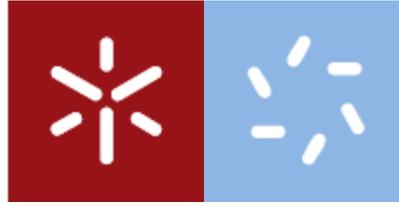


Universidade do Minho
Escola de Ciências - Departamento de Biologia

**O papel do ar e água ambientais como veículos de transmissão de
infecções fúngicas no Hospital Agostinho Neto,
Cidade da Praia, Cabo Verde.**

Moisés Mendes Tavares

Outubro de 2012



Universidade do Minho
Escola de Ciências - Departamento de Biologia

**O papel do ar e água ambientais como veículos de transmissão de
infecções fúngicas no Hospital Agostinho Neto,
Cidade da Praia, Cabo Verde.**

Moisés Mendes Tavares

Dissertação de Mestrado em Genética Molecular

Trabalho realizado sob a orientação de:

Investigadora Doutora Maria da Luz Martins (IHMT/CREM, Lisboa)

Professora Doutora Paula Sampaio (CBMA, Braga)

Outubro de 2012

Declaração

NOME:

Moisés Mendes Tavares

ENDEREÇO ELETRÓNICO: tavaresmoi@hotmail.com

TELEFONE: 967579660

TÍTULO DE RESIDÊNCIA: 73L00041L

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: O papel do ar e água ambientais como veículos de transmissão de infeções fúngicas no Hospital Agostinho Neto, cidade da Praia, Cabo Verde.

ORIENTADORAS:

Investigadora Doutora Maria da Luz Martins (IHMT/CREM, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa)

Professora Doutora Paula Sampaio (CBMA, Braga)

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM: Genética Molecular

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, 31/10/2012

Assinatura:

Moisés Mendes Tavares

Agradecimentos

A realização deste trabalho foi conseguida graças ao apoio, generosidade e boa vontade de muitas pessoas e instituições que direta ou indiretamente ajudaram para a sua concretização. Por isso não queria deixar passar a oportunidade de agradecer a todos os que de algum modo contribuíram para a sua realização.

À Investigadora Doutora Maria da Luz Martins, gostaria de agradecer pela orientação e apoios prestados, não apenas pela excepcional e imprescindível qualidade da sua orientação mas também pela oportunidade de poder pertencer ao seu grupo de trabalho e aperfeiçoar os meus conhecimentos, facilitando assim a execução deste estudo.

À Professora Assistente, Doutora Paula Sampaio, minha co-orientadora, queria agradecer pela orientação, apoio e oportunidade pertencer o seu grupo de trabalho durante o meu estudo. Desde o início disponibilizou o seu conhecimento, espírito crítico e amizade, estimulando a minha capacidade e método de trabalho.

A todos os Professores do Mestrado em Genética Molecular, em especial à professora Doutora Célia Pais que diretamente contribuiu com a sua disponibilidade e assistência durante a elaboração deste trabalho.

Aos meus Colegas e técnicos do Laboratório de Micologia do Instituto de Higiene e Medicina Tropical e do Laboratório de Microbiologia da Universidade do Minho, pelo apoio e trocas de experiências, que me enriqueceram como profissional e como pessoa.

Ao governo de Cabo Verde, que em parceria com o Instituto Português de Apoio ao Desenvolvimento (IPAD), financiaram o projeto de investigação.

Ao hospital Dr. Agostinho Neto na Praia, Cabo Verde, nosso alvo de estudo pela abertura e colaboração total para com a nossa investigação.

A minha família e amigos, pela paciência, carinho e apoio que demonstraram ao longo destes anos. Em especial aos meus pais, que sempre me ensinaram o valor do respeito e da responsabilidade no trabalho. Também gostaria de agradecer ao Gabriel e à Leizi Andrade, pelo apoio e amizade que muito prezo e cuja presença foi muito importante ao longo destes anos.

Resumo

Os fungos são um grupo de microrganismos diversificado com uma grande ubiquidade na natureza, podendo ser encontrados no solo, no ar e na água. Alguns destes microrganismos são considerados como verdadeiros agentes patogénicos para humanos e, embora na grande maioria sejam inofensivos para indivíduos saudáveis, tornam-se patogénicos para indivíduos com fragilidade imunológica. A infeção por estes agentes em ambiente hospitalar tem sido relatada neste últimos anos como a principal causa de morte nos pacientes internados com debilidade imunológica. Neste estudo foi feita a avaliação da presença de fungos no ambiente de algumas unidades mais críticas do Hospital Agostinho Neto na cidade da Praia em Cabo Verde durante o mês de Janeiro de 2012, nomeadamente no Bloco Operatório do hospital e nos serviços de internamento Cirúrgico e Queimadura, Neonatologia, Infeciologia, Oncologia e de Hemodiálise. No total foram recolhidas 34 amostras de diferentes locais, detectadas 393ufc/m³ no ar, 685ufc/m³ na água e 2696ufc/m² nas superfícies e isolados 104 fungos morfológicamente diferentes, sendo sido obtidos 29 a partir do ar, 21 de amostras da água e 54 de superfícies. A maior diversidade fúngica foi encontrada nos serviços de internamento Cirúrgico e Queimadura e de Neonatologia onde, em cada um, foram detectados nove géneros diferentes de fungos no ambiente hospitalar. Observou-se ainda uma forte presença dos géneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium* em todos os locais estudados. Sabendo que a contaminação por estes agentes pode ser um fator de risco para infeção nosocomial em pacientes com sistema imunitário muito debilitado, sugerimos no final do trabalho algumas linhas orientadoras para minimizar os fatores de risco e propor trabalhos futuros para correlacionar esses fatores com casos de ocorrência de infeções fúngicas no Hospital Agostinho Neto na cidade da Praia, Cabo Verde.

Palavras-chave: fungos; pacientes imunocomprometido; infeção fúngica; infeção nosocomial.

Abstract

Fungi are a diverse group of microorganisms with a large ubiquity in nature and can be found in soil, air and water. Some of these microorganisms are considered as true pathogens for humans and although the vast majority is harmless to healthy individuals, they can become pathogenic to immunosuppressed patients. Infection by these agents in hospitals has been reported in recent years as the leading cause of nosocomial infections and death in hospitalized patients. This study aims to evaluate the presence of fungi in the environment of some of the most critical units of Agostinho Neto Hospital in Praia, Cape Verde during the month of January 2012. Were evaluated the services of Surgical and Burns, Neonatology, Infectiology, Oncology and Hemodialysis. In a total of 34 samples were collected from different locations, 393ufc/m³ from the air, 685ufc/m³ from tap water and 2696ufc/m² from surfaces. Were isolated 104 morphologically different colonies of fungi: 29 from the air 21 from water samples, and 54 from surfaces. Fungal diversity was higher in inpatients services, like Surgical and Burns, and Neonatology, were was detected nine different genera of fungi in the hospital environment in each. There was also a strong presence of the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Cladosporium* in all locations studied. Knowing that contamination by these agents may be a risk factor for nosocomial infection in patients with severely impaired immune system, this work suggest, at the end, some guidelines to minimize the risk factors and propose future works to correlate these factors with cases occurring fungal infections at the Agostinho Neto Hospital in Praia, Cape Verde.

Keywords: fungi, immunocompromised patients, fungal infection, nosocomial infection.

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract.....	iv
ÍNDICE GERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABELAS	viii
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	1
1 - Características gerais dos fungos.....	3
1.1 - Morfologia dos fungos	4
1.2 - Reprodução	5
1.2.1 - Reprodução sexuada	5
1.2.2 - Reprodução assexuada	6
1.3 - Nutrição e metabolismo e crescimento de fungos	7
1.4 – As micoses humanas	8
1.4.1 - As Micoses superficiais	9
1.4.2 - As micoses subcutâneas	9
1.4.3 - As micoses sistêmicas	10
1.5 - Infecções fúngicas nosocomiais	11
1.5.1- Epidemiologia das infecções nosocomiais	12
1.5.2 – Fatores de risco associados às infecções nosocomiais.....	15
1.6 - Ambiente hospitalar como foco de infecção fúngica	16
1.6.1– A prevenção e o tratamento das infecções fúngicas	17
1.7 – O diagnóstico laboratorial das infecções fúngicas	19
1.8 - Caracterização do local de colheita: Hospital Agostinho Neto	22
1.9 - Objetivos e plano da dissertação	23
CAPÍTULO II: MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1 Seleção dos locais de colheita de amostras.....	29
2.2 Colheita das amostras ambientais	29
2.2.1 Colheita de ar e água e superfície.....	29
2.3 Cultura e isolamento dos fungos	31

2.3.1 Meios de cultura	31
2.3.2 Incubação	32
2.3.3 Isolamento das colónias	32
2.4 Identificação convencional das espécies fúngicas isoladas.....	32
2.5 Identificação molecular de algumas espécies com maior importância médica.	33
2.5.1 Extração do DNA de fungos isolados em cultura	33
2.5.2 Amplificação da região ITS do rDNA	35
2.5.3 Purificação do produto amplificado	35
2.5.4 Sequenciação da região ITS do rDNA.....	36
CAPÍTULO III: RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
3.1- Amostras obtidas no Hospital Agostinho Neto	39
3.2 Fungos encontrados nos diferentes locais da colheita da amostra.....	44
3.2.1 Fungos encontrados no Bloco Operatório.....	46
3.2.2 Fungos encontrados no serviço de internamento Cirúrgico e Queimadura ...	48
3.2.3 Fungos encontrados no serviço de internamento de Neonatologia.....	49
3.2.4 Fungos encontrados no serviço de internamento de Infeciologia	50
3.2.5 Fungos encontrados no serviço de Oncologia.....	50
3.2.6 Fungos encontrados no serviço de Hemodiálise	51
3.3 Correlação entre os géneros fúngicos isolados nos diferentes Serviços do Hospital.....	53
3.4 Espécies de maior importância médica e com maior prevalência.	54
CAPÍTULO IV: CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES	57
Referências bibliográficas	61
Anexos.....	67
Anexo I.....	68
Anexo II	69
Anexo III.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Organização da região ITS do rDNA , local de hibridação dos primers ITS1 e ITS4 para amplificação da mesma por PCR (adaptado de White <i>et al.</i> 1990)	21
Figura 2.1 - Colheita de amostras de ar ambiental no Hospital Agostinho Neto, da cidade da Praia, em Cabo Verde.....	30
Figura 2.2 - Representação ilustrativa da colheita e sementeira de amostras de superfícies. (A) Colheita da amostra de superfície, com zaragatoa, numa área de 100 cm ² ; (B) sementeira da amostra na placa de petri com meio de cultura agar Sabouraud dextrose com cloranfenicol.....	31
Figura 3.1 - Prevalência dos géneros dos fungos identificados com base nas características morfológicas macroscópicas e microscópicas das suas colónias.....	45
Figura 3.2 - Ocorrência dos géneros fúngicos nos serviços estudados, no Hospital Agostinho Neto na cidade da Praia em Cabo Verde, isolados a partir de amostras do ar (amarelo), água (azul) e de superfícies (verde).....	53
Figura 3.3 - Observação microscópica das diferentes espécies de <i>Aspergillus</i> identificadas neste estudo. (A) <i>A. versicolor</i> ; (B) <i>A. wentii</i> ; (C) <i>A. unguis</i> ; (D) <i>A. tubingensis</i> ; (E) <i>A. niger</i> ; (F) <i>A. westerdijkiae</i> ; (G) <i>A. nidulans</i> ; (H) <i>A. flavus</i> e (I) <i>A. tamarii</i>	56

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1	Espécies fúngicas oportunistas mais comuns como agentes etiológicos de infecções nosocomiais (adaptado por Richardson & Lass-Flörl, 2008).....	13
Tabela 1.2	Fármacos mais utilizados no tratamento das diferentes patologias fúngicas invasivas em pacientes imunocomprometidos (Low <i>et al.</i> 2011).....	19
Tabela 1.3	As áreas de prestação de cuidados de saúde no Hospital Dr. Agostinho Neto em Cabo Verde	23
Tabela 2.1	Mistura reacional para amplificação por PCR da região ITS do rDNA dos fungos isolados e selecionados para a reação de sequenciação.....	35
Tabela 3.1	Ocorrência de colónias fúngicas isoladas nos diferentes serviços do Hospital Agostinho Neto, cidade da Praia, Cabo Verde.....	41
Tabela 3.2	Morfotipos fúngicos isolados a partir das amostras recolhidas nas diferentes unidades do Hospital Agostinho Neto, cidade da Praia, Cabo Verde.....	43
Tabela 3.3	Ocorrência das espécies fúngicas isoladas a partir das amostras de ar, água e superfícies do Bloco Operatório.....	47
Tabela 3.4	Distribuição dos fungos isolados a partir das amostras de ar, água e superfícies do serviço de internamento Cirúrgico e Queimadura.....	48
Tabela 3.5	Distribuição das diferentes espécies de fungos isolados a partir das amostras de ar, água e superfícies do serviço de internamento de Neonatologia.....	49
Tabela 3.6	Distribuição dos fungos isolados a partir das amostras de ar, água e superfícies do serviço de internamento de Infeciologia.....	50
Tabela 3.7	Distribuição dos fungos isolados a partir das amostras de ar, água e superfícies do serviço de internamento de Oncologia.....	51
Tabela 3.8	Distribuição dos fungos isolados a partir das amostras de ar, água e superfícies do serviço de Hemodiálise.....	52
Tabela 3.9	Identificação molecular espécies de <i>Aspergillus</i> isoladas nos diferentes serviços do hospital Agostinho Neto, da cidade da Praia, em Cabo Verde.....	55

Capítulo I: Introdução

ENQUADRAMENTO TEÓRICO

1 - Características gerais dos fungos

Os fungos são um grupo de microrganismos diversificado com uma grande ubiquidade na natureza, pertencentes ao reino Eumycota. Este reino encontra-se dividido em cinco filos: Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota, Chytridiomycota, e Glomeromycota (Schübler *et al.* 2001). A abordagem prática da classificação subdivide os fungos em vários grupos, tais como: fungos filamentosos, fungos leveduriformes e os cogumelos.

Estes microrganismos têm a capacidade de se adaptar e viver em todos os biótopos do planeta, em presença de condições adequadas de humidade, temperatura e de um substrato orgânico disponível. As suas comunidades adaptaram-se para viver na maioria dos ambientes do solo, assim como em vegetais vivos ou nos seus restos em decomposição e também em água doce e salgada, sendo mais abundantes nas regiões quentes e húmidas, como nas zonas tropicais (Bôas & Ruiz 2004).

Atualmente os micologistas estimam que já foram descritas cerca de 70.000 espécies que correspondem a cerca de 5% de um total de 1,5 milhões de espécies estimadas sobre o planeta Terra (Hawksworth 2001). Esta grande discordância deve-se ao facto de haver um grande desconhecimento da sua ocorrência nas áreas tropicais e subtropicais, devido a um insuficiente número de estudos micológicos (Alexopoulos *et al.* 1996). Segundo Richardson & Warnock (2003), das espécies já descritas, cerca de 500 estão associados a doenças nos humanos e, de entre estas, mais de 100 espécies podem provocar infeções em indivíduos saudáveis.

De acordo Guarro *et al.* (1999) não há um conceito universal para definir as espécies fúngicas. Os fungos são organismos que apresentam uma estrutura celular do tipo eucariótica cuja alimentação se processa por absorção (Santos *et al.* 1998). São organismos heterotróficos, desprovidos de clorofila, cujas células possuem uma parede celular rígida constituída na maioria por quitina e glucano, sendo que se reproduzem por meio de esporos assexuados ou sexuados (Murray *et al.* 2007). Estas características fazem destes microrganismos seres vivos singulares no seio de outros eucariontes.

1.1 - Morfologia dos fungos

A classificação clássica dos fungos baseia-se, essencialmente na observação das suas características morfológicas e reprodutoras (Guarro *et al.* 1999). No entanto, mais recentemente características bioquímicas e moleculares, bem como a ultra-estrutura da parede, têm sido uma mais uma valia em estudos taxonómicos dos fungos. Entretanto, a morfologia clássica distingue duas formas de fungos: as leveduras (fungos unicelulares) e os fungos filamentosos que desenvolvem micélio (fungos multicelulares).

As leveduras são organismos unicelulares. As células possuem forma arredondada, ovoide ou alongada de tamanho variável (entre 3 a 5 μm) e a sua reprodução na maioria dos casos é assexuada, por meio de gemulação ou fissão. Nos meios de cultura, como o agar de Sabouraud, desenvolvem colónias em geral cremosas (Lacaz 1997). Algumas leveduras reproduzem-se continuamente por gemulação sem que a gémula se separe da célula mãe dando origem a pseudohifas ou pseudofilamentos.

Os fungos filamentosos são organismos multicelulares constituídos por estruturas tubulares em forma de filamentos designados por hifas, que podem ser simples ou ramificados, os quais, no seu conjunto, constituem o micélio dos fungos. As hifas, de acordo com a sua morfologia, podem ser divididas em dois tipos: hifas septadas e hifas cenocíticas ou não septadas (Lacaz *et al.* 2002).

As hifas septadas são hifas que possuem septo transversal ao longo da sua estrutura, dividindo-as em compartimentos. Nos fungos Ascomicota e Basidiomicota os septos apresentam orifícios ou um poro central que permitem a troca de material celular entre células vizinhas.

Normalmente, todos os fungos filamentosos possuem hifas septadas, com exceção dos fungos Zigomicota. Esses fungos possuem hifas formadas por estruturas tubulares, sem divisões transversais, com centenas de núcleos e outros organitos a circular num extenso citoplasma (Deacon 1984).

Há ainda fungos, os denominados fungos dimórficos, que têm a capacidade de alternar a sua morfologia de leveduras para filamentosos e vice-versa em resposta a combinação de diferentes fatores (internos ou externos). Segundo Esteves *et al.* (1991), esta

especificidade é verificada principalmente em alguns fungos agentes de micoses profundas. Estes microrganismos, em geral, quando são cultivados a 25°C em meios de cultura comuns, crescem sob a forma de fungos filamentosos. Nos tecidos parasitados ou a 37°C em determinados meios de cultura, desenvolvem-se sob a forma de células leveduriformes (Lacaz *et al.* 2002).

1.2 - Reprodução

A reprodução é um mecanismo fundamental utilizado por todos seres vivos para perpetuar a sua existência. Normalmente os fungos apresentam capacidade de se reproduzirem sexuadamente, dando origem às formas telemórficas (com a produção de esporos sexuais) e assexuadamente dando origem às formas anamórficas (com a produção de esporos assexuais).

1.2.1 - Reprodução sexuada

De acordo com Kwon-Chung & Bennett (1992), a reprodução sexuada nos fungos resulta da união de duas células pelo protoplasma (plasmogamia) com a união dos respetivos núcleos (cariogamia), dando lugar a um zigoto como resultado da conjugação. O núcleo do zigoto, é diploide e sofre uma divisão meiótica (redução de cromossomas) dando origem a núcleos haploides, que depois, por uma ou mais divisões mitóticas, dão origem a mais núcleos ou novas células diferenciadas com as características morfológicas e funcionais dos esporos. No entanto, há muitos fungos em que se desconhece a existência de estruturas diferenciadas para a reprodução sexuada.

Em Micologia Médica clássica, os fungos com reprodução sexuada conhecida (estado perfeito ou telemorfo) são classificados nos filos Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota, conforme as estruturas reprodutoras a que dão origem. Os fungos com apenas reprodução assexuada conhecida (estado imperfeito ou anamorfo) têm sido agrupados num grupo à parte, os Deuteromycota que, na realidade, constitui um grupo artificial por ser taxonomicamente muito heterogéneo (Murray *et al.* 2007). Contudo, nestes últimos anos, com a utilização de técnicas moleculares em estudos taxonómicos de fungos, tem sido possível reclassificar muitas das espécies anamórficas em uma das três primeiras classes.

1.2.2 - Reprodução assexuada

A reprodução assexuada envolve apenas um progenitor e, no caso dos fungos, é uma forma muito eficaz de reprodução e propagação das espécies pela capacidade que estes organismos têm de se reproduzir continuamente desde que as condições do meio sejam favoráveis. Este tipo de reprodução salvaguarda o património genético do progenitor devido ao processo de divisão nuclear por meio de mitoses.

A reprodução assexuada ocorre nas leveduras por gemulação ou por fissão (Murray *et al.* 2007). A gemulação é forma mais comum nas leveduras e consiste no crescimento e alongamento de uma pequena gémula a partir de um ponto da superfície da célula mãe por invaginação de uma certa porção da parede celular. À medida que a gémula se desenvolve, o núcleo da célula mãe divide-se por mitose dando origem a um núcleo filho que migra para a gémula, originando assim uma nova célula filha, que pode permanecer ou não ligada à célula-mãe (Richardson & Warnock 2003).

Nos fungos filamentosos a reprodução assexuada faz-se por meio da produção de esporos (endósporos) que podem ficar no interior de estruturas unicelulares (esporangiósporos) ou externamente, através da produção de esporos externos (conídios).

Os endósporos são produzidos por fungos filamentosos cenocíticos pertencentes às classes Zygomycota, como os géneros de *Rhizopus*, *Absidia* e *Mucor* (Kwon-Chung & Bennett 1992). Os conídios são exósporos assexuados que se desenvolvem na extremidade de filamentos micelianos de certos membros dos filos Ascomycota, Basidiomycota e Deuteromycota (Lacaz 1977). São produzidos por células conidiogénicas, que podem ser encontradas em estruturas especializadas, os conidióforos que existem, por exemplo, nos géneros *Aspergillus*, *Penicillium* e nos dermatófitos (Murray *et al.* 2007).

1.3 – Nutrição, metabolismo e crescimento dos fungos

Os fungos são organismos heterotróficos, desprovidos de clorofila, o que impossibilita a utilização da luz como fonte de energia para a elaboração de produtos orgânicos, dependendo, por isso, de seres autotróficos para obter os nutrientes necessários. Esta dependência torna-os seres saprófitas, como decompositores da matéria orgânica do meio ambiente e, eventualmente, parasitas de outros organismos (Oliveira 1999).

Sabe-se que, para o seu desenvolvimento, os fungos necessitam sempre de assimilar compostos de carbono e de azoto para a produzir a sua energia, os quais são retirados dos substratos orgânicos. Segundo Deacon (1984), as moléculas orgânicas mais simples como monossacarídeos, aminoácidos e ácidos orgânicos são absorvidas através da membrana celular enquanto as moléculas mais complexas, como muitos dissacarídeos, têm de ser degradadas em monómeros no exterior das células fúngicas por enzimas libertadas através da parede celular, antes de serem absorvidas pelas células.

Os fungos habitualmente são seres aeróbios, podendo desenvolver-se em anaerobiose envolvendo mecanismos enzimáticos complexos. O metabolismo respiratório inicia-se com a glicólise anaeróbica, através do ciclo de Embden-Meyerhoff-Parnas (ou por outra via alternativa) até a formação do ácido pirúvico que, por descarboxilação oxidativa, se transforma em acetilcoenzima A (Lacaz *et al.* 2002). O processo metabólico nos fungos pode produzir tanto vitaminas como toxinas, ou antibióticos bem como qualquer outro produto industrial como a leucina, serina, metionina, histidina, ácido oleico, entre outros (Oliveira 1999).

Os fungos filamentosos crescem, geralmente a partir de um esporo, pelo alongamento centrífugo dos filamentos ou hifas, que constituem a sua estrutura somática, sempre na procura constante de nutrientes no meio ambiente (Santos *et al.* 1998). Dão origem a colónias que podem variar de cerosas a aveludadas e algodonadas (bolos), de cores, textura, relevo e dimensões muito variáveis. As leveduras, multiplicando-se por gemulação, dão origem a colónias de aspecto cremoso característico. Na sua maioria, produzem colónias glabras, de coloração branca ou bege, textura cremosa e superfície lisa, embora algumas espécies, como as do género *Rhodotorula*, desenvolvam colónias pigmentadas.

Para muitos autores o crescimento dos fungos está intimamente relacionado com as características ambientais e físicas às quais os fungos são expostos. Segundo Sidrim & Rocha (2004), todos os fungos necessitam de condições mínimas necessárias para o seu desenvolvimento tais como:

- Fatores nutricionais – carbono, magnésio, potássio, fósforo e azoto em concentração elevada, e pequenas quantidades de ferro, cobre, zinco etc.
- Fatores físicos – em que se destaca o pH do meio em que crescem, a temperatura, o oxigénio, a humidade e a luminosidade.

O conhecimento desses fatores é de capital importância para controlar o crescimento e desenvolvimento dos fungos.

1.4 - As Micoses Humanas

Os esporos fúngicos e os fragmentos de micélio vegetativo propagam-se facilmente no ambiente através de agentes como o vento, a água, os insetos ou colonizam naturalmente o próprio organismo humano. Quando as condições ambientais são desfavoráveis, podem manter-se em latência por longos períodos de tempo no ambiente até as condições de temperatura, humidade e nutrientes adequados voltarem a ser favoráveis ao seu desenvolvimento.

Não existem, portanto, ambientes livres da presença fúngica porque estes se propagam facilmente sobrevivendo a grandes variações de temperatura, baixa taxa de humidade, grandes variações de pH e baixas concentrações de oxigénio. É comum a exposição a propágulos fúngicos e aos seus metabolitos, principalmente em ambientes fechados e habitados, como residências, escolas, escritórios. Podem ainda dispersar-se para o interior das unidades hospitalares utilizando diversos veículos como a água, ar e objetos de uso hospitalar como meios de transporte, provocando uma grande variedade de infeções sistémicas potencialmente fatais, principalmente em pacientes com o sistema imunitário comprometido (Lacaz *et al.* 2002).

Segundo Richardson & Warnock (2003), as infeções provocadas por fungos são

classificadas de acordo com o grau da invasão no hospedeiro. Classicamente são classificadas em micoses superficiais, micoses subcutâneas e micoses sistêmicas (que podem ser oportunistas).

1.4.1 - As Micoses superficiais

São infecções que afetam apenas as camadas mais externas da pele ou os tecidos queratinizados como a pele, unhas e cabelo. Normalmente, essas infecções atingem milhões de pessoas em todo o mundo e causam pouco desconforto devido à reduzida ou nenhuma resposta imunitária. Estas micoses são facilmente diagnosticadas e tratadas (Murray *et al.* 2007).

As mais comuns são provocadas por fungos dermatófitos, pertencentes ao género *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* ou por leveduras, como as do género *Candida*, que podem fazer parte da flora normal da pele ou das mucosas humanas e animais (Oliveira 1999). Estes organismos habitualmente não produzem doença no hospedeiro a menos que haja alguma mudança circunstancial nas barreiras naturais do mesmo.

Em geral, as micoses superficiais apresentam como principais manifestações clínicas, lesões superficiais cutâneas com contornos mais ou menos arredondados e bordo bem delimitado, ou lesões exsudativas no caso das mucosas.

1.4.2 - As micoses subcutâneas

São micoses que afetam principalmente tecidos subcutâneos, derme, músculos e por vezes os ossos. Geralmente estas infecções surgem como resultado de lesões traumáticas, onde os fungos saprófitas existentes no solo, nos vegetais e na matéria em decomposição são implantados na camada subcutânea da pele, com mais frequência nas populações do meio rural das regiões tropicais e subtropicais. Em hospedeiros com sistema imunitário muito debilitado pode ainda ocorrer a disseminação da infecção através da corrente sanguínea.

Englobam um grupo heterogéneo de entidades nosológicas, causadas por fungos pertencentes a grupos taxonómicos diversos. Diferentes espécies de fungos podem ser responsáveis por manifestações clínicas muito semelhantes. A classificação das várias infecções fúngicas em micoses subcutâneas não é uniforme, variando com os diferentes

autores. Classicamente englobam a esporotricose, a cromoblastomicose, os micetomas, as zigomicoses, as feohifomicoses, as entomofotoromicoses, a lobomicose e a rinosporidiose, sendo as três primeiras as mais frequentes em países tropicais. Os géneros *Sporothrix*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Mucor* e *Rhizopus* estão entre os que mais frequentemente causam estas infeções.

1.4.3 - As micoses sistémicas

São infeções resultantes, na maioria dos casos, da inalação de esporos fúngicos suspensos no ar ambiente, os quais se alojam nos alvéolos pulmonares. Aí poderá ocorrer uma primeira infeção, dependendo do estado imunológico do hospedeiro. Essas infeções também podem surgir através do contacto direto com fontes contaminadas durante intervenções cirúrgicas, através de cateteres, de agulhas ou de outros dispositivos médicos contaminados.

A infeção fúngica pode disseminar-se por múltiplos órgãos, através de vasos sanguíneos, do sistema linfático ou permanecer localizada nos tecidos profundos e órgãos. Eventualmente podem ocorrer, em simultâneo, manifestações cutâneas secundárias.

Os fungos responsáveis pelas infeções sistémicas podem ser divididos em dois grupos distintos: os fungos verdadeiramente patogénicos e os fungos oportunistas.

O primeiro grupo inclui os fungos existentes em áreas endémicas (organismos somente existentes numa determinada área geográfica) como *Histoplasma capsulatum*, *H. duboisii*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis* e *Paracoccidioides brasiliensis*. Estes são capazes de invadir os tecidos tanto de indivíduos imunocompetentes (sem nenhuma predisposição imunitária), como de imunocomprometidos, causando patologias severas de elevada mortalidade (Norton 1994).

A fase inicial da infeção é muitas vezes assintomática ou pode mimetizar uma gripe passageira, por exemplo. O contato com esses microrganismos é frequentemente fatal para os indivíduos imunocomprometidos, devido à sua acentuada virulência. Entretanto, sabe-se que estes microrganismos possuem algumas características morfológicas inatas que aumentam a sua capacidade de virulência, como o dimorfismo, que facilita a sua adaptação e sobrevivência no interior do organismo hospedeiro (Richardson & Warnock 2003).

Os fungos oportunistas podem ser organismos comensais do organismo humano ou então saprófitas, ubíquos na natureza, os quais se encontram no solo, no ar e na matéria orgânica em decomposição. Esses organismos habitualmente não são patogênicos, mas atuam como agentes oportunistas nos casos de debilidade orgânica acentuada.

Estas espécies fúngicas oportunistas são muito numerosas e podem pertencer a um número muito variado de géneros. Os mais comuns pertencem aos géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, *Trichoderma*, *Acremonium*, *Geotrichum*, *Saccharomyces*, *Trichothecium*, entre muitos outros (Boas & Ruiz 2004). Por exemplo, as espécies dos géneros *Rhizopus* e *Mucor* que geralmente afetam pacientes com diabetes *mellitus*, leucemia, ou sob tratamento com drogas imunossupressoras, podem causar zigomicose fatal. As infeções oportunistas causadas por espécies de *Cryptococcus* e *Penicillium* podem ser fatais para doentes seropositivos para o vírus da imunodeficiência humana (Lacaz *et al.* 2002).

1.5 - Infeções fúngicas nosocomiais

A infeção adquirida em ambiente hospitalar, ou infeção nosocomial, pode ser definida como uma infeção adquirida pelo doente após a sua admissão no centro hospitalar, cuja manifestação ocorre durante a permanência no hospital ou após a alta, estando relacionada com a permanência no próprio hospital e/ou com procedimentos médicos (Weinstein, 1998). As infeções em ambiente hospitalar são uma preocupação mundial, tanto nos países desenvolvidos como nos países com menos recursos económicos. Estima-se que só em 2008, teve um custo global de 4,5 a 5,7 biliões de dólares e contribuiu para cerca de um milhão de mortes nos EUA (Krueger & Nelson 2009). É igualmente de realçar que essas infeções constituem um peso significativo na economia dos países, as quais não são somente preocupantes e onerosas para os doentes como também para os próprios hospitais, refletindo-se principalmente no aumento de custos relacionados com morbilidade mais prolongada e acentuada e mais dias de hospitalização e de terapêutica.

Durante as últimas décadas, as infeções fúngicas nosocomiais têm sido apontadas como uma importante causa de morbilidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos (Ascioglu *et al.* 2002). Uma das razões ligadas a este aumento do número de casos está

diretamente relacionada com o crescimento da população de risco, muitas vezes consequência de práticas médicas modernas (métodos cirúrgicos invasivos, transplantes, quimioterapia e uso excessivo de drogas imunossupressoras) e patologias diversas como, infecção pelo VIH, leucemia, anemia e neutropenia acentuada. (Low & Rotstein 2011, Marchetti *et al.* 2004, Pfaller & Diekema 2004). Nestes grupos estão incluídos indivíduos submetidos a transplante de órgãos sólidos, transplante de medula, terapias imunossupressoras, cirurgias complexas e muito invasivas, pacientes com SIDA, doenças tumorais, idade avançada e nascimento prematuro.

Segundo Moura *et al.* (2008), as infeções nosocomiais ocorrem principalmente em hospitais com condições higiénicas pouco rigorosas, onde os processos de desinfeção e esterilização de materiais são inadequados e/ou pouco rigorosos. Aliado a falhas nestes procedimentos, estas infeções podem estar igualmente relacionadas com um deficiente controlo microbiano do ambiente envolvente e dos materiais que circulam dentro do hospital. Os agentes responsáveis pela contaminação nos hospitais são habitualmente bactérias, vírus e fungos. É frequente que a presença destes microrganismos no ambiente hospitalar esteja associada a casos de doença desde irritações e alergias até infeções severas em doentes debilitados, frequentemente fatais (Ministério da Saúde do Brasil 2000).

1.5.1- Epidemiologia das infeções nosocomiais

Alguns fungos, como as espécies dos géneros *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* e fungos Zygomycetes, são tradicionalmente comuns e frequentemente responsáveis por micoses oportunistas em pacientes imunocomprometidos. Entretanto, cada vez mais, são relatadas novas variedades de fungos oportunistas emergentes (Tabela 1.1).

A contaminação dos pacientes por estes agentes pode ter uma origem endógena, por microrganismos que fazem parte da flora habitual do indivíduo (ex. *Candida* sp.), ou exógena quando causada por microrganismos que, não pertencendo à flora normal do paciente (ex. *Aspergillus* sp.), existem no meio ambiente e cujos propágulos podem ser facilmente inalados (Boas & Ruiz 2004).

Nas unidades hospitalares, a candidíase invasiva, a candidemia e a aspergilose invasiva estão entre as infecções oportunistas mais predominantes em pacientes imunocomprometidos.

Tabela 1.1 Espécies fúngicas oportunistas mais comuns como agentes etiológicos de infecções nosocomiais (adaptado por Richardson & Lass-Flörl, 2008)

Género	Espécies	
<i>Candida</i> spp.	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. guilliermondii</i> <i>C. kefyr</i> <i>C. krusei</i>	<i>C. lusitaniae</i> <i>C. lipolytica</i> <i>C. rugosa</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. tropicalis</i>
Outras leveduras	<i>Blastoschizomyces</i> spp. <i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Malassezia</i> spp.	<i>Rhodotorula</i> spp. <i>Saccharomyces</i> spp. <i>Trichosporon</i> spp.
<i>Aspergillus</i> spp.	<i>A. fumigatus</i> <i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i> <i>A. terreus</i>
Outros fungos hialinos	<i>Acremonium</i> spp. <i>Fusarium</i> spp. <i>Paecilomyces</i> spp.	<i>Scedosporium</i> spp. <i>Scopulariopsis</i> spp. <i>Trichoderma</i> spp.
Fungos dematiáceos	<i>Alternaria</i> spp. <i>Bipolaris</i> spp. <i>Curvularia</i> spp.	<i>Cladophialophora</i> spp. <i>Exophiala</i> spp.
Zigomicetas	<i>Absidia</i> spp. <i>Cunninghamella</i> spp. <i>Mucor</i> spp.	<i>Rhizomucor</i> spp. <i>Rhizopus</i> spp.

A candidíase invasiva e candidemia

A candidemia surge quando há invasão da corrente sanguínea por leveduras do género *Candida* durante uma infeção. Naturalmente, estas leveduras podem fazer parte da flora microbiana de indivíduos saudáveis, principalmente nas mucosas do trato digestivo e vaginal. No entanto, em casos de desequilíbrio dessa flora, invadem os tecidos do

doente e causam infecção, denominada de candidíase ou candidose. Estas infecções podem ser benignas, agudas ou crônicas, superficiais ou profundas, e desenvolverem aspectos clínicos variáveis (Barbedo & Sgarbi 2010).

As leveduras do género *Candida*, em particular *Candida albicans*, têm sido as mais vulgarmente envolvidas em infecções hospitalares, estando associadas a um grande número de casos de infecções fúngicas nosocomiais, na medida em que facilmente podem ser transmitidas entre doentes através da manipulação pelos profissionais de saúde, utensílios hospitalares e dispositivos médicos utilizados (Hinrichsen *et al.* 2008). Como apresentam um acentuado dimorfismo, adquirindo facilmente uma morfologia filamentosa, invadem mais eficazmente os tecidos do hospedeiro causando desde infecções orais, vaginais, pulmonares até infecções sistémicas e septicemia (Schulster *et al.* 2004).

Nestes últimos anos tem-se verificado uma grande alteração epidemiológica no que diz respeito à etiologia das infecções hospitalares por espécies não-*albicans*, tais como *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis* que está descrito apresentarem resistência aos fármacos azólicos (Marchetti *et al.* 2004). O mesmo autor acrescenta ainda que a infecção por espécies de *Candida* não-*albicans* tem estado associada a uma estadia prolongada nas unidades hospitalares, contribuindo para o aumento da taxa de morbilidade e mortalidade ($\approx 40\%$) nas unidades hospitalares, bem como o aumento dos custos com a saúde.

Aspergilose invasiva

As espécies do género *Aspergillus* são ubíquas, têm como habitat natural o solo e as plantas e desempenham um importante papel como decompositores da matéria orgânica. Reproduzem-se por meio de conídios que se podem manter suspensos no ar e serem facilmente inalados causando, nos casos de susceptibilidade, infecções invasivas. As reduzidas dimensões dos conídios (2 a 3 μm de diâmetro) permitem, após a sua inalação, a fácil entrada nos alvéolos pulmonares (Rementeria *et al.* 2005).

A inalação desses conídios por indivíduos não atópicos e com sistema imunitário saudável não causa infecção, uma vez que acabam por ser destruídos pelo sistema de defesa do organismo. No entanto, no caso dos indivíduos atópicos podem desencadear reacções alérgicas de ligeiras a graves e em indivíduos com o sistema imunitário

comprometido, podem invadir o tecido pulmonar, passar para a corrente sanguínea, disseminar e invadir órgãos, levando à morte.

Até há poucos anos, a espécie considerada mais patogénica era *A. fumigatus* mas, nestas últimas décadas, com o aumento do número de casos de debilidade imunológica ou de outros fatores de risco, como neoplasias, neutropenia acentuada, corticoterapia, têm ocorrido cada vez mais frequentemente infeções invasivas por outras espécies de *Aspergillus*, como por exemplo, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. versicolor*, etc. (Barnes & Marr 2006).

As manifestações clínicas das infeções por *Aspergillus* spp. variam dentro de um espectro de patologias muito amplo, desde manifestações alérgicas até à colonização crónica e à invasão disseminada tecidular aguda.

1.5.2 – Fatores de risco associados às infeções nosocomiais

Durante as últimas duas décadas, as infeções fúngicas têm sido cada vez mais comuns em ambiente hospitalar. Além disso, porque os fatores de risco para estas infeções continuam a aumentar, é provável que a incidência desta infeção se continue a agravar nas próximas décadas (Richardson & Lass-Flörl 2008). No entanto, o risco de infeção estará sempre diretamente relacionado com a capacidade de defesa do sistema imunitário do paciente e com o nível de exposição ao microrganismo oportunista.

Perante os estudos realizados sobre os fatores de risco destas infeções, vários autores comungam da ideia de que a aplicação de práticas médicas mais avançadas, com finalidade de melhorar o estado e a sobrevivência do paciente, passaram a exigir tratamentos mais agressivos e invasivos que muitas vezes enfraquecem o sistema imunitário deixando o paciente mais suscetível a microrganismos oportunistas (Bahtti *et al.* 2006, Joseph 2006, Low & Rotstein 2011, Richardson & Lass-Flörl 2008, Sabino 2010).

Associados a estes, há que considerar ainda outros fatores de risco para a aquisição de infeções oportunistas, como por exemplo a exposição do paciente a grande quantidade de microrganismos ambientais suspensos no ar, nomeadamente no interior hospital, ou no ar circundante do mesmo e que entrem nas instalações vindos do exterior, a contaminação da água de uso hospitalar e a contaminação das diferentes superfícies dentro do hospital. De acordo com Sabino (2010) estas infeções podem estar

relacionadas com fracos cuidados de higiene, associados ao não cumprimento das recomendações básicas do controlo de infeção pelo pessoal do hospital, tais como um simples hábito de não lavar as mãos antes e depois de todo e qualquer profissional contactar com estes pacientes.

1.6 - Ambiente hospitalar como foco de infeção fúngica

Segundo Sautour *et al.* (2009), a ocorrência de fungos no ambiente de um hospital depende de inúmeros fatores, desde os reservatórios fúngicos identificados no seu interior, como por exemplo, ar não filtrado, água da rede pública não controlada, sistema de ventilação, existência de plantas ornamentais, até à realização de obras no próprio hospital ou nas imediações. A humidade e temperatura ambientais influenciam paralelamente a sua frequência e distribuição.

De acordo com Joseph (2006), o ar, o solo e a água desempenham um importante papel na transmissão de infeções nosocomiais.

O ar atmosférico é, via de regra, o meio de dispersão mais comum e bem-sucedido destes fungos, que se disseminam pela poeira ambiental e se mantêm viáveis por longos períodos em materiais de uso comum e nas superfícies (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge 2002). Entretanto, se o ar ambiente estiver contaminado com grande quantidade de microrganismos patogénicos oportunistas, qualquer agitação aérea poderá transportá-los direta ou indiretamente para o ambiente hospitalar, aumentando assim o risco de infeção nosocomial nos doentes mais suscetíveis.

É comum a contaminação do ar no interior dos hospitais ser consequência de obras de construção tanto no interior como no exterior. Paralelamente, a deficiente manutenção ou mesmo a avaria nos sistemas de ventilação e de ar condicionado, facilitam a infiltração e dispersão de propágulos fúngicos no interior das instalações hospitalares (Sautour *et al.* 2009). A acumulação de humidade e de material orgânico nas bandejas de ar-condicionado pode torná-las também poderosas fontes de contaminação e de dispersão fúngica (Joseph 2006).

Normalmente, os esporos flutuantes que caem sobre as diferentes superfícies, associados às poeiras, constituem um verdadeiro reservatório de fungos. Geralmente a contaminação dessas superfícies não está relacionada com o desenvolvimento direto de infeções nos pacientes, mas sim, indiretamente através do contato com as mãos dos

profissionais de saúde (Sehulster & Chinn 2004). Daí a grande importância de uma lavagem frequente das mãos como forma de minimizar o risco de infecções nosocomiais.

A água também constitui um fator de risco para o aumento de uma infecção hospitalar. Na opinião de Sehulster & Chinn (2004) a utilização, nos cuidados médicos, de água da torneira não tratada, acarreta um risco muito elevado de contaminação. Os fungos facilmente podem utilizar este meio como um veículo para a sua propagação aumentando o risco de contaminação fúngica.

Segundo Sabino (2010), estas fontes exógenas como a água, o ar e as superfícies hospitalares (incluindo os objetos), como meio de transmissão de micro-organismos, se não forem cuidadosamente controladas podem aumentar drasticamente o nível de contaminações fúngicas nos hospitais.

1.6.1– A prevenção e o tratamento das infecções fúngicas

As infecções nosocomiais são difíceis de diagnosticar e de controlar, apesar da existência de um leque alargado de tratamentos antifúngicos. É comum as leveduras do género *Candida* e as espécies de *Aspergillus* provocarem infecções em grupos distintos de pacientes hospitalizados como neutropénicos com cancro, recetores de transplantes hematopoiéticos e de órgãos sólidos, pacientes cirúrgicos, pacientes internados em unidades de cuidados intensivos de adultos e de neonatologia (Richardson & Warnock 2003).

O tratamento das candidoses depende do estado clínico do paciente e do tipo de organismo ou espécie infetante. Geralmente as leveduras *C. albicans*, *C. parapsilosis*, e *C. tropicalis* isoladas do sangue são suscetíveis *in vitro* à anfotericina B e ao fluconazol. Algumas espécies de *Candida* apresentam diferentes padrões de resistência intrínseca como *C. krusei* e *C. glabrata* que são resistentes ao fluconazol mas suscetíveis à anfotericina B e ao voriconazol (Low & Rotstein 2011, Richardson & Lass-Flörl 2008, Richardson & Warnock 2003). No entanto, um dos problemas particulares com os pacientes com candidemia e candidose invasiva é que a sintomatologia é difícil de distinguir clinicamente da sepsis bacteriana, pelo menos no início da infecção. Muitas vezes este facto leva a um atraso inicial na instituição da terapêutica antifúngica ou, a terapêutica empírica inicial pode ser inadequada (Richardson & Lass-Flörl 2008).

É evidente que fungos como *Aspergillus* spp. e algumas espécies emergentes tais como Zigomicetas, *Fusarium* spp. e *Scedosporium* spp. têm sido detectados como sendo os principais agentes etiológicos de infecções fúngicas em pacientes com leucemia, neoplasias, SIDA e em transplantados (Maertens *et al.* 2011). O aparecimento destes organismos é multifatorial e pode estar relacionado com uma intensa imunossupressão dos pacientes, a sobrevivência prolongada de pacientes com uma patologia grave, ou com a pressão seletiva de um amplo espectro de agentes antifúngicos utilizados na profilaxia ou na terapêutica.

É claro que o início precoce do tratamento antifúngico é determinante para a sobrevivência e cura do doente. Portanto, o tratamento das infecções provocadas por fungos emergentes deve ser iniciado com esquemas terapêuticos adequados e específicos para cada caso (Maertens *et al.* 2011). Atualmente, o voriconazol é mundialmente recomendado como a droga de primeira linha para o tratamento da aspergilose, fusariose e scedosporiose com exceção das zigomicoses (resistentes a este fármaco) que têm indicação para serem tratadas com posaconazol (tabela 1.2).

Mas está igualmente demonstrado que estes antifúngicos têm efeitos tóxicos para os pacientes e podem causar algumas manifestações secundárias. Por exemplo o tratamento com a anfotericina B pode desencadear efeitos como febre, calafrios, dor de cabeça, náuseas, vômitos, comprometimento respiratório e em alguns casos de insuficiência renal aguda. No caso do voriconazol pode causar diferentes reações adversas desde erupções cutâneas, alterações visuais transitórias, neuro-toxicidade e hepatite. Para além dos efeitos tóxicos dos fármacos antifúngicos, também podem ocorrer falhas terapêuticas quando associados a outros fármacos, levando por sua vez ao agravamento do quadro clínico do paciente (Maertens *et al.* 2011).

Vários estudos já realizados nesta área (Harbarth *et al.* 2003, McFee 2009) sugerem que apostar na prevenção será a medida mais eficaz e mais económica para combater as infecções nosocomiais e reduzir a taxa de morbidade e mortalidade nos pacientes internados. Por isso, o conhecimento e a conscientização dos vários riscos de transmissão da infecção, das limitações nos processos de desinfecção e esterilização tornam-se imprescindíveis para que se possam vir a tomar as precauções mais adequadas no sentido de melhorar a qualidade da prestação dos serviços de saúde.

Tabela 1.2 Fármacos mais utilizados no tratamento das diferentes patologias fúngicas invasivas em pacientes imunocomprometidos (Low *et al.* 2011).

Espécies Fúngicas	Condição	Terapia	
		Primária	Alternativa
<i>Candida spp.</i>	Adultos não-neutropênicos com candidemia	Fluconazol; equinocandinas	Anfotericina B lipossômica; anfotericina B desoxicolato; voriconazol;
	Neutropenia com candidemia	Equinocandinas; Anfotericina B lipossômica	Fluconazol; voriconazol
<i>Aspergillus spp.</i>	Aspergilose pulmonar invasiva, sinusite, óssea, cardíaca, ou do sistema nervoso central	Voriconazol	Anfotericina B lipossômica; caspofungina; micafungina; posaconazol; itraconazol
<i>Fusarium spp.</i>	Fusariose pulmonar invasiva ou seios paranasais, ou fusariose invasiva disseminada	Voriconazol; Anfotericina B lipossômica	Posaconazol
<i>Scedosporium spp.</i>	Scedosporiose dos seios paranasais, pulmonar invasiva, do sistema nervoso central, óssea, ou scedosporiose invasiva disseminada	Voriconazol	Posaconazol
Zigomicoses	Zigomicose invasiva	Anfotericina B lipossômica	Anfotericina B; posaconazol

1.7 – O diagnóstico laboratorial das infecções fúngicas

O sucesso do diagnóstico de doenças causadas por fungos depende não só da competência das técnicas realizadas no laboratório, mas também, e em larga medida da qualidade da colheita. Amostras colhidas de forma inapropriada, deficiências ao nível do transporte, acondicionamento e processamento, podem traduzir-se tanto numa dispersão de recursos materiais e humanos, como na elaboração de diagnósticos erróneos e consequente ineficácia terapêutica.

Para o diagnóstico de infecções fúngicas, as amostras biológicas variam com a apresentação da doença: hemoculturas, líquido cefalo-raquidiano (LCR), urina, pus (de

abcessos fechados), exsudados, material de descamação da pele e crostas. É recomendado proceder à identificação de todos os fungos isoladas de fluidos corporais e outras amostras estéreis de doentes imunocomprometidos e dos isolados em grande quantidade de qualquer tipo de amostra. O isolamento repetido da mesma espécie de fungos, de diferentes tipos de amostras simultaneamente de vários locais do organismo, é uma boa indicação de infecção disseminada.

O diagnóstico laboratorial convencional das infecções fúngicas baseia-se essencialmente na utilização de duas técnicas: o exame direto das amostras biológicas ao microscópio e a cultura das mesmas em meios de cultura apropriados para o isolamento do agente etiológico.

O exame directo em Micologia Médica é por vezes a única evidência da presença de fungo na amostra. A sua grande mais valia é o facto de permitir observar a morfologia dos fungos *in vivo*, ou seja, a forma que assumem como parasitas, o que é fundamental em fungos patogénicos dimórficos. A rapidez na resposta é também uma grande vantagem deste tipo de exame.

A cultura das amostras clínicas é imprescindível, pois constitui o exame de maior sensibilidade e o único que permite a identificação do agente etiológico envolvido no processo infeccioso. Assim, em caso de escassez de material por dificuldade na colheita, ou outro motivo, deverá ser dada preferência ao exame cultural, sacrificando eventualmente, o exame directo. É fundamental a utilização de antibióticos antibacterianos (cloranfenicol, gentamicina) em meios de isolamento para fungos para impedir o crescimento de bactérias que, tendo um crescimento mais rápido que os fungos, se sobrepõem a estes dificultando ou impedindo o desenvolvimento das suas colónias.

Classicamente, a identificação do fungo crescido em cultura é feita, para as leveduras, com base em métodos bioquímicos e, para os fungos filamentosos, com base na observação das características morfológicas macroscópicas e microscópicas das suas colónias. Mais recentemente, a aplicação de técnicas moleculares na identificação de fungos tem permitido abreviar o tempo de resposta do laboratório e iniciar uma terapêutica mais cedo e mais ajustada facilitando o controlo das infecções.

Identificação molecular de isolados fúngicos

Apesar das técnicas convencionais ainda permanecem como o *gold standard*, porque as técnicas moleculares ainda não estão suficientemente padronizadas para as substituírem por completo no diagnóstico das infecções, estas têm facilitado muito a identificação dos fungos isolados a partir das culturas por serem muito mais sensíveis e rápidas.

Os genes do RNA ribossômico têm sido largamente utilizados em estudos taxonômicos de fungos, na identificação de gêneros e de espécies dos mais variados organismos, incluindo dos fungos. Estes genes estão organizados numa unidade de DNA ribossômico (rDNA) que se repete em tandem em várias dezenas de cópias, dependente do fungo. É composta por várias subunidades, 18S, 5,8S e 26S, que formam uma única unidade transcricional (Figura 1.1). Esta região do DNA possui regiões conservadas com baixa taxa de polimorfismos genéticos ao longo da sua evolução, alternando com regiões mais variáveis.

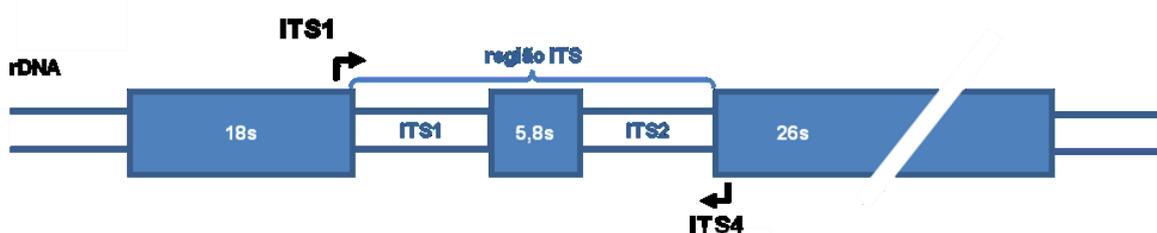


Figura 1.1 Organização da região ITS do rDNA, local de hibridação dos primers ITS1 e ITS4 para amplificação da mesma por PCR (adaptado de White *et al.* 1990)

No rDNA, as sequências das regiões ITS variam entre espécies diferentes de fungos, permitindo através do alinhamento das sequências nucleotídicas desta região, a identificação do gênero e espécie de muitos isolados por comparação com as sequências depositadas em bases de dados públicas, como o GenBank, por exemplo (Anderson *et al.* 2001). A avaliação direta dos polimorfismos da região ITS do rDNA permite igualmente determinar as relações de proximidade filogenética entre espécies (Baldwin *et al.* 1995, Ribeiro *et al.* 2009, White *et al.* 1990).

1.8 – Caracterização do local de colheita: Hospital Agostinho Neto

Localizado na costa ocidental africana, a cerca de 500 quilómetros a oeste do Senegal, Cabo Verde é um arquipélago de dez ilhas, sendo 9 habitadas e 8 ilhéus, todos de origem vulcânica, totalizando uma superfície terrestre de 4033 km², administrativamente dividida em 22 municípios (censo 2010).

O País encontra-se numa extensa faixa saheliana, com clima do tipo tropical seco, dividida em duas estações distintas: a seca e a húmida. As ilhas apresentam temperaturas elevadas, com uma média de 25°C durante todo ano.

Cabo Verde é um país com poucos recursos financeiros, o que naturalmente influencia a qualidade de vida da sua população e, conseqüentemente, dos serviços prestados. Ao nível da saúde é um país que possui dois hospitais centrais, um localizado na Cidade da Praia, ilha de Santiago que é a capital económica e administrativa do país, e o outro no Mindelo, ilha de S. Vicente. Estes hospitais dão uma cobertura de cuidados de saúde a mais de 1/4 da população residente no arquipélago.

O Hospital Dr. Agostinho Neto na cidade da Praia, onde foi realizado o nosso estudo, é um centro hospitalar vocacionado para a prestação de serviços a nível secundário e terciário, ou seja, mais orientado para serviços clínicos especializados que envolvem procedimentos médicos mais complexos e técnicas clínicas complexas mais invasivas. Além disso, o Hospital Dr. Agostinho Neto desenvolve igualmente a sua atividade em articulação com todos os Centros de Saúde, Hospitais Regionais e Delegações de Saúde do país, funcionando como centro de referência para a prestação de cuidados diferenciados, facto que muitas vezes a leva à sua sobrelotação.

Este hospital encontra-se estruturado em vários blocos, organizado em diferentes áreas de prestação de serviços, desde os serviços de atendimento de referência aos serviços de atendimento de urgência/emergência (Tabela 1.3).

Segundo o relatório estatístico do Ministério da Saúde de Cabo Verde (2010) o hospital em estudo tem como áreas de prestação de serviços mais críticas a Medicina, a Cirurgia e a Neonatologia onde a taxa de mortalidade ainda é muito elevada (anexo 1). É nestas unidades onde são encontrados pacientes com maior grau de fragilidade do sistema imune, o que pode em algum momento justificar a elevada taxa de mortalidade. Por exemplo, nos serviços de Medicina, a Unidade de Infeciologia acolhe pacientes com

VIH em estado crítico e na unidade de Neonatologia recém-nascidos de baixo peso com sistema imune prematuro, aumentando assim a suscetibilidade destes doentes a contrair infecções oportunistas quando expostos a fatores de risco.

Tabela 1.3 As áreas de prestação de cuidados de saúde no Hospital Dr. Agostinho Neto em Cabo Verde¹.

Especialidades com serviço de internamento	Especialidades sem serviço de internamento	Serviços complementares de diagnóstico e terapêutica
• Medicina Interna	• Estomatologia	• Imagiologia
• Infeciologia e Hemodiálise	• Anestesia	• Análises Clínicas
• Cirurgia (Geral, Córdio-Torácica, Maxilo-facial);	• Medicina Física e Reabilitação	• Endoscopia
• Oftalmologia e Otorrinolaringologia	• Urologia	• Bloco cirúrgico
• Obstetrícia-Ginecologia	• Neurologia	• Anatomia patológica
• Orto-Traumatologia	• Oftalmologia	• Hemoterapia
• Pediatria e Neonatologia	• Otorrinolaringologia	• Farmácia
• Psiquiatria	• Pneumologia	• Dietética
	• Dermatologia	
	• Quimioterapia oncológica	
	• Psicologia Clínica	
	• Alergologia	

¹Adaptado de Fonte do Ministério da Saúde de Cabo Verde (2010) Disponível em <http://www.minsaude.gov.cv>.

1.9 - Objetivos e plano da dissertação

A contaminação do ambiente hospitalar por fungos constitui um grave problema de saúde pública pelo que consideramos ser necessário começar por fazer um diagnóstico das condições que possam envolver riscos associados a possíveis infecções nosocomiais a fim de definir as estratégias acertadas de modo minimizar consequências nefastas para os doentes e para os serviços hospitalares. Neste contexto foi proposto, como objetivo

geral do nosso trabalho, avaliar a existência de possíveis fontes de contaminação e transmissão fúngica no Hospital da Praia, na ilha de Santiago, em Cabo Verde. Para a sua concretização, foram considerados os seguintes aspetos:

- Avaliar a ocorrência de diferentes espécies fúngicas em dependências do Hospital Agostinho Neto com maior risco de infeções nosocomiais, nomeadamente em salas de internamento e salas associadas ao bloco operatório.
- Conhecer as vias de transmissão de fungos mais importantes, dentro das instalações hospitalares, nomeadamente através do ar, água canalizada de consumo corrente e das superfícies.
- Confirmar a existência de contaminação ambiental por fungos relacionando-a com a ocorrência de infeções fúngicas adquiridas em ambiente hospitalar.
- Fazer a identificação molecular das espécies do género fúngico mais prevalente e com maior importância médica, através do estudo das sequências da região ITS do DNA ribossómico (rDNA) de cada isolado desse género.

Esta dissertação está organizada em quatro capítulos:

- No primeiro capítulo, fizemos um enquadramento teórico sobre as características gerais dos fungos destacando aspetos como a morfologia, reprodução, nutrição, metabolismo e crescimento. Em seguida, descreve-se a sua importância médica como responsáveis por diversas infeções humanas. Faz-se uma abordagem geral sobre as infeções fúngicas nosocomiais, com ênfase na sua epidemiologia e fatores de risco associados. Foi feita a caracterização do ambiente hospitalar como foco de infeção fúngica, as estratégias de prevenção e tratamento das infeções fúngicas. Por último, fizemos um enquadramento do local de colheita e do hospital em estudo, bem como o seu diagnóstico laboratorial, finalizando com a exposição dos objetivos gerais e específicos do estudo.
- No segundo capítulo descrevemos os materiais e métodos utilizados ao longo da investigação. É descrita a seleção dos locais de colheitas de amostras, a metodologia aplicada no isolamento em cultura dos fungos, da identificação convencional das espécies fúngicas isoladas e da identificação molecular de algumas espécies com maior importância médica.

- O terceiro capítulo é dedicado à análise e discussão dos resultados obtidos. Em primeiro lugar foram feitas comparações entre os diferentes morfotipos encontrados a partir de cada fonte ambiental, em cada local de colheita e correlacionados os isolados encontrados nos vários serviços do hospital. Em seguida, relativamente à espécie de maior importância médica com maior prevalência, foi feita a correlação entre os diferentes serviços.

- No quarto capítulo apresentamos as conclusões finais e sugestões para melhorar as condições ambientais da prestação dos serviços de saúde no Hospital Agostinho Neto, no sentido de um maior controlo de possíveis infeções fúngicas nosocomiais.

Capítulo II: Material e Métodos

2.1 Seleção dos locais de colheita de amostras

No Hospital Agostinho Neto da cidade da Praia em Cabo Verde foram recolhidas amostras ambientais em seis unidades distintas: Bloco Operatório, Internamento de Cirurgia, Internamento de Neonatologia, Internamento de Infeciologia, Unidade de Oncologia e Unidade de Hemodiálise.

2.2 Colheita das amostras ambientais

Todas as amostras foram colhidas durante o mês de Janeiro de 2012 e transportadas de imediato para o Laboratório de Micologia da Unidade de Microbiologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical em Lisboa para a realização dos exames laboratoriais.

Para a realização das colheitas foi levado para Cabo Verde todo o material necessário para colheita de amostras ambientais: placas de Petri com meio de Sabouraud com cloranfenicol, zaragatoas esterilizadas, tubos de ensaio com meio Sabouraud com cloranfenicol, quadrados esterilizados de 100 cm², filtros esterilizados com porosidade de 0,25 µm, suportes de filtração (Millipore), bomba de vácuo, kitasato, fio reto, ansa e pinça, *parafilm* e água destilada esterilizada. Todos os materiais necessários à colheita das amostras foram previamente esterilizados e adequadamente transportados de modo a garantir a qualidade e fidelidade das amostras colhidas. Foi criteriosamente elaborado um plano prévio dos locais mais adequados para a realização das colheitas que incluíssem, em cada local selecionado, amostras de ar no interior das salas, água da torneira utilizada pelo pessoal do hospital ou pelos pacientes e amostras de diferentes superfícies de uso comum no interior das salas, incluído também as superfícies das bandejas dos aparelhos de ar condicionado.

2.2.1 Colheita de ar e água e superfície

Para a colheita das amostras de água, foram retirados 200ml de água da torneira depois de se ter deixado sair a água estacionada na canalização da rede de abastecimento durante 5 minutos. É importante realçar que durante a filtração o copo Millipore foi

mantido tapado para evitar a contaminação da água com microrganismos existentes no ar. A filtração da água foi feita através da membrana Millipore, criando vácuo no kitasato. No final, o filtro foi retirado e colocado de imediato sobre o meio de cultura de uma placa de Petri a fim de permitir o crescimento de todo e qualquer fungo retido no filtro.

A colheita do ar foi realizada pelo mesmo processo, deixando o suporte Millipore aberto à altura de um metro do chão de modo que houvesse sucção do ar ambiente durante um minuto, por forma a que ficassem retidos no filtro os esporos flutuantes (Figura 2.1). Em seguida o filtro foi retirado e colocado de imediato sobre o meio de cultura em placa de Petri.



Figura 2.1 Colheita de amostras de ar ambiental no Hospital Agostinho Neto, da cidade da Praia, em Cabo Verde.

A colheita das diferentes superfícies foi realizada passando uma zaragatoa embebida em água destilada esterilizada, cobrindo toda uma área de 100cm^2 na superfície selecionada para o estudo. Para delimitação da referida área foi utilizada uma folha de papel, previamente esterilizada, com um recorte de $10 \times 10 \text{ cm}$ e a zaragatoa humedecida foi passada em ziguezague sobre toda a superfície do recorte quadrado. Em seguida foi realizada a sementeira desse inóculo em meio de cultura em placa de Petri por espalhamento em toda a sua superfície (Figura 2.2).

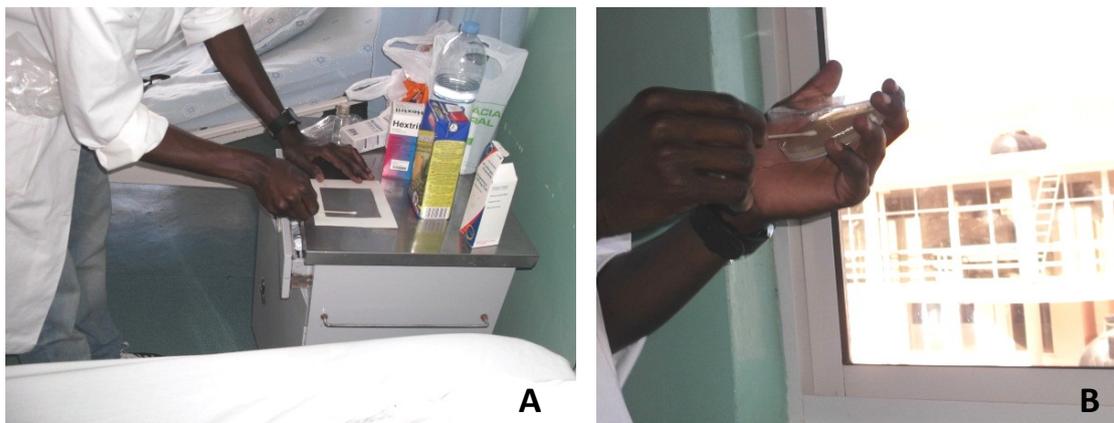


Figura 2.2 Representação ilustrativa da colheita e sementeira de amostras de superfícies. (A) Colheita da amostra de superfície, com zaragatoa, numa área de 100 cm²; (B) sementeira da amostra na placa de petri com meio de cultura agar Sabouraud dextrose com cloranfenicol.

2.3 Cultura e isolamento dos fungos

2.3.1 Meios de cultura

O meio de cultura utilizado para a sementeira ou isolamento de fungos foi o meio Sabouraud agar (4% dextrose, 1% peptona, 2% agar, p/v) adicionado de cloranfenicol para impedir o crescimento de bactérias saprófitas. Sem este aditivo, as bactérias existentes cresceriam mais rapidamente até ocupar todo o meio de cultura, impedindo o desenvolvimento das colónias fúngicas. Por outro lado, o meio de Sabouraud é um meio de cultura que permite o crescimento de todo e qualquer fungo existente na amostra por conter uma fonte de carbono e de azoto e os minerais essenciais ao crescimento fúngico.

Após o isolamento dos fungos em cultura, os meios de cultura de Malte agar e de *Corn Meal* agar podem ser utilizados para estimular o desenvolvimento de estruturas reprodutoras de fungos que apresentem fraca ou ausência de esporulação. Como para a identificação dos fungos filamentosos é essencial a observação dos esporos e das estruturas de frutificação, muitas vezes é necessário recorrer a outros meios de cultura, ou mais pobres em nutrientes, ou mais ricos em nutrientes, para estimular a sua produção.

2.3.2 Incubação

As amostras colhidas a partir de fontes ambientais no Hospital Agostinho Neto foram mantidas à temperatura ambiente durante a estadia em Cabo Verde, uma vez que a temperatura ambiente média do país varia entre 25°C e 30°C que é a temperatura ideal para o crescimento dos fungos. Todas as culturas foram desta forma incubadas durante cerca de 4 a 5 dias até se observar crescimento de colónias fúngicas, após os quais, foram isoladas para tubos de ensaio com meio inclinado de Sabouraud agar.

2.3.3 Isolamento das colónias

A partir de cerca de quatro dias de incubação os primeiros fungos começaram a apresentar crescimento suficiente para uma análise macroscópica das colónias. Diariamente, as placas de petri eram observadas e, à medida que as colónias se iam desenvolvendo, foi sendo contado o número das colónias que apresentavam características morfológicas macroscópicas (morfotipos) idênticas em cada placa de petri. A partir de cada tipo de colónia foi retirada uma pequena porção de uma das colónias e feito o isolamento da mesma em meio Sabouraud dextrose adicionado de cloranfenicol para posterior estudo de todos os fungos que apresentavam um aspeto morfológico diferente. Todas as colónias de fungos com características diferentes foram assim isoladas e etiquetadas em tubos de ensaio diferentes para posterior transporte e estudo.

2.4 Identificação convencional das espécies fúngicas isoladas

A identificação convencional foi baseada na análise macroscópica e microscópica de cada uma das colónias isoladas. A observação macroscópica baseou-se na observação das características da cor do verso e reverso, dimensão, relevo, textura e topografia da colónia devido à esporulação desenvolvida.

A identificação microscópica foi feita a partir de observações microscópicas de pequenas porções das colónias montadas entre lâmina e lamela e coradas com azul lactofenol. Foi registada a morfologia das hifas, tipo de frutificação e a dimensão e agrupamento dos esporos. Com alguns fungos menos pulverulentos realizaram-se preparações utilizando fita-cola. Esta técnica consiste em fazer aderir uma pequena porção de fita adesiva transparente suavemente sobre a superfície da colónia e colocá-la

numa lâmina de microscópio sobre uma gota de azul lactofenol. Cobre-se com uma lamela e observa-se ao microscópio.

Para a identificação até ao género dos fungos isolados, e de algumas espécies, foi feita a conjugação de todas as características observadas macroscópica e microscopicamente, comparando-as com as descrições apresentadas em livros de Micologia. Nos casos em que o crescimento em Sabouraud não permitiu o desenvolvimento das estruturas fúngicas necessárias à identificação dos fungos, procedeu-se à subcultura dos mesmos em outros meios de cultura (mais pobres ou mais ricos em nutrientes), como por exemplo o meio de Malte agar, para estimular a sua produção. Somente a observação dessas características permitiria a identificação convencional dos géneros, e eventualmente, das espécies fúngicas.

A identificação dos fungos filamentosos foi efectuada com o auxílio dos atlas de identificação de Hoog *et al.* (2000) e Lacaz *et al.* (2002). A identificação convencional das leveduras foi feita por um método bioquímico, o kit comercial ID 32C (Biomerieux[®]), através dos perfis de assimilação de determinados compostos, seguindo as instruções do fabricante.

2.5 Identificação molecular de algumas espécies com maior importância médica.

Os métodos moleculares são ferramentas analíticas que, nestes últimos anos, têm sido utilizadas na identificação e estudo dos mais variados organismos, nomeadamente em animais, vegetais, bactérias, fungos, entre outros. Muitas das técnicas exigem que se comece por fazer a extração do material genético (DNA) das amostras, e os métodos de extracção seleccionados dependem essencialmente dos organismos em questão e da necessidade de se obter o material genético em um maior ou menor estado de pureza (Plaza *et al.* 2004).

2.5.1 Extração do DNA de fungos isolados em cultura

Para a extração de DNA das espécies de fungos filamentosos isolados neste trabalho foi utilizada uma metodologia específica de extração a partir das culturas puras de acordo com os procedimentos descritos no Kit QuickGene[®] DNA tissue (FUJIFILM).

A selecção desta metodologia de extracção prendeu-se com o facto de por vezes ser difícil romper a parede celular das células fúngicas e de se obter DNA com um bom nível de integridade e pureza. Este kit comercial tem a vantagem de colmatar estas dificuldades e de permitir obter DNA de boa qualidade para aplicação em diferentes técnicas moleculares.

As culturas seleccionadas para serem identificadas por um método molecular foram crescidas em meio de cultura de Sabouraud agar aproximadamente durante uma semana, incubadas à temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) para produção abundante de conídios.

Assim que atingiram a maturação, foram retirados cerca de 15 a 30 mg de colónia e colocados num tubo eppendorf de 2 ml. Em seguida adicionaram-se 30 μl de EDT (Proteinase K) e 180 μl de MDT (*Tissue Lysis Buffer*). Os tubos foram selados com parafilm e incubados a 55°C durante uma noite com objetivo de provocar a lise da parede e das membranas celulares e conseqüentemente a libertação dos componentes intracelulares.

No dia seguinte a suspensão foi agitada em vortex à velocidade máxima durante 10 minutos seguida de centrifugação durante 5 minutos à velocidade de 11 000 g. O sobrenadante é transferido para um tubo eppendorf de 1,5 ml, adicionados 250 μl de LDT (*Lysis Buffer*) e novamente agitado no vortex durante 10 minutos. Adicionam-se 3 μl de RNase $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$, agita-se no vortex durante 3 minutos e incuba-se inicialmente durante 10 minutos a 70°C e depois 30 minutos a 95°C . Em seguida, para obter os lisados, adicionam-se 350 μl de etanol a 99% seguido de agitação no vortex à velocidade máxima.

Os lisados são então transferidos para os cartuchos do kit ou *cartridges* QuickGene[®] e fez-se a primeira pressurização. Adicionam-se em seguida 750 μl de solução WDT (*Wash Buffer*) e pressuriza-se novamente, repetindo este passo mais duas vezes. Em seguida as *cartridges* são transferidas para as posições de eluição, adicionam-se 100 μl de CDT (*Elution Buffer*), incuba-se à temperatura ambiente durante 5 minutos, após o que é feita uma última pressurização para obter o DNA genómico num bom grau de pureza e integridade.

2.5.2 Amplificação da região ITS do rDNA

Para a amplificação desta região foram utilizados os primers universais ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC) na mistura reaccional indicada na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 Mistura reaccional para amplificação por PCR da região ITS do rDNA dos fungos isolados e selecionados para a reação de sequenciação.

Solução stock	Concentração final	Volume por tubo (μ l)
Água bidestilada		26,6
Tampão 10x	1x	5,0
MgCl ₂ 25mM	3,5 mM	4,0
dNTPs 1,25mM cada	250 μ l cada	5,0
Mix ITS1+ITS4 5 μ M	0,4 μ M	4,0
<i>Taq</i> polimerase	1 U	0,4
DNA		5,0
Volume final:		50,0

A reação de PCR foi realizada num termociclador de marca BioRad, modelo Icycler, nas seguintes condições: 6 min a 95°C seguidos de 35 ciclos de 20 s a 95°C, 20 s a 55°C e 60s a 72°C, com uma extensão final de 5 min a 72°C. Em seguida os produtos foram mantidos a 4°C. Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% durante 45 minutos a 70 V num equipamento de marca Amersham Pharmacia Biotech EPS 301 Electrophoresis Power Supply fabricado no Reino Unido.

2.5.3 Purificação do produto amplificado

Para o DNA amplificado ser sequenciado, foi necessário purificar os produtos amplificados a fim de se retirarem as impurezas como proteínas, enzimas e alguns nucleótidos em excesso.

Para a purificação do nosso produto PCR foi utilizado um kit de purificação da SIGMA GenElute PCR clean-up, seguindo o protocolo indicado pelo fabricante.

Procedimento de purificação

A coluna com membrana é previamente montada num tubo de recolha de 2ml (fornecidos com o kit GenElute[®]). Em seguida são adicionados 500 µl de solução de preparação da coluna (*column preparation solution*) a cada coluna de purificação e são centrifugadas a 12.000 g durante 1 minuto. Descarta-se o líquido do tubo coletor e recoloca-se a coluna no mesmo tubo.

É adicionada à coluna a solução de ligação (*binding solution*), num volume cinco vezes superior ao do produto PCR, e centrifuga-se à velocidade máxima durante um minuto. O líquido no tubo de coleta é novamente descartado e a coluna reposta no mesmo tubo. Em seguida são adicionados à coluna 500 µl de solução de lavagem diluída (*diluted wash solution*) e esta é centrifugada à velocidade máxima durante um minuto. O fluido do tubo de recolha é novamente descartado e a coluna reposta para uma nova centrifugação à velocidade máxima durante 2 minutos, sem a adição de qualquer solução de lavagem, para remover o excesso do etanol. O tubo da coleta e os fluidos residuais são descartados, e a coluna é transferida para um novo tubo de coleta de 2 ml. São adicionados, no centro da coluna, 50 µl de solução de eluição (*elution solution*) e a coluna é incubada à temperatura ambiente durante um minuto.

A coluna é centrifugada à velocidade máxima durante 1 minuto e o produto de PCR é transferido para o novo tubo. O DNA existente no produto eluído está pronto a ser utilizado de imediato ou então deve ser conservado a -20 °C.

2.5.4 Sequenciação da região ITS do rDNA.

As reações de determinação das sequências correspondentes à região ITS1-5.8S-ITS2 dos nossos produtos de PCR foram realizadas por uma empresa especializada, a STABvida. Os resultados obtidos após a sequenciação foram editados através do Software Codoncode aligner para serem alinhados e corrigidos antes de ser depositado no Software *Blast* do NCBI para procurar sequências similares. Com base nas semelhanças encontradas foi possível identificar até ao género e até à espécie muitos dos isolados fúngicos estudados neste trabalho.

Capítulo III: Resultados e Discussão

3.1- Amostras obtidas no Hospital Agostinho Neto

As unidades hospitalares deveriam estar sensibilizadas para disponibilizar amostras biológicas adequadas para a obtenção de informações relevantes sobre o(s) verdadeiro(s) agente(s) etiológico(s) de possíveis infeções nosocomiais.

O Hospital Agostinho Neto é um dos poucos hospitais de Cabo Verde equipados com unidades clínicas onde se realizam procedimentos invasivos em doentes e conseqüentemente deve redobrar os cuidados com a higiene e a segurança, incluindo a qualidade do ar, água e outros elementos ambientais. Entre as diferentes Unidades hospitalares, destacámos por esse facto a Unidade de Cirurgia e os serviços com internamento prolongado de pacientes com fragilidade do sistema imunitário. Por conseguinte, foi avaliada a ocorrência e a variabilidade fúngica ambiental nos seguintes serviços do hospital: Unidade de Neonatologia, Unidade de Infeciologia, Unidade de Oncologia, Bloco Operatório, Internamento de Cirurgia e Internamento de Hemodiálise.

Quanto à questão logística é de salientar que as Unidades de Neonatologia, Cirurgia, Hemodiálise e Oncologia estão equipadas com sistema de controlo do ar (ar condicionado) sem filtros HEPA, sendo que na Unidade de Cirurgia, o funcionamento do sistema de controlo do ar não é permanente e a renovação do ar das alas é feita através da abertura das janelas para o exterior. Na Unidade de Infeciologia o ar interior é renovado e ventilado abrindo as janelas, e no Bloco Operatório o ar é controlado pelo sistema de ar condicionado e pressurização negativa das salas de operação.

No entanto, é importante frisar que o hospital em estudo possui algumas limitações na prestação de serviços especializados na medida em que somente presta os serviços terciários básicos que não incluem cirurgias mais delicadas nem transplantes de órgãos sólidos ou hematologia.

As amostras foram colhidas respeitando as normas de qualidade, segurança e os procedimentos mais indicados para a realização do seu estudo laboratorial. O material das amostras recolhidas incluiu amostras de água da rede pública de abastecimento do hospital, do ar no interior das diferentes dependências hospitalares e amostras de diferentes superfícies de uso hospitalar comum e de áreas habitualmente frequentadas por doentes mais debilitados. Foi dada especial atenção à recolha de amostras de água,

ar e das superfícies do Bloco Operatório, da sala de internamento Neonatologia e das salas de internamento dos pacientes submetidos a cirurgias.

Realizou-se um total de 34 colheitas de amostras, tendo sido 11 amostras recolhidas a partir do ar, 6 amostras a partir da água e 17 de superfícies.

As amostras do ar foram colhidas em maior número (cinco) no bloco operatório devido a este serviço estar subdividido em várias subunidades no seu interior, tais como: sala de preparação para a Cirurgia, sala de Cirurgia, sala de Recobro, sala de pós-operatório e corredor do Bloco Operatório. Na Unidade de Internamento Cirúrgico foram feitas duas colheitas de ar, uma em cada subunidade: a de Internamento Cirúrgico e a de Internamento de Grandes Queimados. Nas outras unidades foi realizada apenas uma colheita de ar em cada, por serem unidades sem subdivisões internas.

As amostras da água foram colhidas uma só vez por cada unidade, tendo em consideração que a água encontrada nas torneiras de cada unidade provém da mesma rede de abastecimento.

As amostras das superfícies variaram muito dentro de cada unidade, dependendo do mobiliário ou dos equipamentos existentes. Incluíram colheitas das mesas-de-cabeceira, janelas, cadeiras/camas e superfícies das bandejas de ar condicionado de acordo com a distribuição indicada em anexo II.

O maior número de colónias fúngicas proveio das colheitas realizadas nas superfícies ($2696\text{ufc}/\text{m}^2$), em seguida a partir das amostras de água ($685\text{ufc}/\text{m}^3$), e um menor número ($393\text{ufc}/\text{m}^3$) a partir das amostras de ar (tabela 3.1).

Em função dos resultados obtidos, verificamos que foi a partir das superfícies que se isolou um maior número de colónias fúngicas, o que nos permite alertar para a grande necessidade de tomar as devidas precauções para minimizar esses focos de disseminação. Sabendo que superfícies contaminadas podem ser responsáveis pela contaminação direta de objetos, dispositivos médicos, ou até as próprias mãos que nelas passem, ou indiretamente, através da dispersão de esporos por correntes de ar, torna-se fundamental ter consciência da grande necessidade de as manter livres de microrganismos.

Tabela 3.1 Ocorrência de colónias fúngicas isoladas nos diferentes serviços do Hospital Agostinho Neto, cidade da Praia, Cabo Verde.

		Ar ufc ¹ /m ³	Água ufc/m ³	Superfícies ufc/m ²
Serviços com Internamento	Bloco operatório	63	255	895
	Cirurgia	15	25	186
	Neonatologia	15	145	320
	Infeciologia	80	105	660
Hospital de Dia	Unidade Oncologia	185	150	480
	Unidade Hemodiálise	35	5	155
Total		393ufc/m³	685ufc/m³	2696ufc/m²

¹ufc, unidades formadoras de colónias.

Pela análise da tabela 3.1 verifica-se a existência de uma grande variação do número de colónias encontradas nos diferentes locais e a partir das diferentes amostragens.

Nos serviços com internamento, as amostras obtidas a partir do ar do serviço de Infeciologia foram as que apresentaram maior número de unidades formadoras de colónias (80 ufc/m³) muito provavelmente devido à falta de um eficiente sistema de controlo do ar, uma grande ligação com o exterior do hospital, ou do grande fluxo de entradas e saídas de pessoal médico, doentes e visitas, que facilmente podem promover o transporte propágulos fúngicos para o interior das instalações. Na realidade, existe um hábito local de abrir as janelas para o exterior do hospital a fim de arejar as salas, mesmo sabendo que no exterior há obras a decorrer. Tem sido relatado por vários autores que a realização de obras de renovação e de extensão de instituições hospitalares pode ser responsável pelo aumento significativo das infeções hospitalares em doentes imunologicamente fragilizados, tanto durante como após as obras, devido à disseminação de microrganismos no ambiente hospitalar, incluindo de fungos (Alberti *et al.* 2001, Cornet *et al.* 1999, Perdelli *et al.* 2006, Sixt *et al.* 2007).

Relativamente às amostras de água, foi no Bloco Operatório onde se isolou maior número de fungos (255ufc/m³), cerca do dobro dos que foram isolados da mesma fonte

em outros serviços com internamento, como a Neonatologia (145/m³) e a Infeciologia (105ufc/m³).

Estas ocorrências podem estar relacionadas com o facto dos tubos de canalização da rede de distribuição de água nos serviços serem mais antigos nas instalações do Bloco Operatório, onde os fungos podem ter criado biofilmes facilitando a manutenção e disseminação dos seus propágulos. Segundo Anaissie, *et al.* (2003) e Hedayati *et al.* (2011), os sistemas hospitalares de distribuição de água mais antigos, podem conter biofilmes formados por microrganismos no seu interior que podem ser um potencial reservatório interno de espécies como *Aspergillus* e de outros fungos oportunistas. Os mesmos autores acrescentam ainda, que os resultados encontrados ao longo dos anos de estudo indicam a existência de uma forte correlação entre os fungos encontrados em amostras da água e nas amostras obtidas do ar, o que leva a crer que a contaminação interna do ar hospitalar também pode ocorrer através da dispersão dos propágulos fúngicos encontrados na água de consumo hospitalar.

Quanto às amostras recolhidas a partir das diferentes superfícies, as provenientes do Bloco Operatório apresentaram um número muito mais elevado de colónias fúngicas (895ufc/m²) em relação aos outros serviços com internamento, o que pode estar igualmente relacionado com a movimentação e utilização constante dos profissionais e doentes, associado a poucos cuidados com a desinfeção regular das superfícies.

Segundo Latgé (1999), as amostras das superfícies podem ser uma forma alternativa de avaliação qualitativa da contaminação do ar. Embora nenhuma conclusão sobre a carga fúngica possa ser alcançada a partir deste estudo, estes resultados podem fornecer informações importantes para a necessidade de monitorização contínua dos índices de contaminação do ar atmosférico.

Relativamente às instalações do Hospital de Dia, foi na Unidade de Oncologia onde se isolou um maior número de colónias fúngicas quer a partir do ar, da água, como também das superfícies. Na verdade, é muito distinta a utilização das duas unidades estudadas, Oncologia e Hematologia, o que pode estar na origem dessa discrepância. Na Unidade de Oncologia, a porta está permanentemente aberta, não há controlo do ar no seu interior e há muita movimentação de entradas e saídas. Contrariamente, a Unidade de Hemodiálise tem uma utilização mais restrita e controlada, as portas estão regularmente fechadas e o ar e água interiores são mais controlados. Adicionalmente é

natural que também haja um maior cuidado de higiene e desinfeção regular das instalações nesta última unidade, daí os resultados terem sido mais apropriados.

Após esta análise global dos resultados obtidos nos diferentes serviços do hospital, vamos agora analisar mais detalhadamente as várias amostras obtidas nos diferentes locais de cada serviço.

Como foi referido nos materiais e métodos, à medida que eram realizadas as diferentes colheitas, as amostras iam sendo inoculadas nos meios de cultura em placas de petri. Em cada placa de petri, relativa a cada um dos locais de colheita, foram observadas diariamente todas as colónias de fungos que se iam desenvolvendo durante a incubação e, com base no seu aspeto macroscópico (cor do verso e reverso, dimensão, relevo, textura e topografia da colónia), foi selecionada uma colónia de cada morfotipo e feita uma repicagem da mesma em tubo de ensaio para o isolamento de culturas puras.

A partir das colheitas efetuadas, foram isolados 104 morfotipos diferentes em culturas puras, dos quais 54 foram isolados a partir das superfícies, 21 a partir das amostras de água e 29 a partir das amostras de ar (tabela 3.2), a fim dos fungos serem posteriormente identificados até ao género ou até à espécie pelos métodos indicados em Material e Métodos.

Tabela 3.2 Morfotipos fúngicos isolados a partir das amostras recolhidas nas diferentes unidades do Hospital Agostinho Neto, cidade da Praia, Cabo Verde.

		Ar	Água	Superfícies	Total
Serviços com Internamento	Bloco operatório	13	4	9	26
	Cirurgia	3	4	20	27
	Neonatologia	3	3	13	19
	Infeciologia	3	5	3	11
Hospital de Dia	Unidade de oncologia	4	4	3	11
	Unidade de hemodiálise	3	1	6	10
Total		29	21	54	104

Relativamente aos 104 morfotipos diferentes de fungos cujas colónias foram isoladas para posterior identificação, a variação da sua ocorrência em cada unidade hospitalar estudada foi muito distinta.

A identificação destes isolados por métodos convencionais (análise macroscópica e microscópica dos isolados) demonstrou a presença dos mais variados tipos de fungos existentes no ambiente das diferentes unidades hospitalares.

Perante o resultado apresentado na tabela 3.2 verifica-se que foi nos serviços com internamento onde se encontrou uma maior diversidade de fungos: 27 fungos morfologicamente distintos no Serviço de Cirurgia, 26 no Bloco Operatório e 19 na Unidade de Neonatologia. Foi a partir das amostras de ar do Bloco Operatório onde se isolou maior número de fungos diferentes (13), bem como a partir das superfícies da Cirurgia (20) e Neonatologia (13).

Nas Unidades do Hospital de Dia não se observou uma diversidade tão acentuada de morfotipos fúngicos o que pode corresponder à existência de contaminações ambientais por um pequeno número de variedades de espécies fúngicas. No entanto, na Unidade de Oncologia, apesar de se ter detetado uma diversidade muito baixa de morfotipos fúngicos (tabela 3.2), observou-se uma prevalência acentuada de unidades formadoras de colónias (tabela 3.1). Podemos estar, deste modo, na presença de uma grande concentração de propágulos fúngicos das mesmas espécies nas mesmas instalações hospitalares, pondo em risco a saúde dos pacientes que a frequentam, muito principalmente se forem imunocomprometidos.

3.2 Fungos encontrados nos diferentes locais de colheita da amostra

A identificação dos fungos filamentosos isolados neste estudo foi efetuada, numa primeira fase, até ao género, utilizando métodos macro e microscópicos convencionais, com o auxílio de atlas de identificação de Hoog *et al.* (2000) e Lacaz *et al.* (2002). Numa segunda fase foi realizada através da análise das sequências moleculares dos fungos mais prevalentes e com maior importância médica. A identificação das leveduras foi feita bioquimicamente por API, a partir dos perfis de assimilação de diferentes compostos.

Dos 104 morfotipos fúngicos isolados em culturas puras, foram identificados somente 97 morfotipos, tendo sido 94 fungos filamentosos e 3 fungos leveduriformes. Esta diferença, de 7 fungos entre os fungos isolados e os identificados, deve-se ao facto de alguns dos isolados se terem contaminado por outras espécies fúngicas de crescimento mais exuberante ou mesmo por ausência de crescimento nas subculturas. Relativamente aos 97 morfotipos isolados, baseado nas suas características morfológicas, foi possível identificar, apenas 17 géneros diferentes, provenientes das várias origens ambientais realçando que, em cada colheita, a ocorrência de cada género variou bastante (ver Anexo II).

Pela análise do gráfico da figura 3.1 verifica-se que o género *Penicillium* foi identificado com maior frequência (35), seguido dos géneros *Aspergillus* (20) e *Cladosporium* (15), ao contrário dos géneros *Rhodotorula*, *Verticillium*, *Geotrichum*, *Mucor* e *Chaetomium* em que foi unicamente feito um isolamento de cada um no conjunto total das colheitas realizadas.

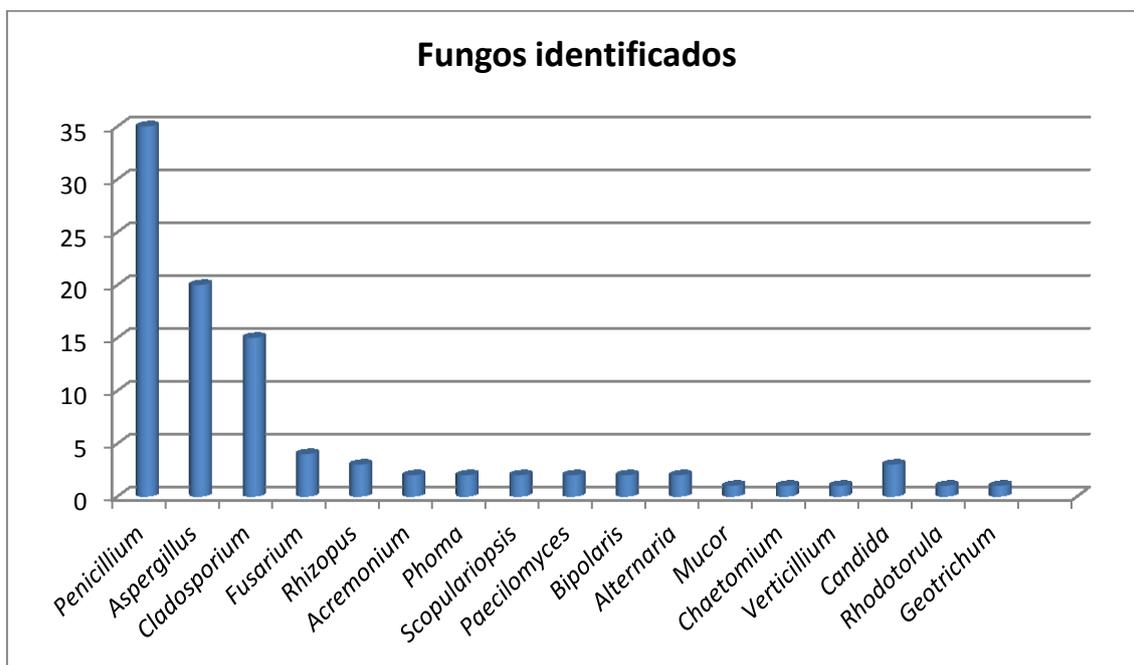


Figura 3.1 Prevalência dos géneros dos fungos identificados com base nas características morfológicas macroscópicas e microscópicas das suas colónias.

Os trabalhos realizados por Kim & Kim (2007) e Faure *et al.* (2002) referem-nos resultados semelhantes em estudos realizados em hospitais durante obras de renovação

dos mesmos. Estes autores encontraram igualmente maior prevalência do género *Penicillium*, *Aspergillus*, e *Cladosporium* seguido de outras espécies fúngicas menos frequentes. Segundo Gniadek & Macura (2007) as espécies dos géneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium*, bem como os fungos leveduriformes como *Rhodotorula rubra* e *Candida* sp., podem ser frequentemente isolados a partir de amostras de ar e superfícies no interior de unidades hospitalares com internamento.

Como a identificação até ao nível da espécie de muitos fungos filamentosos é mais difícil se for unicamente baseada em critérios morfológicos das colónias, foi adotada uma metodologia molecular que, com elevada sensibilidade e especificidade, nos permitisse saber a que espécies pertenciam alguns dos isolados. Deste modo, foram selecionados para identificação molecular, algumas estirpes dos géneros mais abundantes e potencialmente infecciosas para os pacientes imunologicamente debilitados que frequentam a instituição hospitalar do nosso estudo.

Para tal, para esses isolados selecionados, foi amplificada por PCR e sequenciada a região ITS do DNA ribossómico (rDNA) a qual, após alinhamento com sequências depositadas em bases de dados públicas (PubMed), permitiu a identificação dos nossos isolados. Todavia, com alguns isolados, a identificação molecular obtida não foi suficientemente clara para permitir a identificação da espécie porque nos foram dadas várias hipóteses finais de identificação a partir das sequências obtidas. Deste modo foi necessário voltar a observar a cultura macroscópica e microscopicamente e, com base em informações recolhidas de várias fontes e registos (livros, atlas, fotografias na internet) foi finalmente possível selecionar a espécie mais idêntica à nossa amostra.

Em seguida serão apresentados e discutidos o número de isolados de cada género fúngico encontrados a partir das diferentes fontes ambientais em cada unidade hospitalar estudada, identificados tanto por métodos convencionais, como alguns isolados, pelo método molecular.

3.2.1 Fungos encontrados no Bloco Operatório

No bloco operatório foram isolados 26 fungos com colónias morfológicamente distintas, tendo sido isolados 13 a partir do ar, 9 das superfícies e 4 da água. Destes isolados foram identificados 13 *Penicillium* sp., 5 *Aspergillus* sp., 5 *Cladosporium* sp., 1 *Acremonium* sp. e 1 *Phoma* sp. (tabela 3.3). Um dos morfotipos inicialmente

observados a partir de uma amostra de água não chegou a ser identificado porque não se desenvolveu nas culturas seguintes.

Tabela 3.3 Ocorrência das espécies fúngicas isoladas a partir das amostras de ar, água e superfícies do Bloco Operatório

Gêneros	Ar	Água	Superfícies
<i>Penicillium</i> sp.	4*	1	8*
<i>Aspergillus</i> sp.	4*	0	1*
<i>Cladosporium</i> sp.	4*	1	0
<i>Acremonium</i> sp.	0	1	0
<i>Phoma</i> sp.	1	0	0
Total	13	3	9

* Inclui estirpes identificadas por sequenciação

Pela observação da tabela 3.3 verificou-se existir uma maior ocorrência de fungos no ar do bloco operatório, pertencentes a quatro gêneros diferentes.

O gênero predominante foi *Penicillium*, que se encontrava presente em todas as amostras. Três destas estirpes de *Penicillium* sp. foram selecionadas para identificação molecular, uma obtida a partir do ar, e duas a partir de superfícies, de onde resultou a identificação de um *P. brevicompactum* a partir da amostra de ar, e dois *P. chrysogenum* das amostras de superfícies.

Também foram identificados molecularmente quatro estirpes de *Aspergillus* sp. e uma estirpe de *Cladosporium* sp. Os isolados de *Aspergillus* sp., foram obtidos três a partir das amostras do ar e uma de uma superfície. Das amostras do ar foram isoladas duas colônias de *A. versicolor* e uma de *A. nidulans*. A partir da superfície foi isolado *A. niger*.

A estirpe de *Cladosporium* sp. obtida a partir do ar resultou na identificação de um *C. cladosporioides*.

3.2.2 Fungos encontrados no serviço de internamento Cirúrgico e Queimadura

Nos serviços de internamento Cirúrgico e Queimadura foram isolados 27 fungos filamentosos com colónias morfologicamente diferentes, tendo sido 18 isoladas a partir de superfícies, 2 do ar e 2 da água. Destes isolados foram identificados 4 *Penicillium* sp., 7 *Aspergillus* sp., 3 *Cladosporium* sp., 1 *Acremonium* sp., 2 *Fusarium* sp., 2 *Candida* sp., 1 *Bipolaris* sp., 1 *Mucor* sp. e 1 *Rhodotorula* sp. (tabela 3.4).

Tabela 3.4 Distribuição dos fungos isolados a partir das amostras de ar, água e superfícies do serviço de internamento Cirúrgico e Queimadura.

Géneros	Ar	Água	Superfícies
<i>Penicillium</i> sp.	1	0	3
<i>Aspergillus</i> sp.	1*	0	6*
<i>Cladosporium</i> sp.	0	1	2
<i>Acremonium</i> sp.	0	1	0
<i>Fusarium</i> sp.	0	0	2*
<i>Bipolaris</i> sp.	0	0	1
<i>Mucor</i> sp.	0	0	1
<i>Candida</i> sp.	0	0	2 [#]
<i>Rhodotorula</i> sp.	0	0	1 [#]
Total	2	2	18

* Inclui estirpes identificadas por sequenciação

[#] Inclui estirpes identificadas por método bioquímico (API)

Cinco dos fungos inicialmente isolados não chegaram a ser identificados porque não se desenvolveram nas subculturas.

Analisando a tabela 3.4 verifica-se que foram identificados 9 géneros de fungos e a maior ocorrência foi encontrada nas amostras de superfícies. Dos géneros que foram identificados, o género *Aspergillus* foi o encontrado em maior numero.

Alguns dos géneros identificados nestes serviços foram submetidos à identificação molecular, tendo sido identificado seis *Aspergillus* sp. nas amostras de ar e superfícies e um *Fusarium equiseti* a partir de uma superfície.

Cinco das estirpes de *Aspergillus* sp. isoladas foram obtidas a partir de superfícies e uma a partir do ar, de onde resultou na identificação de um *A. tubingensis*, *A. niger*, *A. wentii*, *A. nidulans* e *A. flavus* nas amostras de superfícies, e um *Aspergillus* sp. na

amostra de ar.

As leveduras encontradas nestes serviços foram identificadas por métodos bioquímicos (API ID32C[®], Biomerieux), tendo sido identificados dois isolados de *Candida parapsilosis* e um de *Rhodotorula* sp.

3.2.3 Fungos encontrados no serviço de internamento de Neonatologia

De entre os 19 isolados fúngicos obtidos a partir das amostras dos serviços de internamento de Neonatologia foram identificados 17 colónias fúngicas morfológicamente diferentes, tendo sido 12 isoladas a partir das superfícies, 3 da água e 2 do ar. Destes isolados foram identificados 5 *Cladosporium* sp., 4 *Aspergillus* sp., 2 *Alternaria* sp., 1 *Penicillium* sp., 1 *Geotrichum* sp., 1 *Scopulariopsis* sp., 1 *Bipolaris* sp., 1 *Paecilomyces* sp. e 1 *Chaetomium* sp. (tabela 3.5).

Tabela 3.5 Distribuição das diferentes espécies de fungos isolados a partir das amostras de ar, água e superfícies do serviço de internamento de Neonatologia.

Géneros	Ar	Água	Superfícies
<i>Penicillium</i> sp.	0	1	0
<i>Aspergillus</i> sp.	0	0	4*
<i>Cladosporium</i> sp.	2*	1	2
<i>Geotrichum</i> sp.	0	1*	0
<i>Scopulariopsis</i> sp.	0	0	1
<i>Bipolaris</i> sp.	0	0	1*
<i>Alternaria</i> sp.	0	0	2
<i>Paecilomyces</i> sp.	0	0	1
<i>Chaetomium</i> sp.	0	0	1
Total	2	3	12

* Inclui estirpes identificadas por sequenciação

Observando a tabela 3.5 verifica-se que os isolados das superfícies apresentam maior diversidade de géneros em relação às amostras de ar e água. Dos isolados identificados foram selecionadas algumas das amostras para a identificação molecular. Quatro isolados de *Aspergillus* sp. obtidos a partir de superfícies, foram identificados como sendo *A. nidulans*, *A. ochraceus*, *A. flavus* e *A. tamarii*. Também foi identificado pelo

método molecular a espécie *Cladosporium sphaerospermum* a partir do ar e um *Galactomyces geotrichum* a partir de uma amostra de água.

3.2.4 Fungos encontrados no serviço de internamento de Infeciologia

Nos serviços de internamento de infeciologia foram isolados 11 fungos em culturas puras, tendo sido 3 isolados a partir do ar, 3 da superfície e 5 da água. Destes, foram identificados 7 isolados de *Penicillium* sp., 1 de *Cladosporium* sp., 1 de *Candida* sp. e 1 de *Paecilomyces* sp. (tabela 3.6).

Tabela 3.6 Distribuição dos fungos isolados a partir das amostras de ar, água e superfícies do serviço de internamento de Infeciologia.

Géneros	Ar	Água	Superfícies
<i>Penicillium</i> sp.	2*	2*	3
<i>Cladosporium</i> sp.	1	0	0
<i>Paecilomyces</i> sp.	0	1	0
<i>Candida</i> sp.	0	1*	0
Total	3	4	3

* Inclui estirpes identificadas por sequenciação

Pela observação da tabela 3.6 verifica-se que houve pouca ocorrência de fungos neste serviço hospitalar. O género mais predominante foi *Penicillium* sp., que estava presente em todas as amostras. Para além destas, foi identificado um isolado de *Candida stellimalicola* obtida a partir de uma amostra de água.

Três destas estirpes de *Penicillium* sp. foram seleccionadas para identificação molecular. Duas foram obtidas a partir do ar e uma a partir da água, de onde resultou a identificação de dois *P. crustosum* e um *P. chrysogenum*.

3.2.5 Fungos encontrados no serviço de Oncologia

Nos serviços de oncologia foram isolados 11 fungos, tendo sido 4 isolados do ar, 4 da água e 3 da superfície. Destes isolados foram identificados 6 *Penicillium* sp., 1 *Aspergillus* sp., 1 *Fusarium* sp., 1 *Rhizopus* sp., e 1 *Verticillium* sp., (tabela 3.7).

Tabela 3.7 Distribuição dos fungos isolados a partir das amostras de ar, água e superfícies do serviço de internamento de Oncologia.

Gêneros	Ar	Água	Superfícies
<i>Penicillium</i> sp.	4	0	2
<i>Fusarium</i> sp.	0	1*	0
<i>Rhizopus</i> sp.	0	1*	0
<i>Aspergillus</i> sp.	0	1*	0
<i>Verticillium</i> sp.	0	1	0
Total	4	4	2

* Inclui estirpes identificadas por sequenciação

Pela análise da tabela 3.7 verifica-se que o género *Penicillium* apresentou igualmente uma maior ocorrência neste serviço hospitalar.

Alguns dos géneros identificados nestes serviços foram submetidos a identificação molecular, tendo sido identificado um isolado de *Rhizopus oryzae*, um de *Aspergillus niger*, e um de *Fusarium* cf. *solani* a partir de uma amostra de água.

3.2.6 Fungos encontrados no serviço de Hemodiálise

Nos serviços de Hemodiálise foram isolados 10 colónias de fungos morfologicamente diferentes, tendo sido três isoladas a partir de amostras do ar, uma da água e seis das superfícies. Destes isolados foram identificados 3 isolados de *Penicillium* sp., 4 de *Aspergillus* sp., 1 de *Cladosporium* sp., 1 de *Phoma* sp., e 1 de *Scopulariopsis* sp., (tabela 3.8).

Pela observação da tabela 3.8 verificou-se uma maior ocorrência de fungos nas superfícies com a presença de quatro géneros diferentes.

Dos géneros identificados, *Aspergillus* sp. foi encontrado em maior número. Estes isolados foram submetidos à identificação molecular, tendo sido identificado na amostra de superfície um isolado de *A. flavus*, um de *A. nidulans* e um de *A. versicolor* e a partir de uma amostra do ar, um isolado de *A. versicolor*.

Tabela 3.8 Distribuição dos fungos isolados a partir das amostras de ar, água e superfícies do serviço de Hemodiálise.

Géneros	Ar	Água	Superfícies
<i>Penicillium</i> sp.	1	1	1
<i>Aspergillus</i> sp.	1*	0	3*
<i>Cladosporium</i> sp.	0	0	1
<i>Phoma</i> sp.	0	0	1
<i>Scopulariopsis</i> sp.	1	0	0
Total	3	1	6

* Inclui estirpes identificadas por sequenciação

3.3 Correlação entre os géneros fúngicos isolados nos diferentes Serviços do Hospital

Em todos os serviços estudados do Hospital Agostinho Neto foram isolados fungos a partir das três fontes ambientais, ar, água e superfícies.

Comparando a ocorrência de géneros fúngicos identificados a partir das colheitas realizadas nos diferentes serviços (Figura 3.2), verifica-se que a maior variedade de géneros foi encontrada nos serviços de Internamento Cirúrgico e Queimadura (13) e de Neonatologia (13), seguindo-se no Bloco Operatório (9) e na Unidade de Hemodiálise (8). Foi no serviço de Oncologia e no serviço de Hematologia onde se encontrou uma menor variedade de géneros fúngicos.

Foi igualmente a partir das superfícies dos serviços de Internamento Cirúrgico e Queimadura (9) e de Neonatologia (9) que se isolou uma maior variedade de géneros fúngicos, comparando com as restantes Unidades.

A partir das amostras de ar, foi no Bloco Operatório onde se detectaram mais espécies fúngicas diferentes, potencialmente patogénicos oportunistas.

Apesar da água canalizada ser comum a todos os serviços, houve muita variação na diversidade e número de espécies fúngicas isoladas em cada serviço. Este facto pode estar relacionado com a formação de biofilmes na canalização ou nas próprias torneiras de cada serviço, após contaminação ambiental. É de realçar que, enquanto no Bloco Operatório e no Serviço de Hemodiálise foi isolada uma pequena percentagem de

fungos, na água do Internamento Cirúrgico e Queimadura, e de Oncologia, foi isolado um elevado número de fungos.

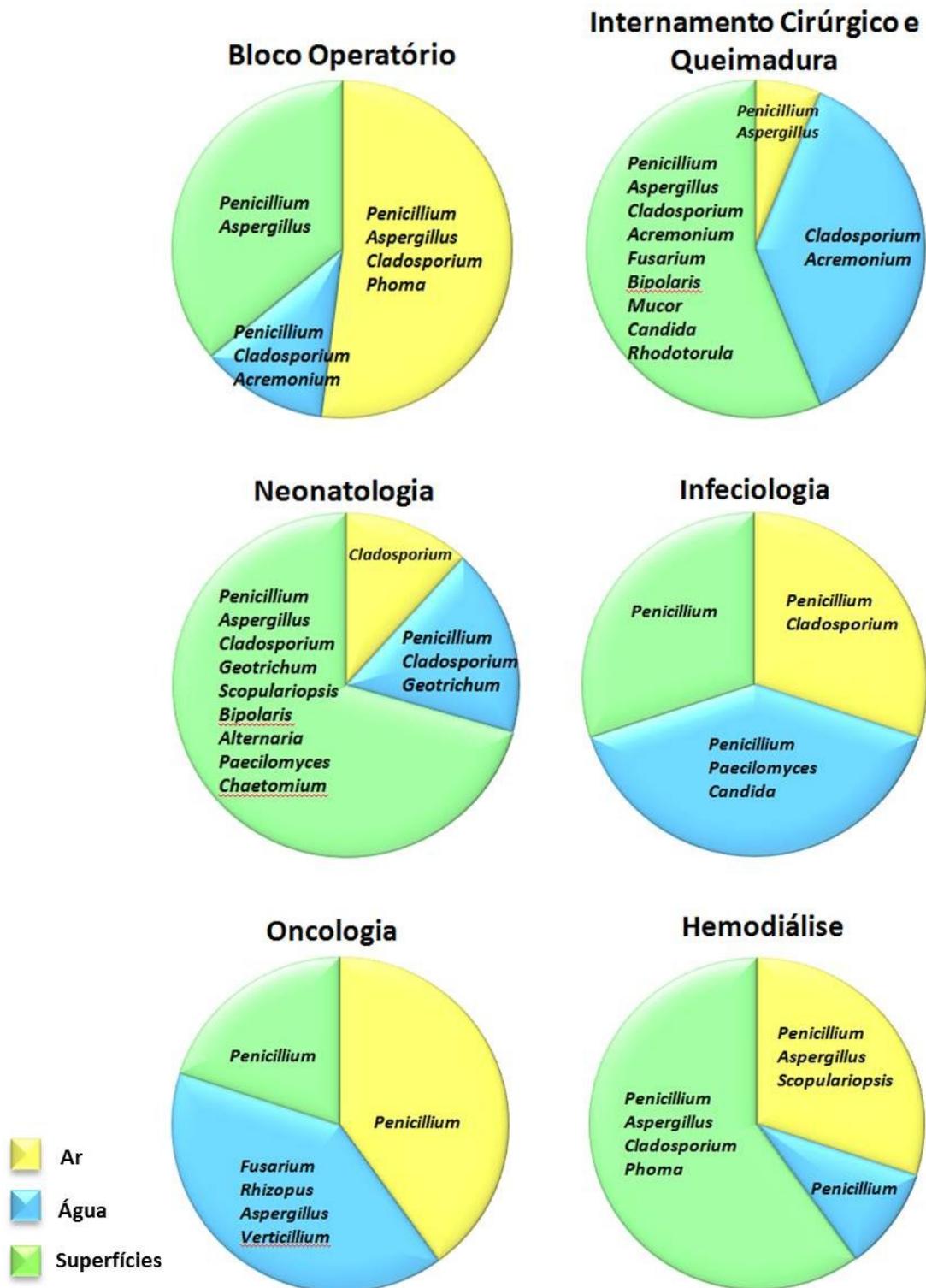


Figura 3.2 Ocorrência dos géneros fúngicos nos serviços estudados, no Hospital Agostinho Neto na cidade da Praia em Cabo Verde, isolados a partir de amostras do ar (amarelo), água (azul) e de superfícies (verde).

Por último é de notar que o género *Aspergillus* foi encontrado nos diferentes locais em praticamente todos os serviços, pelo que fica realçada a importância de melhorar as condições de higiene e assepsia, na medida em que as espécies deste género podem atuar como patogénicos oportunistas, causando desde reacções alérgicas até sérias infeções invasivas. Consequentemente, considerou-se necessário proceder à identificação molecular das espécies a que pertenciam os isolados de *Aspergillus* sp., através do estudo das sequências da região ITS do rDNA.

3.4 Espécies de maior importância médica e com maior prevalência

Segundo a análise dos resultados anteriormente apresentados, os géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, e *Cladosporium* foram encontrados em maior frequência e praticamente em todos os locais estudados e em elevada percentagem das amostras e sabe-se que em algumas circunstâncias, podem ser patogénicos para determinados grupo de pacientes hospitalizados.

Os fungos do género *Cladosporium* sp., geralmente considerados inofensivos para a saúde, podem causar micoses subcutâneas em alguns pacientes debilitados quando inoculados diretamente no organismo, através da introdução de uma sonda, de um cateter ou durante um corte cirúrgico. Outros fungos igualmente comuns, como as espécies de *Penicillium* sp., que são muito abundantes na natureza, também podem causar infeções oportunistas (penicilioses) em pacientes com doenças pulmonares, como bronquite por exemplo (Kwon-Chung & Bennett 1992). Ainda, as espécies do género *Aspergillus*, que são ubíquas na natureza, têm sido apontadas por vários autores como sendo uma importante causa de morte por infeções oportunistas em diferentes grupos de pacientes imunocomprometidos.

Até há poucos anos, *A. fumigatus* era a espécie deste género considerada mais patogénica mas, nestas últimas décadas, com o aumento do número de casos de debilidade imunológica e de outros fatores de risco, como neoplasias, neutropenia acentuada, corticoterapia, têm ocorrido cada vez mais frequentemente infeções invasivas por outras espécies de *Aspergillus*, como por exemplo por *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. versicolor*, etc. (Barnes & Marr, 2006).

No presente estudo também encontrámos um leque variado destas espécies, presentes praticamente em todas as unidades do hospital em estudo (Tabela 3.9).

Tabela 3.9 Identificação molecular espécies de *Aspergillus* isoladas nos diferentes serviços do hospital Agostinho Neto, da cidade da Praia, em Cabo Verde.

		Ar	Água	Superfícies
Serviços com Internamento	Bloco operatório	2- <i>A. versicolor</i> (> seq1)* 1- <i>A. unguis</i> (> seq 2)*	-----	1- <i>A. niger</i> (> seq 3)*
	Cirurgia	1- <i>Aspergillus</i> sp.	-----	1- <i>A. tubingensi</i> (> seq 4)* 1- <i>A. niger</i> (> seq 5)* 1- <i>A. wentii</i> (> seq 6)* 1- <i>A. nidulans</i> (> seq 7)* 1- <i>A. flavus</i> (> seq 8)*
	Neonatologia	-----	-----	1- <i>A. nidulans</i> (> seq 9)* 1- <i>A. westerdijkiae</i> (>seq 10)* 1- <i>A. flavus</i> (> seq 11)* 1- <i>A. tamarii</i> (> seq 12)*
	Infeciologia	-----	-----	-----
Hospital de Dia	Unidade de Oncologia	-----	1- <i>Aspergillus</i> sp.	-----
	Unidade de Hemodiálise	1- <i>A. versicolor</i> (>seq 13)*	-----	1- <i>A. flavus</i> (> seq 14)* 1- <i>A. nidulans</i> (> seq 15)* 1- <i>Aspergillus</i> sp.

(> seq)* sequências disponíveis no Anexo III.

Observando a tabela 3.9 verificamos que as superfícies foram as fontes a partir das quais se isolou maior número de estirpes de *Aspergillus* sp., tendo sido as superfícies do serviço de Cirurgia as que apresentaram o maior número de ocorrência destas espécies. Em alguns dos isolados não foi possível fazer a identificação até à espécie, uma vez que o resultado da sequenciação da região ITS do rDNA apresentou uma homologia de 99 ou 100% com mais do que uma espécie quando comparadas com as sequências depositadas na base de dados NCBI. Seria necessário realizar outras abordagens moleculares para a identificação acurada destas espécies, nomeadamente a técnica *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) em que, estudando diferenças nucleotídicas em vários genes, seria muito vantajosa nestes casos. No entanto, ainda foram identificados cerca de nove espécies diferentes do género *Aspergillus* a partir das colheitas realizadas neste

hospital: *A. versicolor*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. tubingensis*, *A. wentii*, *A. westerdijkiae*, *A. unguis* e *A. tamarii* (figura 3.2).

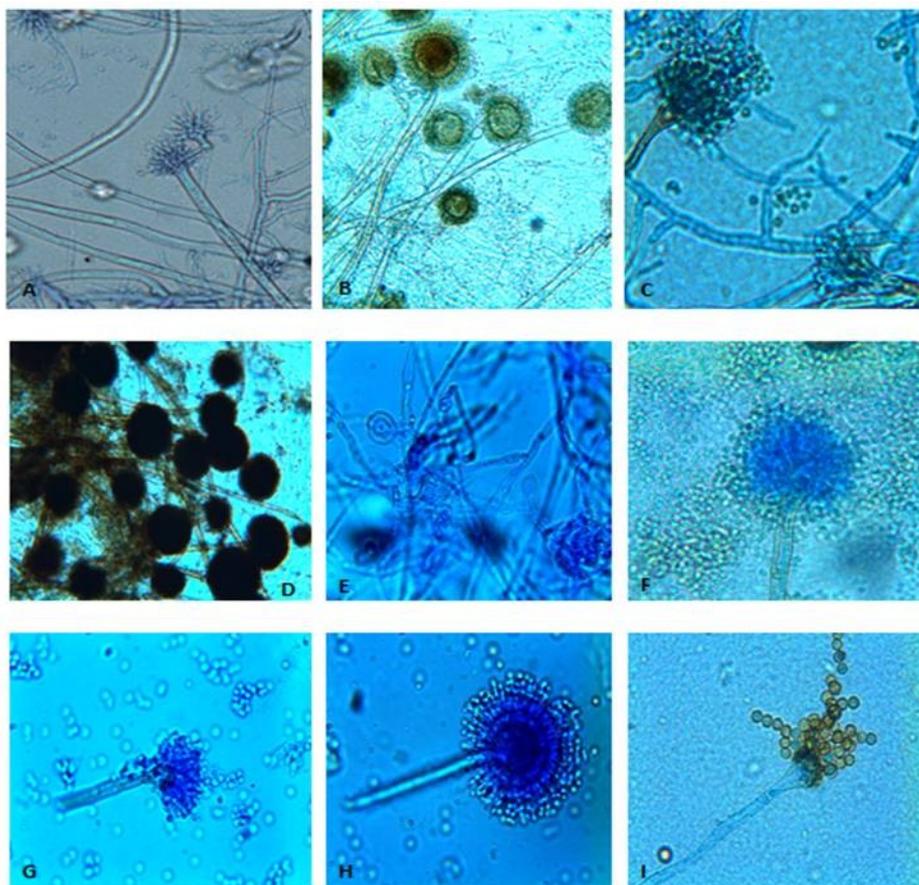


Figura 3.3 Observação microscópica das diferentes espécies de *Aspergillus* identificadas neste estudo. (A) *A. versicolor*; (B) *A. wentii*; (C) *A. unguis*; (D) *A. tubingensis*; (E) *A. niger*; (F) *A. westerdijkiae*; (G) *A. nidulans*; (H) *A. flavus* e (I) *A. tamarii*.

Segundo Denning (1998), algumas destas espécies de *Aspergillus* como *A. flavus*, *A. niger*, e *A. nidulans* eram classicamente mais responsáveis por infecções invasivas em pacientes imunocomprometidos, enquanto outras espécies como *A. versicolor*, *A. wentii*, *A. unguis*, *A. tubingensis*, *A. niger*, *A. westerdijkiae* e *A. tamarii* raramente causavam doença. No entanto, mais recentemente, tem sido descrito que um número cada vez maior de espécies de *Aspergillus*, se têm revelado não só patogênicas para os seres humanos como também se tem constatado serem mais resistentes aos fármacos antifúngicos (Iwen *et al.* 1998, Smith & Kauffman 2012).

Capítulo IV: Considerações finais e Recomendações

A contaminação do ambiente hospitalar é um dos principais fatores para o aparecimento das infeções oportunistas em pacientes internados e com sistema imunitário comprometido. Estas infeções podem ser responsáveis por uma elevada taxa de morbilidade e mortalidade destes pacientes e uma prolongada permanência no hospital.

A melhoria qualitativa do ambiente microbiológico hospitalar pode ser um fator determinante para o bem-estar e sobrevivência dos pacientes que possuam debilidade do sistema imunitário. Segundo Sautour *et al.*, (2009) a qualidade microbiológica do ambiente hospitalar depende de inúmeros fatores, desde a qualidade do ar e água circulante no ambiente hospitalar, ocorrência de obras de renovação no hospital ou nas proximidades e o cumprimento das normas internas de higiene e segurança por profissionais da saúde.

O hospital em estudo tem sido, ao longo destes últimos anos, alvo de avultadas obras de manutenção e expansão como resposta ao aumento da necessidade de prestação de serviços de saúde, tão necessárias ao prolongamento da sua vida útil e à ampliação das suas valências. No entanto, tem sido numerosas vezes relatado que a realização de obras em instituições hospitalares é responsável pelo aumento significativo das infeções hospitalares em doentes imunologicamente fragilizados, tanto durante como após as obras, pois estas fomentam a disseminação de microrganismos, incluindo fungos (Joseph 2006). Sendo assim, considera-se necessário proceder-se a uma avaliação regular da presença de fungos no ambiente interno das instituições hospitalares que possuam serviços com doentes de risco para infeções fúngicas oportunistas, a fim de se poderem adotar as medidas profiláticas adequadas que conduzam a uma diminuição do número de casos de infeções nosocomiais.

No presente estudo foi feita a avaliação epidemiológica dos fungos presentes no ar, água e superfícies no interior de alguns serviços do Hospital Agostinho Neto, na cidade da Praia, ilha de Santiago, Cabo Verde. Em todas as amostras recolhidas para o estudo verificou-se a existência de fungos, sendo que em algumas placas de petri não foi possível a sua identificação devido ao rápido crescimento de outras colónias de fungos que se sobrepuseram àquelas, impedindo o seu isolamento. As amostras de superfícies foram as que apresentaram maior número de colónias fúngicas (2696 ufc/m²), seguidas

das provenientes da água (685 ufc/m³) e por fim, em menor quantidade, do ar (393 ufc/m³). No entanto perante esses resultados positivos podemos justificar a hipótese de que tanto a água, o ar como as superfícies inanimadas existentes no interior do hospital Agostinho Neto, podem desempenhar um papel importante como fatores de risco para a transmissão de fungos responsáveis por infecções invasivas oportunistas.

Por exemplo, alguns fungos como as espécies do género *Aspergillus*, que podem ser infecciosas e letais para pacientes muito debilitados, foram encontradas, tanto nas amostras do ar, da água como das superfícies, alertando para a necessidade de uma maior atenção sobre a segurança e o bem-estar dos doentes que utilizam o hospital.

Deste modo, no final deste trabalho pretendemos deixar algumas sugestões ou recomendações gerais no sentido de poder vir a minimizar os fatores de risco de contaminações fúngicas associados ao ar, à água e às superfícies:

- Implementação de um sistema de controlo e melhoramento da qualidade do ar interno circulante nas unidades mais críticas do hospital;
- Um maior controle da qualidade microbiológica da água canalizada;
- Uma maior atenção para com a limpeza e desinfeção das superfícies inanimadas (incluído superfícies das bandejas dos aparelhos de ar condicionado, para além das mesas-de-cabeceira, cabeceiras das cama, portas, janelas e bancadas);
- Aumento da vigilância epidemiológica das unidades do hospital frequentadas por pacientes em estado mais crítico ou debilitados imunologicamente, tais como Bloco Operatório e Serviços de Infeciologia e Neonatologia;
- Sensibilização dos profissionais de saúde para os cuidados a ter com a contaminação indireta dos pacientes através de mãos e utensílios contaminados e sobre a exposição dos pacientes a contaminantes ambientais pela abertura das janelas para arejamento das alas.

Como perspetivas futuras seria importante dar continuidade a este estudo alargando essas medidas de sensibilização e medidas preventivas a outros hospitais com serviços de cuidados especiais e internamento de pacientes imunologicamente debilitados. Também seria bom desenvolver um trabalho estatístico sobre a ocorrência de infecções fúngicas nosocomiais não só no hospital Agostinho Neto, como em outros hospitais, e relacioná-las com os fatores de riscos apresentados neste estudo.

Referências Bibliográficas

- Alberti, C., Bouakline, A., Ribaud, P., Lacroix, C., Rousselot, P., Leblanc, T., & Derouin, F. (2001). Relationship between environmental fungal contamination and the incidence of invasive aspergillosis in haematology patients. *Journal of Hospital Infection*, **48** (3): 198–206.
- Alexopoulos, C., Mims, C., & Blackwell, M. (1996). *Introductory Mycology* (4th Edition ed.). New York: John Wiley & Sons.
- Anaissie, E. J., Stratton, S. L., Dignani, M. C., Lee, C.-k., Summerbell, R. C., & Rex, J. H. (2003). Pathogenic molds (including *Aspergillus* species) in hospital water distribution systems: a 3-year prospective study and clinical implications for patients with hematologic malignancies. *Blood*, **101**: 2542-2546.
- Ascioglu, S., Rex, J. H., Pauw, B. d., Bennett, J. E., Bille, J., Crokaert, F., Denning DW, Donnelly JP, Edwards JE, Erjavec Z, Fiere D, Lortholary O, Maertens J, Meis JF, Patterson TF, Ritter J, Selleslag D, Shah PM, Stevens DA, Walsh TJ; Invasive Fungal Infections Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer; Mycoses Study Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (2002). Defining Opportunistic Invasive Fungal Infections in Immunocompromised Patients with Cancer and Hematopoietic Stem Cell Transplants: An International Consensus. *Clinical Infectious Diseases*, **34**: 7-14.
- Bahtti, Z., Shaukat, A., Almyroudis, N. G., & Segal, B. H. (2006). Review of epidemiology, diagnosis, and treatment of invasive mould infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Mycopathologia*, **162**(1): 1-15.
- Baldwin, B. G., Sanderson, M. J., Porter, J. M., Wojciechowski, M. F., Campbell, C. S., & Donoghue, M. J. (1995). The ITS region of Nuclear Ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **82**(2): 247-277.
- Barbedo, L. S., & Sgarbi, D. B. (2010). Candidíase. *J. Bras Doenças Sex Transm*, **22**(1): 22-38.
- Barnes, M. P., & Marr, M. D. (2006). Aspergillosis: Spectrum of Disease, Diagnosis, and Treatment. *Infect Dis Clin N Am*, **20**(3): 545–561.
- Bôas, P. J., & Ruiz, T. (2004). Occurrence of hospital infection among inpatients in a university hospital. *Rev Saude Publica*, **38** (3): 372-378.
- Cornet, M., Levy, V., Fleury, L., Lortholary, J., Barquins, S., Coureul, M.-H., Deliere E, Zittoun R, Brücker G, Bouvet A. (1999). Efficacy of prevention by high-efficiency particulate air filtration or laminar airflow against aspergillus airborne contamination during hospital renovation. *Infect Control Hosp Epidemiol*, **20**(7): 508-513.
- Deacon, J. (1984). *Introduction to Modern Mycology*. Boston: Blackwell Scientific Pub.
- Denning, D. W. (1998). Invasive Aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*, **26**:781–805.
- Faure, O., Fricker-Hidalgo, H., Lebeau, B., Mallarety, M. R., Ambroise-Thomas, P., & Grillot, R. (2002). Eight-year surveillance of environmental fungal contamination in hospital operating rooms and haematological units. *Journal of Hospital Infection*, **50**(2): 155-

- Gniadek, A., & Macura, A. (2007). Intensive care unit environment contamination with fungi. *Advances in Medical Sciences*, **52**: 283-287.
- Guarro, J., Gené, J., & Stchigel, A. M. (1999). Developments in Fungal Taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*, **12**: 454-500.
- Harbarth, S., Sax, H., & Gastmeier, P. (2003). The preventable proportion of nosocomial infections: an overview of published reports. *Journal of Hospital Infection*, **54**, 258-266.
- Hawksworth, D. L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, **105**: 1422-1432.
- Hedayati, M., Mayahi, S., Movahedi, M., & Shokohi, T. (2011). Study on fungal flora of tap water as a potential reservoir of fungi in hospitals in Sari city, Iran. *Journal de Mycologie Médicale*, **21**: 10-14.
- Hinrichsen, S. L., Falcão, É., Vilella, T. A., Colombo, A. L., Nucci, M., Moura, L., Rêgo, L., Lira, C., Almeida, L. (2008). Candidemia em hospital terciário do nordeste do Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **41**(4): 394-398.
- Hoog, G. d., Guarro, J., Gené, J., & Figueras, M. (2000). *Atlas of Clinical Fungi*. 2 ed. Netherlands /Universitat Rovira Virgili. Contralbureau voor Schimmelcultures. Neetherlands
- Instituto Nacional de Estatística, C.2. (2010). IV Recenseamento geral da população e da habitação - 2010. Cidade da Praia - Cabo Verde.
- Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (2002, Maio). Prevenção de infecções Adquiridas no hospital. Retrieved Maio 20, 2011, from World Health Organization 2002: http://www.opas.org.br/gentequefazsaude/bvsde/bvsacd/cd49/man_oms.pdf
- Iwen P. C., Rupp M. E., Bishop M. R., Rinaldi M. G., Sutton D. A., Tarantolo S., and Hinrichs S.H. (1998). Disseminated Aspergillosis Caused by *Aspergillus ustus* in a Patient Following Allogeneic Peripheral Stem Cell Transplantation. *J. Clin. Microbiol.* **36**(12): 3713-3717.
- Joseph, A. (2006). *The Impact of the Environment on Infections in Healthcare Facilities*. Retrieved from The Center for Health Design: www.healthdesign.org
- Kim, K., & Kim, C. (2007). Airborne microbiological characteristics in public buildings of Korea. Building and Environment. *Building and Environment*, **42**: 2188-2196 .
- Krueger, K.P., Nelson, A.C. 2009 Economic considerations in the treatment of invasive aspergillosis: a review of voriconazole pharmacoeconomic studies. *Clinico Economics and Outcomes Research*. **1**: 35 - 43.
- Kwon-Chung, K. J., & Bennett, J. E. (1992). *Medical Mycology*. Philadelphia, ed. Lea & Febiger, London.
- Lacaz, C. S. (1977). *Micologia Médica*. Ed. Sarvier, São Paulo.
- Lacaz, C. S., Porto, E., Martins, J., Heins-Vaccari, E., & Melo, N. (2002). *Tratado de Micologia Médica* (9ª ed.). Ed. Sarvier, São Paulo.

- Latgé, J. P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, **12**: 310–350.
- Low, C. Y., & Rotstein, C. (2011). Emerging fungal infections in immunocompromised patients. *F1000 Medicine Reports*, **3**: 1-8.
- Maertens, J., Groll, A. H., Cordonnier, C., Cámara, R. d., Roilides, E., & Marchetti, O. (2011). Treatment and timing in invasive mould disease. *J Antimicrob Chemother*, **66**: 37–43.
- Marchetti, O., Bille, J., Fluckiger, U., Eggimann, P., Ruef, C., Garbino, J., Calandra T, Glauser MP, Täuber MG, Pittet, D. (2004). Epidemiology of candidemia in Swiss Tertiary Care Hospitals: Secular Trends, 1991–2000. *Clinical Infectious Diseases*, **38**(3): 311–320.
- McFee, R. B. (2009). Nosocomial or hospital-acquired infections: an overview. *Disease-a-Month*, **5**(7): 422-438.
- Moura, M. E., Ramos, M. N., Sousa, C. M., Silva, A. O., & Alves, M. D. (2008). Hospital infections in the eyes of Portuguese nurses: social representations. *Red. Revistas Científicas da América Latina*, **17**: 743-749.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaüer, M. (2007). *Microbiología Médica*. Ed. Elsevier España, S.A. Madrid, España.
- Norton, S. A. (1994). Deep fungal skin diseases. In: James WD, ed. *Military dermatology*. Textbook of military medicine—Part 3, disease and the environment Washington D.C. *Department of the army*, **18**: 453-492.
- Oliveira, J. C. (1999). *Tópicos de Micologia Médica*. Ed. Control lab. Rio de Janeiro
- Panagopoulou, P., Filioti, J., Petrikosy, G., Giakouppiy, P., Anatoliotakiz, M., Farmaki, E., Kanta, A., Apostolakou, H., Avlami, A., Samonis, G., Roilides, E. (2002). Environmental surveillance of filamentous fungi in three tertiary care hospitals in Greece. *Journal of Hospital Infection*, **52**(3): 185-191.
- Perdelli, F., Cristina, M. L., Sartini, M., Spagnolo, A. M., Dallera, M., Ottria, G., Lombardi, R, Grimaldi, M, Orlando, P. (2006). Fungal Contamination in Hospital Environments. *Infect Control Hosp Epidemiol*, **44**-47.
- Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2004). Rare and Emerging Opportunistic Fungal Pathogens: Concern for Resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology*, **42** (10): 4419-4431.
- Płaza, G. A., Upchurch, R., Brigmon:, R. L., Whitman, W. B., & Ulfig, K. (2004). Rapid DNA extraction for screening soil filamentous fungi using PCR amplification. *Polish Journal of Environmental Studies*, **13** (3): 315-318.
- Rementeria, A., López-Molina, N., Ludwig, A., Vivanco, A., Bikandi, J., Pontón, J., & Garaizar, J. (2005). Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Revista Iberoamericana de Micología*, **22**(1): 1-23.
- Ribeiro, D. C., Bogo, A., Dantas, A. C., Gomes, E. A., Coelho, C. M., & Guidolin, A. F. (2009). Comparison of the PCR-RFLP and ITS-rDNA sequencing technique for phylogenetic analyze of. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, **8**: 43-52.

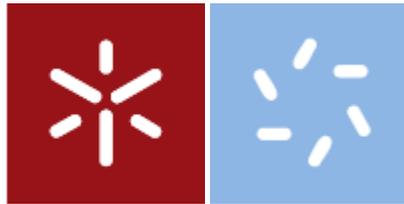
- Richardson, M. D., & Warnock, D. W. (2003). *Fungal infection: Diagnosis and Management*. (3^o ed.). Blackwell Publishing Ltd., UK.
- Richardson, M., & Lass-Flörl, C. (2008). Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clin Microbiol Infect*; **14**: 5–24.
- Sabino, R. (2010). Molecular epidemiology studies of candidiasis in oncological patients and development of new polymorphic microsatellite markers to distinguish candida parapsilosis. Tese de Doutorado em Ciências (área de conhecimento de Biologia). Universidade do Minho. Portugal
- Santos, I. M., Venâncio, A., & Lima, N. (1998). *Fungos contaminantes na indústria alimentar*. Ed. Abel António Bezerra, Braga.
- Ministério da Saúde do Brasil (2000). *Curso básico de controlo de infecção hospitalar*. Retrieved from Agência nacional de vigilância sanitária. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Brasília. <http://www.ccih.med.br/caderno%20a.pdf>
- Sautour, M., Dalle, F., Olivieri, C., L'Ollivier, C., Enderlin, E., Salome, E., Chovelon I, Vagner O, Sixt N, Fricker-Pap V, Aho S, Fontaneau O, Cachia C, Bonnin, A. (2009). A prospective survey of air and surface fungal contamination in a medical Mycology Laboratory at a tertiary care university hospital. *Am J Infect Control*, **37**(3): 189-194.
- Sautour, M., Sixt, N., Dalle, F., L'Ollivier, C., Calinon, C., Fourquenet, V., Thibaut C, Jury H, Lafon I, Aho S, Couillault G, Vagner O, Cuisenier B, Besancenot JP, Caillot D, Bonnin, A. (2007). Prospective survey of indoor fungal contamination in hospital during a period of building construction. *Journal of Hospital Infection*, **67**(4): 367-373.
- Schübler, A., Schwarzott, D., & Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.*, **105**: 1413-1421.
- Sehulster, L. M., Chinn, R. Y., Arduino, M., Carpenter, J., Donlan, R., Ashford, D., Cleveland, J. (2004). Guidelines for Environmental Infection Control in Health-Care Facilities. *American Society for Healthcare Engineering*, **52**: 1- 231.
- Sidrim, J. J., & Rocha, M. F. (2004). *Micologia Médica à luz de autores contemporâneos*. Ed. Guanabara koogan S.A. Rio de Janeiro
- Sixt, N., Dalle, F., Lafon, I., Aho, S., Couillault, G., Valot, S., C. Calinon V., Danaire O. Vagner, B. Cuisenier, M. Sautour, J.P. Besancenot, C. L'Ollivier, D. Caillot, Bonnin, A. (2007). Reduced fungal contamination of the indoor environment with the Plasmair™ system (Air in space). *Journal of Hospital Infection*, **65**: 156-162.
- Smith JA, Kauffman CA. (2012). Pulmonary fungal infections. *Respirology*. **17**(6): 913-926.
- Verde, M. d. (2010). *Relatório estatístico do hospital Agostinho Neto Praia - Cabo Verde*. Praia - Cabo Verde: Ministerio da Saúde de Cabo Verde.
- Weinstein, R. A. (1998). Nosocomial infection update. *Emerging Infectious Diseases*, **4**(3): 416-420.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. INNIS, *PCR protocols: a guide to methods and applications* (pp. 315-322). Academic Press. San Diego, Califórnia.

Anexos

Anexo I Distribuição da mortalidade por Serviços do Hospital Agostinho Neto, cidade da Praia, Ilha de Santiago, Cabo Verde, no ano de 2009.

Serviços	Doentes Internados	Óbitos Internos	Taxa Mortalidade (%)
Cirurgia	1947	32	1,6
Ortotraumatologia	1269	10	0,8
Gineco-Obstetrícia	5793	1	1,7
Internamento de Pediatria	1333	16	1,2
Medicina	898	104	11,6
BUP¹	1296	27	2,1
BUA²	2199	122	5,5
Neonatologia	642	38	5,9
Psiquiatria	50	0	0
Oftalmologia	439	0	0
Total	15.866	350	

¹ BUP - Banco de Urgência da Pediatria, ² BUA - Banco de Urgência para Adulto



Universidade do Minho
Escola de Ciências - Departamento de Biologia

METODOLOGIA DAS COLHEITAS

1 - Locais a estudar no Hospital Agostinho Neto – Praia em Cabo Verde

Bloco operatório (B):

- Sala de preparação (BP).
- Sala de operações (BO).
- Sala de Recobro
- Sala pós-operatório
- Corredor do bloco operatório

Sala de Internamento (I) de:

- Unidade de Hemodiálise (UH).
- Unidade de Neonatologia (UN)
- Unidade de Oncologia (U.O)
 - Internamento de Infeciologia (I I)
 - Internamento de Cirurgia (I.C)

Ar exterior envolvente do hospital (AE) - controle.

(no exterior das janelas do hospital)

2 - Amostras a colher em cada sala

- Superfícies – mesas do trabalho, mesas-de-cabeceira, bandejas de ar condicionado e de objectos e equipamentos existentes;

- Ar atmosférico de cada local;

- Água corrente usada em cada local;

B.O. – Bloco Operatório

B.O.R. – Bloco Operatório Sala de Recobro

B.O.P. – Bloco Operatório Sala de Preparação

B.O.J. – Bloco Operatório Janela do corredor

B.O.C. – Bloco Operatório corredor de acesso direto a bloco operatório

I.N. - Internamento de Neonatologia

I.N.B. - Internamento de Neonatologia Bandeja de ar condicionado

I.N. C- Internamento de Neonatologia Controlo

U.O. - Unidade de Oncologia

I.I. - Internamento de Infeciologia

I.C.- Internamento Cirúrgico

U.H.- Unidade de Hemodiálise

A.A. - Agua autotanque

LOCAL DA COLHEITA

Bloco Operatório

DATA ___/___/___

Nº	Tipo de Amostra	Dia Inocul.	Colónias observadas	Nº dos Tubos	Género (identificação convencional)	Espécies (identificação molecular)
B.O.1	Água	17/01	A-6 colónias de cor branca	B.O.1.A	<i>Acremonium</i> sp	
			B-7 col. verde-escura	B.O.1.B	<i>Cladosporium</i> sp	
			C-35 col. verde clara	B.O.1.C	<i>Penicillium</i> sp.	
			D-3 col. branca esverdeada	B.O.1D	Sem crescimento	
B.O.2	Ar	17/01	A-1-col. verde-escura	B.O.2.A	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
			B-6-col. verde/branca	B.O.2.B	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus versicolor</i>
B.O.3	Superfície da mesa de operações		A-17-col. branca e verde	B.O.3.A	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium chrysogenum</i>
B.O.R.1	Ar		A-1-col. branca penugenta	B.O.R.1.A		
			B-3-col. verde-escura	B.O.R.1.B		
			C-4-col. branca/verde	B.O.R.1.C		
			D-15-col. verde-clara	B.O.R.1.D		

B.O.R.2	Superfície da Mesa		A-79- col. verde clara	B.O.R.2.A	<i>Penicillium</i> sp.	
			B-2- col. amarela/cast	B.O.R.2.B	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus niger</i>
			C- 31- col. branca	B.O.R.2.C	<i>Penicillium</i> sp.	
B.O.P.1	Superfície da cabeceira da cama		A-25- col. verde clara	B.O.P.1.A	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium chrysogenum</i>
			B-16- col. verde/branca	B.O.P.1.B	<i>Penicillium</i> sp.	
			C-1- col. verde-escura	B.O.P.1.C	<i>Penicillium</i> sp.	
B.O.P.2	Ar		A-4 col. verde-escura	B.O.P.2.A	<i>Cladosporium</i> sp	
			B-3 col. verde-clara	B.O.P.2.B	<i>Aspergillus</i> (16)	<i>Aspergillus versicolor</i>
			C-6 col. branca	B.O.P.2.C	<i>Penicillium</i> sp	
			D-1 col. branca penugenta	B.O.P.2.D	<i>Aspergillus</i> (3)	<i>Aspergillus unguis</i>
			E- col. branca	B.O.P.2.E	<i>Phoma</i> sp.	
B.O.J.	Superfície da janela do corredor do bloco operatório	17/01	A-135 col. verde clara	B.O.J.A	<i>Penicillium</i> sp.	
			B-52 col.verde/branca	B.O.J.B	<i>Penicillium</i> sp.	
B.O.C	Ar do corredor de acesso direto ao B.O.		A-2 col. verde-escura	B.O.C.A	<i>Cladosporium</i> sp	

			B-1 col. branca peluda	B.O.C.B	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium brevicompactum</i>
			C-6 col. esverdeada	B.O.C.C	<i>Penicillium</i> sp.	
			D-4 col. verde clara	B.O.C.D	<i>Penicillium</i> sp.	
I.C.9	Sala do pós-operatório		A-3-col. verde-escura	I.C.9.A	<i>Cladosporium</i> sp	
			B-2-col. verde-clara	I.C.9.B	<i>Penicillium</i> sp.	

LOCAL DA COLHEITA

Internamento de Neonatologia

DATA ___/___/___

Nº	Tipo de Amostra	Dia Inocul.	Colónias observadas	Nº dos Tubos	Género (identificação convencional)	Espécies (identificação molecular)
I.N.1	Água		A-10-col. levedura	I.N.1.A	<i>Geotrichum</i> sp.	<i>Galactomyces geotrichum</i>
			B-2-col. verde-escura	I.N.1.B	<i>Cladosporium</i> sp.	
			C-5-col. branca penugenta	I.N.1.C	Sem crescimento	
			D -12 col. verde-clara	I.N.1.D	<i>Penicillium</i> sp.	
I.N.2	Ar		A-1-col. verde-escura	I.N.2.A	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>
			B-1-col. verde/branca	I.N.2.B	<i>Cladosporium</i> sp.	
			C-1-col. branca	I.N.2.C	Sem crescimento	

I.N.B1	Bandeja ar condicionado 1		A-13-col. verde-escura	I.N.B.1.A	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus nidulans</i>
			B-5-col. branca	I.N.B.1.B	Sem crescimento	
			C-4 col. branco penugenta	I.N.B.1.C	<i>Chaetomium</i> sp.	
			D-1-col. violeta clara	I.N.B.1.D	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	
I.N.B2	Bandeja ar condicionado 2		A-14 col. verde-escura	I.N.B.2.A	<i>Cladosporium</i> sp	
			B- 3 col. branca/amarela	I.N.B.2.B	<i>Aspergillus</i> sp	<i>Aspergillus westerdijkae</i>
			C- 2 col. branca/castanha	I.N.B.2.C	<i>Aspergillus</i> sp	<i>Aspergillus flavus</i>
			D- 2 col. verde/acastanhada	I.N.B.2.D	<i>Bipolaris</i> sp.	
			E- 4 col. creme acastanhada	I.N.B.2.E	<i>Scopulariopsis</i> sp.	
I.N.B3	Bandeja ar condicionado 3		A- 34 col. verde-escura	I.N.B.3.A	<i>Cladosporium</i> sp.	
			B- 2 col. esverdeada penugenta	I.N.B.3.B	<i>Alternaria</i> sp.	
			C- 10 branca penugenta	I.N.B.3.C	<i>Alternaria</i> sp.	
			D- 2 branco amarelado	I.N.B.3.D	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus tamarii</i>

Controlo	
----------	--

I.N.	Ar exterior da janela		A- 3 col. verde-escura	I.N.C.A	Contaminação	
			B- 1 col. branca penugenta	I.N.C.B	“	
			C- 32 col. verde-clara	I.N.C.C	“	

LOCAL DA COLHEITA
Unidade de Oncologia
DATA ___ / ___ / ___

Nº	Tipo de Amostra	Dia Inocul.	Colónias observadas	Nº dos Tubos	Género (identificação convencional)	
U.O.1	Ar		A-12 col. verde-escura	U.O.1.A	<i>Penicillium</i> sp.	
			B-3 col. branca-verde	U.O.1.B	<i>Penicillium</i> sp.	
			C-18 col. verde/cinzenta	U.O.1.C	<i>Penicillium</i> sp.	
			D-4 col. branca/verde	U.O.1.D	<i>Penicillium</i> sp.	
U.O.2	Superfície do braço da almofada de quimioterapia		A -37 col. verde-clara	U.O.2.A	<i>Penicillium</i> sp.	
			B-9 col. branca compacta	U.O.2.B	<i>Penicillium</i> sp.	
			C-2-col. verde-escura	U.O.2.C	Sem crescimento	
U.O.3	Água		A-2 col. branca espessa	U.O.3.A	<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Rhizopus oryzae</i> ou <i>R. arrhizus</i>
			B-25 col. branco espessa	U.O.3.B	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus niger</i>
			C-2 col. branca penugenta	U.O.3.C	<i>Verticillium</i> sp.	
			D-1 col. branca/creme	U.O.3.D	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium cf. solani</i>

LOCAL DA COLHEITA

Internamento de Infeciologia

DATA ___/___/___

Nº	Tipo de Amostra	Dia Inocul.	Colónias observadas	Nº dos Tubos	Género (identificação convencional)	Espécies (identificação molecular)
I.I.1	Ar	18/01	A-1 col. verde-escura	I.I.1.A	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
			B-14 col. verde-clara	I.I.1.B	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
			C-1 col. esverdeada	I.I.1.C	<i>Cladosporium sp</i>	
I.I.2	Água	18/01	A-8 col. branca	I.I.2.A	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium crustosum</i>
			B-7col. castanha clara	I.I.2.B	<i>Candida sp.</i>	<i>Candida stellimalicola</i>
			C-1 col. branca rosada	I.I.2.C	<i>Byssochlamys nivea</i>	
			D-3 col. verde-escura	I.I.2.D	Sem crescimento	
			E-2 col. verde-clara	I.I.2.E	<i>Penicillium sp.</i>	
I.I.3	Superf. Mesa-de-cabeceira 1	18/01	A-82-col. Verde clara	I.I.3.A	<i>Penicillium sp.</i>	
I.I.4	Superf. Mesa-de-cabeceira 2	18/01	A-47-col.verde clara	I.I.4.A	<i>Penicillium sp.</i>	
			B-3-col. Branca	I.I.4.B	<i>Penicillium sp.</i>	

LOCAL DA COLHEITA

Intenamento Cirúrgico

DATA ___/___/___

Nº	Tipo de Amostra	Dia Inocul.	Colónias observadas	Nº dos Tubos	Género (identificação convencional)	Espécies (identificação molecular)
I.C.1	Ar sala de queimadura		A-4 col. verde-escura	I.C.1.A	Sem crescimento	
			B-2 col. branca	I.C.1.B	<i>Aspergillus</i> sp. (7)	<i>Aspergillus</i> sp.
I.C.2	Ar sala com pacientes idosos debilitados e diabéticos		A-3 col. verde-clara	I.C.2.A	<i>Penicillium</i> sp.	
I.C.3	Água		A-2 levedura	I.C.3.A	Sem crescimento	
			B-1 col. branca/rosa	I.C.3.B	<i>Acremonium</i> sp.	
			C-1 col. verde-escura	I.C.3.C	<i>Cladosporium</i> sp.	
			D-1 col. verde-clara	I.C.3.D	Sem crescimento	
I.C.4	Janela da sala queimadura		A-4 col. amarela	I.C.4.A	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus tubingensis</i>
			B-2 col. levedura	I.C.4.B	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
			C-3 col. branca/rosa	I.C.4.C	<i>Rhodotorula</i> sp.	<i>Rhodotorula</i>
			D-6 col. branca espessa	I.C.4.D	<i>Mucor</i> sp	

I.C.5	Mesa-de-cabeceira internamento cirúrgico variado 1		A-4 col. verde-clara	I.C.5.A	<i>Penicillium</i> sp.	
			B-4 col. amarela	I.C.5.B	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus niger</i>
			C-3 col. castanha clara	I.C.5.C	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium equiseti</i>
			D-6 col. verde-escura	I.C.5.D	Sem crescimento	
			E-7 col. branca espessa	I.C.5.E	Sem crescimento	
			F- 2 col. amarela/branca	I.C.5.F	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus wentii</i>
			G- 3 col. vermelha	I.C.5.G	Sem crescimento	
I.C.6	Mesa-de-cabeceira internamento de cirurgia		A-2 col. verde-escura	I.C.6.A	<i>Cladosporium</i> sp.	
			B-13 col. verde/branca	I.C.6.B	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium chrysogenum</i>
			C-2 col. branca espessa	I.C.6.C	<i>Bipolaris</i> sp.	
			D- 1 col. amarela/verde	I.C.6.D	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus nidulans</i>

I.C.7	Mesa-de-cabeceira de sala com pacientes idosos debilitados e diabéticos		A-22 col. branca/verde clara	I.C.7.A	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus flavus</i>
			B – col. leveduriforme plana	I.C.7.B	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
			C-1 col branca	I.C.7.C	<i>Candida</i> sp.	<i>C. parapsilosis</i>
I.C.8	Mesa-de-cabeceira de sala de queimados		A- 3 col. verde-escura	I.C.8.A	<i>Cladosporium</i> sp. + <i>Aspergillus</i> sp.	
			B-4-col. branca	I.C.8.B	<i>Penicillium</i> sp.	

LOCAL DA COLHEITA

Unidade de Hemodiálise

DATA ___/___/___

Nº	Tipo de Amostra	Dia Inocul.	Colónias observadas	Nº dos Tubos	Género (identificação convencional)	Espécies (identificação molecular)
U.H.1	Bandeja do Ar condicionado		A-11 col verde-claro	U.H.1.A	<i>Penicillium</i> sp.	
			B-10 col branco/verde claro	U.H.1.B	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus flavus</i>
			C-1 col amarela esverdeado	U.H.1.C	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus nidulans</i>
U.H.2	Ar		A-3 col creme	U.H.2.A	<i>Scopulariopsis</i> sp.	

			B-1 col amarela	U.H.2.B	<i>Penicillium sp.</i>	
			C- 3 col verde-claro	U.H.2.C	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>
U.H.3	Superfície de cama		A-1 col verde-escuro	U.H.3.A	<i>Cladosporium sp.</i>	
			B-1 col branco espeço	U.H.3.B	<i>Aspergillus sp</i>	<i>Aspergillus versicolor ou Aspergillus nidulans (duvida)</i>
			C-7 col verde-claro	U.H.3.C	<i>Phoma + Penicillium sp.</i>	
U.H.4	Água		A-1.col. branca plana	U.H.4.A	<i>Penicillium sp.</i>	

Controlo da água do hospital

	Água do autotanque		A-1 col Branco	A.A.A	<i>Geotrichum sp.</i>	<i>Galactomyces geotrichum</i>
			B- 6 col branca plana	A.A.B	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>

<< Seq 1

TGATCCGAGGTCACCTGAAAAAATGGTTGGAGACGTCGGCTGGCGCCCGG
 CCGGCCCTAATCGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACA
 CGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCCGGGGGGGACGACGCCA
 ACACACAAGCCGGGCTTGATGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCC
 CCCGGAATGCCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCCTG
 AATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAGTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCC
 GGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTGACTGATTTTATATTCAGACTC
 AGACTGCATCACTCTCAGGCATGAAGTTCAGTAGTCCCCGGCGGCT>>

<< Seq 2

CCAACCTCCCACCCTTGAATACTGAACACTGTTGCTTCGGCGGGGGCGTCCCC
 CTGGAACTCTCCGGGAGGGGCAAGCCGCCGGAGACCACCGAACTTCATGCC
 TGAGAGTGATGCAGTCTGAGCCTGAAATATAAATCAGTCAAACCTTTCAAC
 AATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAACTGCGATAA
 GTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTG
 CGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTT
 CAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTCGCCCCCGGGGGACGGACCCGA
 AAGGCAGCGGCGGCACCGTGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCAC
 CCGCTCGATTAGGACCGGCCGGGCGCCCGCCGGCGTCAAACCCCAATCTTT
 CTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAA>>

<< Seq 3

GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGTCCTTTGGGCCCA
 ACCTCCCATCCGTGTCTATTGTACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGCTTGT
 CGGCCGCGGGGGGGCGCCTCTGCCCCCGGGCCCGTGCCCGCCGGAGACC
 CCAACACGAACACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAAT
 CAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACG
 CAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAG
 TCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGA
 GCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCGCCCTC
 TCCGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGA
 GCGTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACG
 TTTTCCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCA>>

<< Seq 4

CTACCTGATCCGAGGTCAACCTGGAAAAAATGGTTGGAAAACGTCGGCAGG
 CGCCGGCCAATCCTACAGAGCATGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATC
 GGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCCCGGAGAGGGGGAC
 GGCACCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACA
 GGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGAT
 GATTCCTGAATTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTC
 ATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCATT
 CAATCAACTCAGACTGCACGCTTTCAGACAGTGTTTCGTGTTGGGGTCTCCGG
 CGGGCACGGGCCCGGGGGCAAAGGCGCCCCCGGCGGCCGACAAGCGG
 CGGGCCCGCCGAAGCAACAGGGTATAATAGACACGGATGGGAGGTTGGGC
 C>>

<< Seq 5

TCAACCTGGAAAAAATGGTTGGAAAACGTCGGCAGGCGCCGGCCAATCCTA

CAGAGCATGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCC
GCTGCCTTTTCGGGCCCGTCCCCCGGAGAGGGGGACGGCGACCCAACACAC
AAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCCGGAA
TACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTG
CAATTCACATTAGTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATTGATGCCGGAACC
AAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCATTCAACTCAGACT
GCACGTTTTAGACAGTGTTCGTGTTGGGGTCTCCGGCGGGCACGGGCCCCG
GGGGCAAAGGCGCCCCCGGCGGCCGACAAGCGGCGGGCCCCGCCGAAG
CAACAGGGTATAATAGACACGGATGGGAGGTTG>>

<< Seq 6

GATCCGAGGTCACCTGGTTAAAAAAGGTTGGTGGTCGGCAGGCGCCGGCC
GGGCCTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACGCG
GTGCCCGCGCTGCCTTTTCGGGCCCGTCCCCCGGAAGGGGACGGCGACCCA
ACACACAAGCCGTGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCC
CCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGA
ATTCTGCAATTCACATTAATTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCG
GAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACGATTAATAAATCGACTCA
GACTGCAACCTTCAGACAGTGTTCGTGTTGGTGTCTCCGGCGGGCGCGGGCC
CGGGGGCGAGATGCCCCCGGCGGCCACGAATGGCGGGCCCCGCCGAAGCA>
>

<< Seq 7

CTGATCCGAGGTCAACCTGAGAAAAATAAGGTTGGAGACGCCGGCTGGGCGC
CCGGCCGGCCCTAATCGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCG
GACACGGTGCCGCCGCTGCCTTTTCGGGCCCGTCCCCCGGGGGGACGACGA
CCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATG
CCCCCGGAATGCCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCA
CTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAGTTCGCTGCCTTCTTCATCGAT
GCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTGA>>

<< Seq 8

TGGAAGAGATTGATTTGCGTTCGGCAAGCGCCGGCCGGGCCTACAGAGCGG
GTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTT
TGGGGCCCCGTCCCCCGGAGAGGGGACGACGACCCAACACACAAGCCGTG
CTTGATGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCCGGAATACCAGG
GGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTACGGAATTCTGCAATTCA
CACTAGTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGAT
CCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCGATAACAATCAACTCAGACTTACTA
GATCAGACAGAGTTCGTGGTGTCTCCGGCGGGCGCGGGCCCCGGGGCTGAGA
GCCCCCGGCGGCCATGAATGGCGGGCCCCGCCGAAGCAACTAAGGTACAGTA
AA>>

<< Seq 9

AACCTCCCACCCGTGACTACCTAACACTGTTGCTTCGGCGGGGAGCCCCCTA
GGGGCGAGCCGCCGGGGACCACTGAACTTCATGCCTGAGAGTGATGCAGTC
TGAGCCTGAATACAAATCAGTCAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGTTCC
GGCATCGATGAAGAACGCAGCGAACTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAA
TTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGG
GGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTT
GGGTCGTGCTCCCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGT

GTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCGATTAGGGCCGGCC
GGGCGCCAGCCGGCGTCTCCAACCT>>

<< Seq 10

CCAACCTCCCACCCGTGTATACCGTACCTTGTGCTTCGGCGAGCCCCGCCCC
CCTTCCTTAGGGGTGGCACAGCGCTCGCCGGAGACACCAACGTGAACACTG
TCTGAAGTTTTGTCGTCTGAGTCGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTCA
ACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT
AATTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACAT
TGCACCCCCTGGTATTCCGGGGGGTATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCC
TCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTTCGTCGTCGCCCCCGGGGGACGGGCCCCG
AAAGGCAGCGGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCA
CCCGCTCTTGTAGGCCCGGCCGGCTGCTGGCCGACGCTGAAAAGCAACCAA
TTTATTTCTCCAGGTTGACCTCGGATC>>

<< Seq 11

GTCAACCTGGAAAAAGATTGATTTGCGTTCGGCAAGCGCCGGCCGGGCCTA
CAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCC
GCTGCCTTTGGGGCCCGTCCCCCGGAGAGGGGACGACGCCCAACACAC
AAGCCGTGCTTGATGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGA
ATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACGGAATTCT
GCAATTCACACTAGTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAAC
CAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCGATAACAATCAACTCAGA
CTTCACTAGATCAGACAGAGTTCGTGGTGTCTCCGGCGGGCGCGGGCCCCGG
GGCTGAGAGCCCCCGCGGCCATGAATGGCGGGCCCCGCCGAAGCAACTAA
GGTACAGTAAACACGGGTGGGAG>>

<< Seq 12

AGTGGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGGAAAGAATGGTTGTTTT
GCGTTCGGCAAGCGCCGGCCGGGCCTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATA
CGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTGGGGCCCGTCCCCCCC
GAAGAGGGGACGACGCCCAACACACAAGCCGTGCTTGATGGGCAGCAAT
GACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTT
CAAAGACTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACACTAGTTATCGCATT
CGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTT
AACTGATTGCGATAACAATCAACTCAGACTTCACTAGATCAGACAGAGTTCG
TGGTGTCTCCGGCGGGCGCGGGCCCCGGGGGCTGATGCCCCCGGCGGCCTT
AAAGGCGGGCCCCGCCGAAGCAACTAAGGTTACAGTAAACACGGGTGGGAG
GTTG>>

<< Seq 13

TCAACCTGAAGAAAAATGGTTGGAGACGTCCGGCTGGCGCCCGGCCGGCCCT
AGTCGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACACGGTGCCG
CCGCTGCCTTTCCGGGCCCGTCCCCCGGGGGGACGACGCCCAACACACAA
GCCGGGCTTGATGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAAT
GCCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGC
AATTCACACTTATCGCAGTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCA
AGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTGACTGATTTTATATTCAGACTCAGACTGC
ATCACTCTCAGGCATGAAGTTCAGTAGTCCCCGGCGGCTCGCCCCCGAGGG
GGTTCCCCGCCGAAGCAACAGTGTTAGGTATTCACGGGTGGGAGGTTGGGC
GC>>

<< Seq 14

GAGGTCAACCTGGAAAAAGATTGATTTGCGTTCGGCAAGCGCCGGCCGGGC
CTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCC
GCCGCTGCCTTTGGGGCCCGTCCCCCGGAGAGGGGACGACGACCCAACA
CACAAGCCGTGCTTGATGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCC
GGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACGGAAT
TCTGCAATTCACACTAGTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCCTTCATCGATGCCGG
AACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCGATAACAATCAACTC
AGACTTCACTAGATCAGACAGAGTTCGTGGTGTCTCCGGCGGGCGCGGGCC
CGGGGCTGAGAGCCCCCGGCGGCCATGAATGGCGGGCCCCGCCGAAGCAACT
AAGGTACAGTAAACACGGGTGGG>>

<< Seq 15

TGAGAAAAATAAGGTTGGAGACGCCGGCTGGCGCCCGGCCGGCCCTAATCG
AGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACACGGTGCCGCCGCT
GCCTTTCGGGCCCGTCCCCGGGGGGGACGACGACCCAACACACAAGCCGG
GCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATGCCAGG
GGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCATGAATTCTGCAATTCAC
ATTACTTATCGCAGTTCGCTGCGTTCCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATC
CATTGTTGAAAGTTTTGACTGATTTGTATTCAGGCTCAGACTGCATCACTCT
CAGGCATGAAGTTCAGTGGTCCCCGGCGGCTCGCCCCTGGGGGGCTCCCCG
CCGAAGCAACAGTGTTAGGTAGTCACGGGTGGGAGGT>>