré ou pós-tratamento ou amplificação do ADN ou anticorpos, utiliza menos material da sonda e é rápido, reutilizável e relativamente barato. Assim, o mesmo pode ser desenvolvido para outros tipos de microrganismos, tornado a sua detecção mais rápida (99).

Wojciechowski *et al.* (2010), utilizando o sistema de Detecção Eletroquímica Multiplexada mostrou ser possível detetar toxina bacteriana enterotoxina estafilocócica B (SEB), *Y. pestis* e *Bacillus anthracis* em baixas concentrações. A tecnologia representa avanços substanciais em aplicativos de *point-of-care* e *point-of-use* (96).

Além de métodos de detecção, também têm sido desenvolvidos meios que permitam a diminuição de contaminações e por isso, redução de infeções, sobretudo IACS. Um exemplo, passa pelo revestimento de superfícies e instrumentos por certo tipo de materiais que aparentemente sejam menos suscetíveis à contaminação de microrganismos. O revestimento antimicrobiano permite obter redução da carga microbiana, não apresenta irritabilidade nem complicações com o organismo humano (101,102). Por outro lado, a falta de conhecimento sobre que tipo de superfícies podem ser revestidas com tais materiais, o facto de não eliminar por completo todos os microrganismos e o custo elevado que acarreta, tornam-se as principais desvantagens.

Cooper *et al.* (2016), desenvolveram cateteres antibacterianos tratados com prata para tentar resolver as infeções no trato urinário, os quais demonstraram boa eficácia contra microrganismos comuns responsáveis por infeções urinárias e podem ser sugeridos como uma estratégia interessante para a prevenção de infeções (101).

Casey *et al.* (2010) mostraram que o revestimento de cobre elimina inúmeros microrganismos *in vitro*, incluindo *Escherichia coli*, *MRSA*, *Listeria monocytogenes*, vírus *influenza A* e *C. difficile*. Revestimentos de cobre apresentam reduções de contaminação superiores a 98% (103).

Montero *et al.* (2019) testaram em ensaios *in vitro*, o uso de cobre contra vários patógenos bacterianos, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* O157: H7 e *Listeria monocytogenes*. Também foram avaliadas quatro superfícies de alto toque, incluindo grades de cama e mesa-de-cabeceira. O cobre mostrou mais uma vez, ser um novo revestimento auto-higienizante, exibindo atividade bactericida contra importantes patógenos humanos e reduz significativamente a carga microbiana, em cerca de 90%, das superfícies hospitalares (104). O mesmo concluiu Colin *et al.* (2020), ao afirmar o cobre como importante na redução da contaminação e propagação bacteriana (92).

Uma outra alternativa no controlo de IACS passa pelo uso de materiais que apresentem menor contaminação e redução maior após limpeza como é o caso de cerâmica. Por exemplo, enquanto superfícies como vinil e madeira revestida parecem ser mais contaminadas antes da limpeza, superfícies metálicas parecem aumentar a contaminação após limpeza (82). Contudo, entende-se a impossibilidade de alguns instrumentos como camas, corrimãos e instrumentos médicos neste tipo de material.

Enquanto a limpeza diária à base de produtos químicos, sobretudo com cloro, permite uma redução apenas momentânea da contaminação microbiana, uma limpeza microbiana (baseada em probióticos) é mais eficaz na redução do número de microrganismos relacionados às IACS nas superfícies, quando comparado aos produtos de limpeza convencionais, mesmo aqueles que contêm moléculas desinfetantes. Enquanto os produtos apresentam solução instantânea, a limpeza com probióticos parece apresentar melhores resultados a longo prazo. Esta estratégia além de inovadora é também mais económica e capaz de neutralizar ou (bio)controlar patógenos associados à saúde. Por outro lado, o uso de bactérias gera sempre conflito, uma vez que um doente estando exposto a microrganismos, embora aparentemente inofensivos, estes poderão igualmente levar ao desenvolvimento de uma infeção, sobretudo em doentes imunossuprimidos. No entanto, é indiscutível que esta opção seja preferível a um ambiente com microrganismos cada vez mais resistentes (9). Vandini *et al.* (2014), mostraram que de facto o uso de probióticos se torna a longo prazo, uma solução melhor que o uso de químicos (9).

O dispositivo de luz ultravioleta pulsada de Xénon (PX-UVD) é uma tecnologia emissora de luz ultravioleta C (UV-C), uma tecnologia que não necessita de toque com a superfície e que liberta energia de luz UV de amplo espectro de alta intensidade. Devido à carga de energia libertada, notam-se efeitos germicidas resultando em danos celulares por fotohidratação, cisão de fotões, fotodimerização e

reticulação fotoquímica, inibindo assim a replicação celular. Um aumento do tempo de utilização de 14 min a 46,000 $\mu\text{Ws}/\text{cm}^2$ a 57 min a 22,000 $\mu\text{Ws}/\text{cm}^2$ apresenta ainda efeitos esporicidas, sendo uma mais-valia já que os esporos são difíceis de eliminar das superfícies devido à sua grande capacidade de resistência(2). Além disso não exige alterações na ventilação da sala, não deixa resíduos após o tratamento e tem um amplo espectro de ação e tempos de exposição rápidos (2,4,105,106).

Utilizando esta tecnologia de PX-UVD, Dippenaar *et al.* (2018) mostraram uma redução sustentada na colonização bacteriana de superfícies, redução da contaminação cruzada e redução da disseminação de infeções bacterianas resistentes em ambiente hospitalar (106). Também Villacís *et al.* (2019) mostraram em MRSA, VRE e *C. difficile*, uma mudança de 27%, 29,5% e 22,7% dos locais após limpeza rotineira para 3.3%, 4.9% e 0% após uso de desinfecção por UVC (105).

Hosein *et al.* (2016) e Casini *et al.* (2019), concluíram que a implantação de dispositivos PX-UV pulsados pode colmatar a inadequação da limpeza manual e complementá-la, bem como melhorar a qualidade sanitária do próprio hospital ou unidades de cuidados de saúde, podendo mesmo ajudar no combate e redução de IACS, de acordo com Dippenaar *et al.* (2018) e Villacís *et al.* (2019) (2,4,105,106).

Em relação à solução desinfetante a mais comumente utilizada para desinfecção é o hipoclorito de sódio (NaClO). No entanto, este produto apresenta toxicidade para os seres humanos, provocando irritação da pele e mucosas, bem como irritante e nocivo para o sistema respiratório. O desenvolvimento de novos desinfetantes assume assim importância para colmatar as desvantagens dos atuais (4). Hosein *et al.* (2016) apresentava uma alternativa, dicloroisocianurato de sódio (NaDCC), que apresenta vantagens em termos de custo e segurança, além de mostrar resultados superiores ao NaClO por inativar várias espécies microbianas. O sistema de Vapores de Peróxido de Hidrogénio (HPV) também se tem mostrado eficaz na redução da carga microbiana inicial, bem como atrasar a recolonização de patógenos nas superfícies (103,107–109). Curiosamente, Otter *et al.* (2007) mostrou que nenhum MRSA foi identificado até uma semana após o HPV, apesar da presença de doentes colonizados por MRSA na Unidade de Cuidados Intensivos (UCI) e a frequência de contaminação por MRSA não retornou aos níveis de pré-limpeza até as quatro semanas após o HPV. A contagem de colónias totais retornou aos níveis de pós-limpeza em 24 e 48 horas e para os níveis de pré-limpeza 1 semana após o HPV (110).

5. Conclusão

O ambiente hospitalar assume um papel importante como fonte de microrganismos patogénicos, não só pelas mãos dos profissionais de saúde, mas também nas superfícies inanimadas e utensílios. A implementação de sistemas de controlo de limpeza, práticas corretas, limpeza e desinfeção bem executadas tornam-se cruciais para a redução de microrganismos patogénicos e consequentemente para a redução de IACS.

A limpeza e desinfeção destroem os nichos de patógenos sendo responsáveis pela diminuição do número de infeções secundárias. Os métodos de limpeza comumente utilizados não permitem a redução para níveis de total limpeza e desinfeção. Não parece haver diferença estatística entre uma superfície de alto toque depois de limpa em comparação com uma superfície de baixo toque. A quantidade de vezes que as superfícies são limpas parece ser mais importante e eficaz do que o tipo de detergente usado. Os níveis de contaminação os mais altos encontram-se nos espaços limpos pelo pessoal da limpeza, em contraste com zonas limpas pelo pessoal clínico; isto acontece talvez por falta de formação, pelo uso de materiais comuns a várias zonas, descuido, mas também uso de produtos de limpeza menos eficazes, ao passo que na zona clínica o material é maioritariamente de utilização única o que diminui a propagação. O uso de panos impregnados com desinfetante de utilização única é mais eficaz que o método tradicional de uso de detergente seguido de desinfetante, com reutilização de panos.

A eficácia da limpeza e desinfeção é na maioria das vezes controlada pela redução de bactérias como *Salmonella*, *E.coli*, *Listeria monocytogenes* ou bactérias totais a nível alimentar. Em contexto hospitalar a pesquisa é feita por bactérias totais ou por bactérias específicas suspeitas de estarem presentes nas superfícies, contudo sem protocolos nem orientações pré-definidas.

A escolha do método de recuperação deve ser pensada tendo em conta as variáveis: tempo, local de amostra, pessoal habilitado e treinado, os recursos disponíveis, tipo de análise, quantitativa ou qualitativa. Cada método de amostragem traz consigo vantagens e desvantagens que merecem a máxima atenção por quem realiza a análise, e cada passo da mesma deve ser previamente preparado e fundamentado.

Petrifilm™ é mais eficaz na recolha de microrganismos que as placas de contato, no entanto estas são adequados para recolher amostras de superfícies pouco contaminadas. As placas RODAC apresentam mais sensibilidade na deteção de bactérias Gram-positivo face a bactérias Gram-negativo, no entanto não podem ser usadas em zonas curvas e irregulares do meio hospitalar. São usadas, por exemplo, para controlo de limpeza do setor farmacêutico.

A zaragatoa quer seja de *Nylon*, *Macrofoam*, *Rayon* ou Algodão, permite a amostragem de diversas superfícies. A zaragatoa de *Nylon* apresenta mais eficácia na recuperação de microrganismos face à tradicional zaragatoa de algodão uma vez que não permite que os microrganismos penetrem,

mantendo-se estes à superfície da mesma, como é o caso de *S. aureus*. Estas são usadas sobretudo na área alimentar.

As esponjas apresentam a vantagem de recuperação em superfícies maiores, além disso, o facto deste método possibilitar a aplicação de mais força na colheita, torna-o ideal para a recuperação de maior quantidade microbiana já que permite romper os biofilmes. É ainda capaz e efetivo na recuperação de esporos, como é o caso de *Bacillus anthracis*. Os métodos tradicionais permitem não só uma análise qualitativa, mas também quantitativa. Apesar de grande especificidade e sensibilidade são morosos e requerem trabalho minucioso, sendo por isso necessários métodos mais rápidos e simples.

Outros tipos de métodos emergentes têm sido, e devem ser cada vez mais incorporados, como marcadores fluorescentes e ATP bioluminescência, biossensores, de modo que permita ser possível verificar visualmente o estado de limpeza, bem como métodos *no-touch* como luz UV-C ou vapores de peróxido de hidrogénio. Revestimentos de superfícies devem ser estudados quanto ao custo e aplicabilidade, uma vez que revestimentos de prata e cobre apresentam redução de cargas microbianas.

Métodos emergentes como o de ATP bioluminescência têm sido usados na indústria farmacêutica e cosmética, uma vez que permitem de forma rápida, obter informação sobre o estado de limpeza das superfícies e, assim, tomar medidas efetivas e preventivas a baixo custo.

Por outro lado, o desenvolvimento de biossensores múltiplos para deteção e quantificação dos principais microrganismos causadores de IACS, permitirão uma deteção atempada possibilitando assim a implementação de medidas de controlo e consequentemente redução da prevalência de IACS.

A falta de *guidelines* na área da saúde é preocupante quer para os profissionais de saúde que não têm noção do estado de limpeza em que se encontram as superfícies, mas também, e mais importante, para os próprios doentes, já que podem ser expostos a diferentes tipos de microrganismos, até mesmo resistentes a antibióticos conduzindo a comorbilidades, podendo até levar à morte. A análise da contaminação microbiológica cabe assim ao hospital ou unidades de saúde, sendo o método e periodicidade da análise escolhida pelos mesmos, não sendo possível a uniformização de resultados e práticas e consequentemente nem a sua comparação. Zonas não analisadas potenciam a não perceção do estado de limpeza, o aumento de risco de propagação de microrganismos e por fim, o aumento de IACS.

Ações de formação e sensibilização devem ser incorporadas para todo os profissionais que integram o hospital, por forma a terem consciência da exigência do grau de limpeza, da forma como melhor limpar e desinfetar, bem como serem alertados para falhas técnicas e comportamentos de risco. Uma comunidade consciencializada e uma direção atenta e preocupada com esta problemática terão certamente melhores níveis de limpeza e desinfecção e posteriormente, menor número de IACS.

Tendo em conta as limitações do estudo e que a presente revisão da literatura teve como objetivo verificar, analisar e sistematizar informação sobre qual o método de recolha microbiológica mais usado e adequado para avaliação da contaminação microbiológica em contexto hospitalar, bem como identificar

as zonas críticas, não foi possível aferir qual o método mais indicado, sendo, no entanto, referido ao longo da revisão vantagens e desvantagens dos diferentes métodos referidos, além de serem sugeridas melhorias na adoção de um protocolo de análise microbiológica de superfície mais adequado às áreas hospitalares.

Em suma, a área hospitalar no que se refere a zonas de técnicas invasivas são melhor controladas face às restantes áreas, tornando estas, zonas de proliferação e de risco para o desenvolvimento de IACS. A criação de *guidelines* poderá não só ajudar na redução de infeções, mas também permitir uma maior segurança e redução de custos com cuidados médicos. A aposta em novos métodos de desinfeção e métodos de verificação de limpeza são cruciais para o controlo de proliferação microbiológica e consequentemente, na redução de IACS.

Referências Bibliográficas

1. Shek K, Patidar R, Kohja Z, Liu S, Gawaziuk JP, Gawthrop M, et al. Rate of contamination of hospital privacy curtains in a burns/plastic ward: A longitudinal study. *Am J Infect Control* [Internet]. 2018;46(9):1019–21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2018.03.004>
2. Casini B, Tuvo B, Cristina ML, Spagnolo AM, Totaro M, Baggiani A, et al. Evaluation of an ultraviolet C (UVC) light-emitting device for disinfection of high touch surfaces in hospital critical areas. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(19).
3. Direção-Geral da Saúde. Programa Nacional de Prevenção e Controlo da Infecção Associada aos Cuidados de Saúde. Direção Geral da Saúde [Internet]. 2007;1–20. Available from: <https://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/programa-nacional-de-prevencao-e-controlo-da-infeccao-associada-aos-cuidados-de-saude-pdf.aspx>
4. Hosein I, Madeloso R, Nagaratnam W, Villamaria F, Stock E, Jinadatha C. Evaluation of a pulsed xenon ultraviolet light device for isolation room disinfection in a United Kingdom hospital. *Am J Infect Control* [Internet]. 2016;44(9):e157–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2016.01.044>
5. Longtin Y, Schneider A, Tschopp C, Renzi G, Gayet-Ageron A, Schrenzel J, et al. Contamination of stethoscopes and physicians' hands after a physical examination. *Mayo Clin Proc* [Internet]. 2014;89(3):291–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2013.11.016>
6. Pina E, Martins S, Girão A. Estudo nacional de prevalência de infeção associada aos cuidados de saúde e do uso de antibióticos em unidades de cuidados continuados. Programa Nac Control Infecção, Dep da Qual na Saúde [Internet]. 2012;1–18. Available from: <https://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/estudo-nacional-de-prevalencia-de-infeccao-nos-cuidados-continuados-2012.aspx>
7. Zarb P, Coignard B, Griskeviciene J, Muller A, Vankerckhoven V, Weist K, et al. The european centre for disease prevention and control (ECDC) pilot point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use. Vol. 17, *Eurosurveillance*. 2012. 1–16 p.
8. WHO Guidelines on Hand Hygiene in Health Care: First Global Patient Safety Challenge Clean Care Is Safer Care. Report on the Burden of Endemic Health Care-Associated Infection Worldwide Clean Care is Safer Care. World Heal Organ [Internet]. 2011;1–34. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144030/>
9. Vandini A, Temmerman R, Frabetti A, Caselli E, Antonioli P, Balboni PG, et al. Hard surface biocontrol in hospitals using microbial-based cleaning products. *PLoS One*. 2014;9(9).
10. DGS. Relatório do Inquérito de Prevalência Healthcare-Associated Infection and Antimicrobial Use

- in Long-Term Facilities HALT2 Unidade de Cuidados Continuados (dados de 2013). 2015;
11. Direção-Geral da Saúde. E Controlo De Infeções E De Resistência Aos. 2017;8:24.
 12. DGS. Higiene das Mãos nas Unidades de Saúde. 2019;(CDC):46. Available from: <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0072019-de-16102019-pdf.aspx>
 13. Direção-Geral da Saúde. Infeções e Resistências aos Antimicrobianos: Relatório Anual do Programa Prioritário 2018. Direção Geral da Saúde [Internet]. 2018;1–37. Available from: www.dgs.pt
 14. Watanabe R, Shimoda T, Yano R, Hayashi Y, Nakamura S, Matsuo J, et al. Visualization of hospital cleanliness in three Japanese hospitals with a tendency toward long-term care. *BMC Res Notes*. 2014;7(1).
 15. K K, P A, M B. Hospital Surface Disinfection: Need, Gaps, Challenges and Management for “Basin and Mop” Method. *J Hosp Med Manag*. 2018;04(03):1–5.
 16. Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis*. 2006;6:1–8.
 17. Rawlinson S, Ciric L, Cloutman-Green E. How to carry out microbiological sampling of healthcare environment surfaces? A review of current evidence. *J Hosp Infect* [Internet]. 2019;103(4):363–74. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.07.015>
 18. Ismaïl R, Aviat F, Michel V, Le Bayon I, Gay-Perret P, Kutnik M, et al. Methods for recovering microorganisms from solid surfaces used in the food industry: A review of the literature. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10(11):6169–83.
 19. Jocelyn Chai, Tysha Donnelly, Titus Wong EB. Environmental sampling of hospital surfaces: Assessing methodological quality. *Can J Infect Control* [Internet]. 2018;33(3):138–45. Available from: <https://ipac-canada.org/photos/custom/pdf/cjicArticleBryce.pdf>
 20. Puig-Verdié L, Alentorn-Geli E, González-Cuevas A, Sorlí L, Salvadó M, Alier A, et al. Implant sonication increases the diagnostic accuracy of infection in patients with delayed, but not early, orthopaedic implant failure. *J Bone Jt Surg – Ser B*. 2013;95 B(2):244–9.
 21. Bodur T, Cagri-Mehmetoglu A. Removal of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157: H7 biofilms on stainless steel using scallop shell powder. *Food Control* [Internet]. 2012;25(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.09.032>
 22. Claire A, Hospitalier P, Auvergne C, Clermont CHU, Damien B, Microorganismes L, et al. Bacterial biofilms and health communities. 2020;1–7.
 23. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol*. 2002;56(December 2015):187–209.
 24. Culler HF, Mota CM, Abe CM, Elias WP, Sircili MP, Franzolin MR. Atypical enteropathogenic

- escherichia coli strains form biofilm on abiotic surfaces regardless of their adherence pattern on cultured epithelial cells. *Biomed Res Int*. 2014;2014:10–5.
25. Costerton W, Veeh R, Shirtliff M, Pasmore M, Post C, Ehrlich G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest*. 2003;112(10):1466–77.
 26. Davey ME, O'toole GA. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000;64(4):847–67.
 27. School of Pharmacy, WISCONSIN-MADISON U. Biofilm and virulence production during antimicrobial exposures [Internet]. 2020 [cited 2020 Jul 29]. Available from: <https://pharmacy.wisc.edu/rose-laboratory/our-research/biofilm-and-virulence-production-antimicrobial-exposures/>
 28. Schmidt EA, Coleman DL, Mallison GF. Improved system for floor cleaning in health care facilities. *Appl Environ Microbiol*. 1984;47(5):942–6.
 29. Rutala WA, Weber DJ. Disinfection and sterilization in healthcare facilities. Bennett Brachman's *Hosp Infect* Sixth Ed. 2013;(May).
 30. Ali S, Muzslay M, Wilson P. A novel quantitative sampling technique for detection and monitoring of clostridium difficile contamination in the clinical environment. *J Clin Microbiol*. 2015;53(8):2570–4.
 31. LAURA J. ROSE, JUDITH NOBLE-WANG AMJA. Sub-surface sampling. *Drill Prod Pract* 1938. 1938;435–41.
 32. Dancer SJ. How do we assess hospital cleaning? A proposal for microbiological standards for surface hygiene in hospitals. *J Hosp Infect*. 2004;56(1):10–5.
 33. Ministry of Health S. Environmental Cleaning Guidelines for Healthcare Settings (Summary Document) Summary of Recommendations. 2013;
 34. Dolan A, Bartlett M, McEntee B, Creamer E, Humphreys H. Evaluation of different methods to recover meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* from hospital environmental surfaces. *J Hosp Infect* [Internet]. 2011;79(3):227–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2011.05.011>
 35. Malik RE, Cooper RA, Griffith CJ. Use of audit tools to evaluate the efficacy of cleaning systems in hospitals. *Am J Infect Control*. 2003;31(3):181–7.
 36. IPAC. Campo de Aplicação Descrição do Âmbito de Acreditação. 2015;
 37. ISO 18593. Microbiology of the food chain – Horizontal methods for surface sampling. 2018;2018.
 38. Ho YH, Wang LS, Jiang HL, Chang CH, Hsieh CJ, Chang DC, et al. Use of a sampling area-adjusted adenosine triphosphate bioluminescence assay based on digital image quantification to assess the cleanliness of hospital surfaces. *Int J Environ Res Public Health*. 2016;13(6):1–12.
 39. Shams AM, Rose LJ, Edwards JR, Cali S, Harris AD, Jacob JT, et al. Assessment of the Overall and Multidrug-Resistant Organism Bioburden on Environmental Surfaces in Healthcare Facilities.

- Infect Control Hosp Epidemiol. 2016;37(12):1426–32.
40. General I, Quality G. Annex 2 WHO good manufacturing practices for pharmaceutical. 2011;(961):77–136. Available from: http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/TRS986annex2.pdf
 41. Public Health England. Detection and enumeration of bacteria in swabs and other environmental samples. Natl Infect Serv Food Water Environ Microbiol Stand Method [Internet]. 2017;4(4). Available from: <http://www.gov.uk/phe>
 42. Manual S. Swab sampling 1 Purpose and scope. 2017;(May):1–4.
 43. Sanderson WT, Hein MJ, Taylor L, Curwin BD, Kinnes GM, Seitz TA, et al. Surface sampling methods for *Bacillus anthracis* spore contamination. Emerg Infect Dis. 2002;8(10):1145–51.
 44. Gilbert SE, Rose LJ, Howard M, Bradley MD, Shah S, Silvestri E, et al. Evaluation of swabs and transport media for the recovery of *Yersinia pestis*. J Microbiol Methods [Internet]. 2014;96(1):35–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2013.10.017>
 45. Weinstein MP, Patel JB, Campeau S, Eliopoulos GM, Galas MF, Humphries RM, et al. Clinical Microbiology Procedures Handbook [Internet]. 2018. 296 p. Available from: <http://www.facm.ucl.ac.be/intranet/CLSI/CLSI-2018-M100-S28-unlocked.pdf>
 46. Ison S, Beattie M. Disinfection, sterilization and preservation (5th ed). Aust Infect Control. 2002;7(2):74.
 47. Baldock JD. Microbiological monitoring of the food plant: methods to assess bacterial contamination on surfaces. J Milk Food Technol. 1974;37(7):361–8.
 48. Shintani H. Validation studies for microbial contamination and control of contaminants. Biocontrol Sci. 2015;20(3):161–70.
 49. American National Standard. Sterilization of health care products—Microbiological methods—Part 1: Determination of the population of microorganisms on product. Ansi/ Aami/Iso 11737-1:2006/(R)2011. 2011;
 50. Wilson ML. General principles of specimen collection and transport. Clin Infect Dis. 1996;22(5):766–77.
 51. Fonseca A, Sebastião C, Martins F, Ribeiro M, Calheiros I, Lito LM, et al. Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia. Inst Nac Saúde, Dr Ricardo Jorge. 2004;1–193.
 52. Lortal S, Di Blasi A, Madec MN, Pediliggieri C, Tuminello L, Tanguy G, et al. Tina wooden vat biofilm: A safe and highly efficient lactic acid bacteria delivering system in PDO Ragusano cheese making. Int J Food Microbiol [Internet]. 2009;132(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.026>
 53. Hodges LR, Rose LJ, O'Connell H, Arduino MJ. National validation study of a swab protocol for the

- recovery of *Bacillus anthracis* spores from surfaces. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2010;81(2):141–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.010>
54. Moore G, Griffith C. A comparison of surface sampling methods for detecting coliforms on food contact surfaces. *Food Microbiol.* 2002;19(1):65–73.
 55. Pérez-Rodríguez F, Valero A, Carrasco E, García RM, Zurera G. Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review. *Trends Food Sci Technol.* 2008;19(3):131–44.
 56. Notermans S, Hindle V, Kampelmacher EH. Comparison of cotton swab versus alginate swab sampling method in the bacteriological examination of broiler chickens. *J Hyg (Lond).* 1976;77(2):205–10.
 57. Davidson CA, Griffith CJ, Peters AC, Fielding LM. Evaluation of two methods for monitoring surface cleanliness – ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing. *Luminescence.* 1999;14(1):33–8.
 58. Rose L, Jensen B, Peterson A, Banerjee SN, Arduino MJ. Swab materials and *Bacillus anthracis* spore recovery from nonporous surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(6):1023–9.
 59. Brown DG, Jaffé PR. Effects of nonionic surfactants on the cell surface hydrophobicity and apparent Hamaker constant of a *Sphingomonas* sp. *Environ Sci Technol.* 2006;40(1):195–201.
 60. Goverde M, Willrodt J, Staerk A. Evaluation of the recovery rate of different swabs for microbial environmental monitoring. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2017;71(1):33–42.
 61. Österblad M, Järvinen H, Lönnqvist K, Huikko S, Laippala P, Viljanto J, et al. Evaluation of a new cellulose sponge-tipped swab for microbiological sampling: A laboratory and clinical investigation. *J Clin Microbiol.* 2003;41(5):1894–900.
 62. Mariani C, Briandet R, Chamba JF, Notz E, Carnet-Pantiez A, Eyoug RN, et al. Biofilm ecology of wooden shelves used in ripening the french raw milk smear cheese reblochon de savoie. *J Dairy Sci* [Internet]. 2007;90(4):1653–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2006-190>
 63. Yamaguchi N, Ishidoshiro A, Yoshida Y, Saika T, Senda S, Nasu M. Development of an adhesive sheet for direct counting of bacteria on solid surfaces. *J Microbiol Methods.* 2003;53(3):405–10.
 64. HALL LB, HARTNETT MJ. Measurement of the Bacterial Contamination on Surfaces in Hospitals. *Public Health Rep.* 1964;79(11):1021–4.
 65. NISKANEN A, POHJA MS. Comparative Studies on the Sampling and Investigation of Microbial Contamination of Surfaces by the Contact Plate and Swab Methods. *J Appl Bacteriol.* 1977;42(1):53–63.
 66. Test E. A method for assessing the in-place cleanability of food-processing equipment. *Trends Food Sci Technol.* 1992;3:325–8.
 67. Khamisse E, Firmesse O, Christieans S, Chassaing D, Carpentier B. Impact of cleaning and disinfection on the non-culturable and culturable bacterial loads of food-contact surfaces at a beef

- processing plant. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2012;158(2):163–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.014>
68. Portillo ME, Salvadó M, Trampuz A, Plasencia V, Rodriguez-Villasante M, Sorli L, et al. Sonication versus Vortexing of Implants for Diagnosis of Prosthetic Joint Infection. *J Clin Microbiol*. 2013;51(2):591–4.
 69. Mettler E, Carpentier B. Hygienic quality of floors in relation to surface texture. *Food Bioprod Process Trans Inst Chem Eng Part C*. 1999;77(2):90–6.
 70. Vainio-Kaila T, Kyyhkynen A, Viitaniemi P, Siitonen A. Pine heartwood and glass surfaces: Easy method to test the fate of bacterial contamination. *Eur J Wood Wood Prod*. 2011;69(3):391–5.
 71. United Nations. World Economic Situation and Prospects [Internet]. Vol. 53, *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2019. 1689–1699 p. Available from: https://www.un.org/development/desa/dpad/wp-content/uploads/sites/45/WESP2019_BOOK-web.pdf
 72. Wilcox MH, Fawley WN, Parnell P. Value of lysozyme agar incorporation and alkaline thioglycollate exposure for the environmental recovery of clostridium difficile. *J Hosp Infect*. 2000;44(1):65–9.
 73. Sneha Ambwani, Arup Kumar Misra RK. Prucalopride: A Recently Approved Drug by the Food and Drug Administration for Chronic Idiopathic Constipation. *Int J Appl Basic Med Res*. 2017;2019(November):193–5.
 74. Oluwagbemiga AO, Akinsete SJ, Ana GR. Building conditions and the risk of nosocomial infection from microbial contamination of hospital appliances in a health care facility. *Int J Environ Health Res* [Internet]. 2017;27(4):264–75. Available from: <https://doi.org/10.1080/09603123.2017.1332350>
 75. Çakir NA, Uçar FB, Uztan AH, Çorbacı C, Akpınar O. Determination and comparison of microbial loads in atmospheres of two hospitals in Izmir, Turkey. *Ann Agric Environ Med*. 2013;20(1):106–10.
 76. Setlhare G, Malebo N, Shale K, Lues R. Identification of airborne microbiota in selected areas in a health-care setting in South Africa. *BMC Microbiol*. 2014;14(1).
 77. Nazeri M, Salmani Arani J, Ziloochi N, Delkhah H, Hesami Arani M, Asgari E, et al. Microbial contamination of keyboards and electronic equipment of ICU (Intensive Care Units) in Kashan University of medical sciences and health service hospitals. *MethodsX*. 2019;6:666–71.
 78. Adé M, Burger S, Cuntzmann A, Exinger J, Meunier O. Magazines des zones d'attente à l'hôpital: un réservoir microbien oublié ? *Ann Biol Clin (Paris)*. 2017;75(6):673–81.
 79. Siani H, Wesgate R, Maillard JY. Impact of antimicrobial wipes compared with hypochlorite solution on environmental surface contamination in a health care setting: A double-crossover study. *Am J Infect Control* [Internet]. 2018;46(10):1180–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2018.03.020>

80. Casini B, Righi A, De Feo N, Totaro M, Giorgi S, Zezza L, et al. Improving cleaning and disinfection of high-touch surfaces in intensive care during carbapenem-resistant acinetobacter baumannii endemo-epidemic situations. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(10).
81. Gonsu KH, Guenou E, Toukam M, Ndze VN, Mbakop CD, Tankeu DN, et al. Bacteriological assessment of the hospital environment in two referral hospitals in Yaoundé-Cameroon. *Pan Afr Med J*. 2015;20:224.
82. Rawlinson S, Cloutman-Green E, Asadi F, Ciric L. Surface sampling within a pediatric ward—how multiple factors affect cleaning efficacy. *Am J Infect Control* [Internet]. 2019;000:1–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2019.10.023>
83. Claro T, Galvin S, Cahill O, Fitzgerald-Hughes D, Daniels S, Humphreys H. What Is the Best Method? Recovery of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* from Inanimate Hospital Surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2014;35(7):869–71.
84. Aires-De-Sousa M, Rodrigues S, Conceição T, De Lencastre H. Evaluation of Different Screening Methodologies for the Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Environmental Surfaces: Swabs, Gauzes, and Polywipes. *Microb Drug Resist*. 2018;24(5):585–9.
85. Giovinazzo R, Caradonna L, Giaquinta G, Guerrera E, Mameli M, Mansi A, et al. Benchmark Guidance Values for Microbiological Monitoring on Surfaces: A Literature Overview. 2018;(March). Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/93f9/c19b842fb86e0f1c5db06b569ee1bd72cbe4.pdf>
86. Kumar D, Thakur S. Molecular Tools To Study Preharvest Food Safety Challenges. *Microbiol Spectr*. 2018;6(1):1–16.
87. Farrell RE. Rt-Pcr. *RNA Methodol*. 2010;385–448.
88. Miller MB, Tang YW. Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(4):611–33.
89. Hu J, Tang F, Jiang YZ, Liu C. Rapid screening and quantitative detection of: *Salmonella* using a quantum dot nanobead-based biosensor. *Analyst*. 2020;145(6):2184–90.
90. Konstantinou, N. G. Food Allergens: Methods and Protocols. *EUFIC Rev* [Internet]. 2017;1592:1–299. Available from: http://www.eufic.org/article/en/expid/EUFIC_Review_on_Food_Allergens/%0Ahttp://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-6925-8
91. Benagli C, Rossi V, Dolina M, Tonolla M, Petrini O. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. *PLoS One*. 2011;6(1):1–7.
92. Colin M, Charpentier E, Klingelschmitt F, Bontemps C, De Champs C, Reffuveille F, et al. Specific antibacterial activity of copper alloy touch surfaces in five long-term care facilities for older adults.

- J Hosp Infect [Internet]. 2020;104(3):283–92. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.11.021>
93. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? Arch Dis Child Educ Pract Ed. 2013;98(6):236–8.
 94. Willis C, Morley R, Westbury J, Greenwood M, Pallett A. Evaluation of ATP bioluminescence swabbing as a monitoring and training tool for effective hospital cleaning. Br J Infect Control. 2007;8(5):17–21.
 95. Huslage K, Rutala WA, Gergen MF, Sickbert-Bennett EE, Weber DJ. Microbial Assessment of High-, Medium-, and Low-Touch Hospital Room Surfaces. Infect Control Hosp Epidemiol. 2013;34(2):211–2.
 96. Wojciechowski J, Danley D, Cooper J, Yazvenko N, Taitt CR. Multiplexed electrochemical detection of yersinia pestis and staphylococcal enterotoxin B using an antibody microarray. Sensors. 2010;10(4):3351–62.
 97. Umesha S, Manukumar HM. Advanced molecular diagnostic techniques for detection of food-borne pathogens: Current applications and future challenges. Crit Rev Food Sci Nutr. 2018;58(1):84–104.
 98. Bandara AB, Zuo Z, Ramachandran S, Ritter A, Heflin JR, Inzana TJ. Detection of methicillin-resistant staphylococci by biosensor assay consisting of nanoscale films on optical fiber long-period gratings. Biosens Bioelectron. 2015;70:433–40.
 99. Cooper KL, Bandara AB, Wang Y, Wang A, Inzana TJ. Photonic biosensor assays to detect and distinguish subspecies of Francisella tularensis. Sensors. 2011;11(3):3004–19.
 100. Suaifan GARY, Alhogail S, Zourob M. Rapid and low-cost biosensor for the detection of Staphylococcus aureus. Biosens Bioelectron [Internet]. 2017;90:230–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.11.047>
 101. Cooper IR, Pollini M, Paladini F. The potential of photo-deposited silver coatings on Foley catheters to prevent urinary tract infections. Mater Sci Eng C [Internet]. 2016;69:414–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.07.004>
 102. Hinsia-Leasure SM, Nartey Q, Vaverka J, Schmidt MG. Copper alloy surfaces sustain terminal cleaning levels in a rural hospital. Am J Infect Control [Internet]. 2016;44(11):e195–203. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2016.06.033>
 103. Casey AL, Adams D, Karpanen TJ, Lambert PA, Cookson BD, Nightingale P, et al. Role of copper in reducing hospital environment contamination. J Hosp Infect [Internet]. 2010;74(1):72–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2009.08.018>
 104. Montero DA, Arellano C, Pardo M, Vera R, Gálvez R, Cifuentes M, et al. Antimicrobial properties of a novel copper-based composite coating with potential for use in healthcare facilities. Antimicrob

- Resist Infect Control. 2019;8(1):1–10.
105. Villacís JE, Lopez M, Passey D, Santillán MH, Verdezoto G, Trujillo F, et al. Efficacy of pulsed-xenon ultraviolet light for disinfection of high-touch surfaces in an Ecuadorian hospital. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1):1–6.
 106. Dippenaar R, Smith J. Impact of pulsed xenon ultraviolet disinfection on surface contamination in a hospital facility's expressed human milk feed preparation area. *BMC Infect Dis.* 2018;18(1):1–6.
 107. Shek K, Patidar R, Kohja Z, Liu S, Gawaziuk JP, Gawthrop M, et al. Rate of contamination of hospital privacy curtains on a burns and plastic surgery ward: a cross-sectional study. *J Hosp Infect* [Internet]. 2017;96(1):54–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2017.03.012>
 108. Torkar KG, Ivić S. Surveillance of bacterial colonisation on contact surfaces in different medical wards. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2017;68(2):116–26.
 109. Simmons S, Dale C, Holt J, Passey DG, Stibich M. Environmental effectiveness of pulsed-xenon light in the operating room. *Am J Infect Control* [Internet]. 2018;46(9):1003–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2018.02.027>
 110. Otter JA, Cummins M, Ahmad F, van Tonder C, Drabu YJ. Assessing the biological efficacy and rate of recontamination following hydrogen peroxide vapour decontamination. *J Hosp Infect.* 2007;67(2):182–8.

Anexos

Tabela 4– Análise estatística descritiva do grupo mobília

	MI	MD
Número de valores	3	6
Mínimo	0,38	0,38
Mediana	21,78	1,28
Máximo	37,52	73,52
Média	19,89	13,29
Desvio-Padrão	18,64	29,52
Erro	10,76	12,05
Inferior 95% CI	-11,53	-10,99
Superior 95% CI	51,32	37,57

Tabela 5– Análise estatística descritiva do grupo cama

	MI	MD
Número de valores	5	6
Mínimo	0,3100	0,4400
Mediana	0,4000	0,9850
Máximo	173,4	42,47
Média	37,88	8,783
Desvio-Padrão	76,00	16,72
Erro	33,99	6,825
Inferior 95% CI	-34,58	-4,969
Superior 95% CI	110,3	22,54

Tabela 6– Análise estatística descritiva do grupo Paredes

	MI	MD
Número de valores	4	4
Mínimo	0,03000	1,360
Mediana	20,59	2,485
Máximo	71,18	4,040
Média	28,10	2,593
Desvio-Padrão	31,37	1,197
Erro	15,68	0,5985
Inferior 95% CI	-8,812	1,184
Superior 95% CI	65,00	4,001

Tabela 7– Análise estatística descritiva do grupo Casa de Banho

	MI	MD
Número de valores	7	3
Mínimo	0,3300	0,9400
Mediana	102,5	3,490
Máximo	697,5	7,970
Média	240,8	4,133
Desvio-Padrão	313,0	3,559
Erro	118,3	2,055
Superior 95% CI	10,87	-1,866
Inferior 95% CI	470,7	10,13

Tabela 8– Análise estatística descritiva do grupo Equipamentos

	MI	MD
Número de valores	4	5
Mínimo	0,1000	0,5400
Mediana	4,640	1,280
Máximo	49,56	87,60
Média	14,74	18,50
Desvio-Padrão	23,45	38,63
Erro	11,72	17,28
Superior 95% CI	-12,86	-18,33
Inferior 95% CI	42,33	55,34

Tabela 9– Análise estatística descritiva para Países desenvolvidos (PD) e em desenvolvimento (PED)

	PD	PED
Número de valores	22	6
Mínimo	0,3867	0,2289
Mediana	4,494	3,332
Máximo	697,5	544,0
Média	88,12	95,34
Desvio-Padrão	199,8	219,9
Erro	42,60	89,79
Superior 95% CI	14,82	-85,58
Inferior 95% CI	161,4	276,3

Tabela 10– Análise estatística de Países desenvolvidos (PD) e em desenvolvimento (PED) por áreas

Table Analyzed	PD/PED por área	
Column B	PED	
vs.	vs,	
Column A	PD	
Nested t test		
P value	0,6390	
P value summary	ns	
Significantly different (P < 0.05)?	No	
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	
t, df	t=0,4838, df=10	
F, DF _n , D _{fd}	0,2340, 1, 10	
How big is the difference?		
Mean of column B	35,24	
Mean of column A	58,32	
Difference between means (B – A) ± SEM	-23,08 ± 47,71	
95% confidence interval	-129,4 to 83,22	
Random effects	SD	Variance
Variation within subcolumns	127,5	16244
Variation among subcolumn means	67,52	4559
Do the subcolumns differ (within each column)?		
Chi-square, df	10,91, 1	
P value	0,0010	
P value summary	***	
Is there significant difference between subcolumns (P < 0.05)?	Yes	
Data analyzed		
Number of treatments (columns)	2	
Number of subjects (subcolumns)	12	
Total number of values	95	

Tabela 11– Análise multicomparativa entre áreas hospitalares

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Casa de Banho vs. Vários	327,4	81,10 to 573,6	Yes	**	0,0061	A-B
Casa de Banho vs. Enfermaria	332,1	127,3 to 536,8	Yes	***	0,0008	A-C
Casa de Banho vs. CI	311,6	113,6 to 509,6	Yes	**	0,0011	A-D
Vários vs. Enfermaria	4,710	-215,9 to 225,3	No	ns	>0,9999	B-C
Vários vs. CI	-15,72	-230,1 to 198,6	No	ns	0,9970	B-D
Enfermaria vs. CI	-20,43	-185,4 to 144,6	No	ns	0,9861	C-D
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2
Casa de Banho vs. Vários	334,3	6,907	327,4	89,53	5	4
Casa de Banho vs. Enfermaria	334,3	2,198	332,1	74,44	5	9
Casa de Banho vs. CI	334,3	22,62	311,6	71,98	5	11
Vários vs. Enfermaria	6,907	2,198	4,710	80,20	4	9
Vários vs. CI	6,907	22,62	-15,72	77,92	4	11
Enfermaria vs. CI	2,198	22,62	-20,43	59,99	9	11

Tabela 12– Análise estatística de Mobília com remoção de *outliers* e significância estatística de 90%

Table Analyzed	Mobília c/ outliers		
Column A	MID		
vs.	vs,		
Column B	MD		
Unpaired t test			
P value	0,0558		
P value summary	ns		
Significantly different (P < 0.1)?	Yes		
One- or two-tailed P value?	Two-tailed		
t, df	t=2,367, df=6		
How big is the difference?			
Mean of column A	19,89		
Mean of column B	1,246		
Difference between means (A - B) ± SEM	18,65 ± 7,879		
90% confidence interval	3,337 to 33,96		
R squared (eta squared)	0,4828		
F test to compare variances			
F, DFn, Dfd	415,8, 2, 4		
P value	<0,0001		
P value summary	****		
Significantly different (P < 0.1)?	Yes		
Model comparison	SS	DF	Probability it is correct
Null H. Population means identical	1350	7	54,05%
Alternative H: Distinct population means	698,4	6	45,95%
Ratio of probabilities			1,176
Difference in AICc			-0,3250
Data analyzed			
Sample size, column A	3		
Sample size, column B	5		

Tabela 13- Análise estatística de Métodos diretos e indiretos por área

Table Analyzed	Data 1	
Column B	Métodos Diretos	
vs.	vs,	
Column A	Métodos Indiretos	
Nested t test		
P value	0,0910	
P value summary	ns	
Significantly different (P < 0.05)?	No	
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	
t, df	t=1,870, df=10	
F, DFn, Dfd	3,497, 1, 10	
How big is the difference?		
Mean of column B	8,515	
Mean of column A	84,43	
Difference between means (B - A) $\pm$ SEM	-75,91 $\pm$ 40,60	
95% confidence interval	-166,4 to 14,54	
Random effects	SD	Variance
Variation within subcolumns	131,8	17363
Variation among subcolumn means	38,00	1444
Do the subcolumns differ (within each column)?		
Chi-square, df	0,7733, 1	
P value	0,3792	
P value summary	ns	
Is there significant difference between subcolumns (P < 0.05)?	No	
Data analyzed		
Number of treatments (columns)	2	
Number of subjects (subcolumns)	12	
Total number of values	61	

