

*ANA BEATRIZ ALKMIM TEIXEIRA*

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, Área de Ciências Biomédicas.

Campinas, 29 de agosto de 2001.

Profa. Dra. *Schreiber*  
Angélica Zaninelli Schreiber  
Orientadora

***IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE SUSCETIBILIDADE A  
ANTIFÚNGICOS DE FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS A  
PARTIR DE ESPÉCIMES CLÍNICOS DE PACIENTES COM  
MALIGNIDADES HEMATOLÓGICAS E TRANSPLANTADOS DE  
MEDULA ÓSSEA E SUA CORRELAÇÃO COM ISOLADOS  
AMBIENTAIS***

*CAMPINAS*

*2001*

**UNICAMP**  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

**ANA BEATRIZ ALKMIM TEIXEIRA**

**IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE SUSCETIBILIDADE A  
ANTIFÚNGICOS DE FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS A  
PARTIR DE ESPÉCIMES CLÍNICOS DE PACIENTES COM  
MALIGNIDADES HEMATOLÓGICAS E TRANSPLANTADOS DE  
MEDULA ÓSSEA E SUA CORRELAÇÃO COM ISOLADOS  
AMBIENTAIS**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de  
Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências  
Médicas, área de Ciências Biomédicas.*

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. ANGÉLICA ZANINELLI SCHREIBER**

**CAMPINAS**

**2001**

iii  
UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

**UNICAMP**  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

NIDADE 80  
 CHAMADA T/UNICAMP  
T235i  
 EX  
 OMBO 48094  
16-837/02  
 REÇO R\$ 11,00  
 DATA  
 CPD

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
 BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
 UNICAMP**

CM00165795-B

3 ID 235708

T235i

Teixeira, Ana Beatriz Alkmim

Identificação e avaliação de suscetibilidade a antifúngicos de fungos filamentosos isolados a partir de espécimes clínicos de pacientes com malignidades hematológicas e transplantados de medula óssea e sua correlação com isolados ambientais. / Ana Beatriz Alkmim Teixeira. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientador : Angélica Zaninelli Schreiber

Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas.  
 Faculdade de Ciências Médicas.

1. Fungos-identificação. 2. Antifungal agents. 3. Medula óssea-transplante. 4. Controle ambiental. I. Angélica Zaninelli Schreiber. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

## Banca Examinadora da Defesa de tese de Mestrado

Orientador(a): Profa. Dra. Angélica Zaninelli Schreiber \_\_\_\_\_

### Membros:

- Dra Maria Magali S. R. Soares \_\_\_\_\_
- Dr Plínio Trabasso \_\_\_\_\_
- Dra Maria Luiza Moretti-Branchini \_\_\_\_\_
- Dra Arlete Emily Cury \_\_\_\_\_

Curso de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, área de concentração  
Patologia Clínica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas.

Data: 29-09-01

200214502



## **DEDICATÓRIA**

*Aos meus pais, Beatriz e Clayton pelo incentivo e pela presença constante*

*Aos meus irmãos, Alexandre pela confiança e Gil pelo exemplo de vida*

*À minha orientadora, Angélica Z. Schreiber pela paciência, credibilidade e oportunidade*

- Aos pacientes da TMO, pela serenidade e exemplo de vida.
- À minha orientadora Angélica Zaninelli Schreiber pela amizade que cresce a cada dia.
- À Profa. Dra. Maria Luiza Moretti Branchini pelo incentivo, confiança e oportunidade.
- Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Clínica do HC-Unicamp . A Luzia Lyra e ao Edson Luz em especial.
- Aos meus colegas de Pós-graduação e aos docentes do DPC-UNICAMP.
- Aos colegas e funcionários do Laboratório de Biologia Molecular do HC-Unicamp.
- Ao Dr Plinio Trabasso e a toda equipe do CCIH- HC-UNICAMP.
- À Dr<sup>a</sup> Vera e a toda equipe de enfermagem da Unidade de Transplante de Medula Óssea do HC- Unicamp.
- À Japan Internatinal Corporation Agency (JICA).
- Ao Prof. Makoto Miaji e ao Prof Hideaki Taguchi do Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicosis, Chiba University, Chiba- Japão.
- À todos os membros da Universidade de Chiba – Japão.
- À todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

**O meu profundo agradecimento!**

*“Há homens que lutam um dia e são bons.*

*Há outros que lutam um ano, e são melhores.*

*Há os que lutam por toda uma vida.*

*Estes são imprescindíveis.*

**Bertolt Brecht**

	<i>Pág</i>
<b>RESUMO.....</b>	<i>xxix</i>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<i>33</i>
1.1. Características gerais dos microrganismos.....	<i>35</i>
1.2. Aspectos ambientais.....	<i>39</i>
1.2.1. Métodos de avaliação ambiental.....	<i>39</i>
1.2.2. Microbiota ambiental em diferentes locais.....	<i>41</i>
1.2.3. Medidas de controle de infecção.....	<i>42</i>
1.3. Aspectos epidemiológicos e clínicos.....	<i>42</i>
1.4. Diagnóstico laboratorial.....	<i>44</i>
1.4.1. Espécimes clínicos.....	<i>41</i>
1.4.2. Isolamento e identificação dos microrganismos.....	<i>45</i>
1.4.3. Avaliação de potencial patogênico.....	<i>46</i>
1.5. Tratamento e profilaxia.....	<i>46</i>
1.6. Testes de susceptibilidade.....	<i>50</i>
1.6.1. Histórico.....	<i>51</i>
1.6.2. Variáveis pré- analíticas.....	<i>52</i>
1.6.3. Procedimentos de leitura e interpretação dos resultados.....	<i>55</i>

1.6.4. Correlação <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	56
1.7. Perspectivas.....	57
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>59</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>63</b>
3.1. Espécimes clínicos.....	65
3.2. Microbiota fúngica ambiental.....	65
3.3. Isolamento dos fungos filamentosos.....	66
3.4. Identificação presuntiva dos microrganismos em estudo.....	66
3.5. Teste de crescimento em diferentes temperaturas.....	66
3.6. Identificação definitiva.....	66
3.7. Manutenção dos microrganismos isolados.....	67
3.8. Teste de suscetibilidade aos antifúngicos <i>in vitro</i> .....	67
3.8.1. Microrganismos.....	67
3.8.2. Inóculo.....	67
3.8.3. Meio de cultura.....	68
3.8.4. Técnica de microdiluição em caldo.....	68
3.8.4.1. Antifúngicos avaliados.....	68
3.8.4.2. Solução estoque.....	69
3.8.4.3. Preparação da placa de diluição.....	69

3.8.4.4. Cepa padrão.....	69
3.8.4.5. Execução do teste de leitura da CIM.....	70
3.9. Análise dos dados obtidos.....	71
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>73</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>109</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>121</b>
<b>7. SUMMARY.....</b>	<b>125</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>129</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>141</b>



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

---

AnB	anfotericina B
API	aspergilose pulmonar invasiva
ATCC	American type Culture Collection
BAL	lavado broncoalveolar
Ceto	cetoconazol
CIM	concentração inibitória mínima
DECH	doença do enxerto contra o hospedeiro
DIC	bairro da periferia de Campinas
DMSO	dimetil sulfoxido
DNA	ADN ácido dexoxirribonucleico
5-Fc	5-flucitosina
Fluco	fluconazol
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
IFA	infecção fúngica por <i>Aspergillus</i>
IFI	infecção fúngica invasiva
Itra	itraconazol
IV	intravenoso
Mcz	miconazol

MOPS	ácido morfolinepropanesulfônico
NCCLS	National Committe for Clinical and Laboratory Standards
Nist	nistatina
RNA	ARN ácido ribonucleico
TMO	transplante de medula óssea
UFC	unidade formadora de colônias
VO	via oral

## ***LISTA DE TABELAS***

---

	<b><i>Pág</i></b>
<b>TABELA 1 :</b> Fungos filamentosos isolados como colonizantes dos pacientes.....	75
<b>TABELA 2 :</b> Associação entre isolados clínicos e ambientais.....	83
<b>TABELA 3 :</b> Variação da CIM para as cepas de <i>Aspergillus</i> , frente aos antifúngicos avaliados.....	85
<b>TABELA 4 :</b> Variação da CIM para as cepas de <i>Fusarium</i> , frente aos antifúngicos avaliados.....	87
<b>TABELA 5 :</b> Variação da CIM para as cepas de <i>Paecilomyces</i> , frente aos antifúngicos avaliados.....	89
<b>TABELA 6 :</b> Variação da CIM para as cepas de <i>Chaetomium</i> , frente aos antifúngicos avaliados.....	91

<b>FIGURA 1 :</b>	Percentagem de fungos filamentosos isolados do ar da Unidade de TMO do HC-Unicamp, no período de março de 1999 a março de 2000, distribuída de acordo com as estações do ano.....	77
<b>FIGURA 2 :</b>	Avaliação de potencial patogênico das cepas de fungos filamentosos ambientais e isoladas de espécimes clínicos de pacientes.....	79
<b>FIGURA 3 :</b>	Avaliação de potencial patogênico de cepas de <i>Aspergillus sp</i> ambientais e isoladas de espécimes clínicos.....	81
<b>FIGURA 4 :</b>	Avaliação de potencial patogênico de cepas de <i>Fusarium sp</i> ambientais e isoladas de espécimes clínicos.....	81
<b>FIGURA 5 :</b>	Valores de CIM de anfotericina B para cepas de <i>Aspergillus sp</i> isolados de pacientes e do ambiente.....	93
<b>FIGURA 6 :</b>	Valores de CIM de miconazol para cepas de <i>Aspergillus sp</i> isoladas de pacientes e do ambiente.....	93
<b>FIGURA 7 :</b>	Valores de CIM de cetoconazol para cepas de <i>Aspergillus sp</i> isoladas de pacientes e do ambiente.....	95
<b>FIGURA 8 :</b>	Valores de CIM de itraconazol para cepas de <i>Aspergillus sp</i> isoladas de pacientes e do ambiente.....	95
<b>FIGURA 9 :</b>	Valores de CIM de fluconazol para cepas de <i>Aspergillus sp</i> isoladas de pacientes e do ambiente.....	97

<b>FIGURA 10 :</b>	Valores de CIM de 5- flucitosina para cepas de <i>Aspergillus sp</i> isoladas de pacientes e do ambiente.....	97
<b>FIGURA 11 :</b>	Valores de CIM de anfotericina B para cepas de <i>Fusarium sp</i> de pacientes e do ambiente.....	99
<b>FIGURA 12 :</b>	Valores de CIM de nistatina para cepas de <i>Fusarium sp</i> de pacientes e do ambiente.....	101
<b>Figura 13 :</b>	Valores de CIM de nistatina para cepas de <i>Fusarium sp</i> isoladas de pacientes e ambiente (p=0,823).....	101



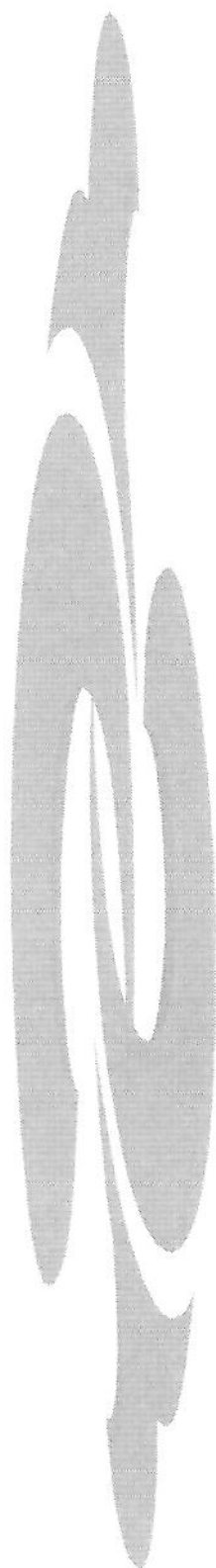
## ***RESUMO***



Infecção é a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes submetidos a transplante de medula óssea, e portadores de malignidades hematológicas. A fonte do agente infectante é, na maioria das vezes, microbiota endógena ou o ambiente hospitalar. Dentre as infecções adquiridas do ambiente hospitalar, as causadas por fungos filamentosos são especialmente invasivas em pacientes imunocomprometidos. Aspergilose é adquirida por inalação dos esporos e, em alguns casos, foi comprovada a colonização nasal anterior ao desenvolvimento da doença invasiva.

Neste trabalho, foram isolados e identificados fungos filamentosos colonizantes de pacientes portadores de doenças hematológicas, e submetidos a transplante de medula óssea. Concomitantemente foram realizadas, no período de um ano, avaliações da micota ambiental da Unidade de Transplante de Medula óssea. De modo geral os principais gêneros isolados tanto de pacientes, quanto do ambiente foram *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium* e *Paecilomyces* e *Chaetomium*, sendo estatisticamente significativa, a presença de *Fusarium spp* no outono e *Cladosporium spp* no inverno. Os microrganismos isolados de espécimes clínicos, puderam ser classificados como potencialmente mais patogênicos do que os isolados do ambiente por crescerem mais abundantemente a 37°C.

Testes de suscetibilidade a antifúngicos foram realizados pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com o NCCLS M-38P (1998). Foi possível determinar que as cepas ambientais de *Aspergillus spp* foram significativamente mais resistentes, frente a miconazol e itraconazol, e que as cepas clínicas de *Fusarium spp* foram mais resistentes frente a fluconazol. Ainda é extremamente difícil estabelecer uma correlação entre a CIM avaliada com os conídios dos fungos e os efeitos clínicos. De modo geral, infecções causadas por fungos filamentosos são caracterizados pela presença de fragmentos de hifas nos tecidos. Talvez, a realização de testes de suscetibilidade com as hifas, seria uma possibilidade de se obter uma melhor correlação entre os resultados *in vitro* e *in vivo*.



## ***1. INTRODUÇÃO***

## 1.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS FUNGOS

O termo *Fungi* refere-se a todos os membros do Reino *Fungi*. Embora fungos e algas tivessem sido considerados membros primitivos do reino *Plantae*, o aumento do conhecimento de seu ciclo de vida, fisiologia e genética, demonstrou que não podem ser classificados nem como plantas, nem como animais. Em 1969, com Whittaker, os fungos passaram a ter seu próprio reino, o reino *Fungi*, que compreende organismos eucarióticos, sem flagelo e que se desenvolvem a partir de esporos: leveduras, bolores e cogumelos (KNOW-(KNOW-CHUNG.& BENNETT, 1992).

As células dos fungos são constituídas de núcleo, parede celular, membrana plasmática, sistema metabólico e respiratório como as células dos seres humanos. A parede celular fúngica contém polissacarídeos e glicoproteínas. A composição destes componentes depende da posição sistemática dos fungos. Os protoplastos de fungos possuem as mesmas características do protoplasma de outros eucariontes que são células ou esferoplastos sem a parede celular. O núcleo contém nucléolos ricos em RNA. O invólucro nuclear é constituído de 2 membranas com características porosas. O citoplasma é revestido pela membrana que contém ergosterol. As organelas citoplasmáticas são: mitocôndrias, vacúolos, vesículas, retículo endoplasmático, microtúbulos, microssomas, ribossomos, cristais de glicogênio. O aparelho de Golgi não está presente em todos os fungos (KNOW-CHUNG & BENNETT, 1992).

São conhecidos dois tipos morfológicos: as leveduras, que são unicelulares e se reproduzem por brotamento, e os bolores ou fungos filamentosos, que são multicelulares e constituídos de filamentos chamados hifas, que podem ou não serem divididas por septos. Uma massa de hifas é denominada de micélio (KNOW-CHUNG.& BENNETT, 1992).

As estruturas de reprodução dos fungos podem ser simples ou complexas e são diferenciadas pelas estruturas somáticas. Os organismos são classificados baseando-se nestas estruturas de reprodução. Nas leveduras os esporos germinados produzem células simples arredondadas, ovais ou alongadas que se reproduzem por brotamento ou por fissão, e formando colônias pastosas ou mucóides. Apresentam tempo de crescimento semelhante ao das bactérias, em torno de 24 horas (KNOW-CHUNG & BENNETT, 1992).

Nos fungos filamentosos, o talo é constituído de hifas, que são filamentos microscópicos ramificados que crescem em diversas direções. O protoplasto da hifa é contínuo ou interrompido por intervalos irregulares chamados septos, que dividem cada hifa em uma célula. A presença ou ausência de septos e as estruturas dos poros são critérios importantes na taxonomia dos fungos (KNOW-CHUNG & BENNETT, 1992).

O micélio frequentemente forma uma colônia circular em meio de ágar e uma colônia globosa em meio de cultura líquida. Isto porque o micélio apresenta uma tendência de crescer por todas as direções saindo do ponto central. O crescimento de cada hifa ocorre nas extremidades. Muitas hifas são capazes de crescerem infinitamente em condições favoráveis (KNOW-CHUNG & BENNETT, 1992).

Espécies de *Aspergillus* são exemplos de fungos filamentosos que formam colônias cotonosas ou velutinas e apresentam crescimento mais lento, podendo variar, conforme a espécie, de 1 a 5 ou até 45 dias. Os fungos filamentosos produzem por reprodução assexuada conídios através das hifas que, dependendo de seu tamanho, são classificados em macroconídios ou microconídios, e possuem formas diferentes conforme a espécie (CARVALHÃES, J., 1999).

A temperatura ideal para crescimento *in vitro* para a maioria dos fungos filamentosos é de 25 a 35°C. Poucas espécies são termotolerantes como *Rhizopus microsporus*, *Aspergillus fumigatus* e *Cladosporium trichoides* que crescem melhor entre 37°C a 50°C. Os fungos que produzem lesões cutâneas e subcutâneas, como os agentes de cromoblastomicose raramente crescem a temperaturas mais altas que 37°C. Os fungos se desenvolvem em pH ácido, no entanto muitos meios de cultura utilizados no laboratório têm pH entre 6,0 e 6,8. Fungos não necessitam de luz para crescer. A luz altera a esporulação de muitos fungos (KNOW-CHUNG & BENNETT, 1992).

Os micologistas estimam que haja cerca de 100.000 espécies válidas descritas de fungos. Destas, apenas 150 são igualmente reconhecidas como patógenos primários de seres humanos e animais. Estes microrganismos podem causar um amplo espectro de infecções, desde doenças sistêmicas e potencialmente fatais, a lesões localizadas na pele, tecido subcutâneo ou mucosas. Em adição a estes patógenos reconhecidos, numerosos

outros fungos têm causado lesões sob condições especiais. Fungos não reconhecidamente patogênicos que infectam pacientes imunocomprometidos são chamados oportunistas. Com a expansão da população deste tipo de paciente, a lista destes fungos oportunistas vem aumentando anualmente (JAWETS et al 1998).

Espécies de *Candida* e outras leveduras oportunistas podem ser adquiridas de uma fonte endógena ou exógena. Por sua vez os conídios de fungos filamentosos são comumente encontrados no ar. Incluindo alguns oportunistas *Fusarium*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Paecylomices*, *Scopulariopsis* e vários bolores pigmentados (JAWETS et al, 1998).

Em se tratando de fungos filamentosos, mais de 300 espécies já foram reportadas como agentes causais de doenças (ARUNDEL, et al, 1986), (GOULD et al, 1991), (IWEN et al, 1994), (PUJOL et al, 1997), (ROSE et al, 1979). Espécies de *Aspergillus*, particularmente *A. fumigatus*, e fungos dos gêneros *Fusarium*, *Curvularia* e *Alternaria* são os mais frequentemente relatados em caso de infecções sistêmicas ou disseminadas (CHRYSSANTHOU et al, 1997), (IWEN, et al, 1994), (VARLIVARIAN et al, 1993).

Fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, são ubíquos encontrados na vegetação em decomposição (JAWETZ et al, 1998) e identificados por suas características morfológicas básicas como cor e formato da cabeça conidial, número de fiálides, formato da vesícula, pela marcação e cor do conidióforo e pelo formato das “células pé” (KNOW-CHUNG & BENETT, 1992). Aproximadamente 8 espécies de *Aspergillus* têm sido constantemente envolvidas em doenças infecciosas humanas: *Aspergillus flavus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. terreus* e *A. clavatus* e são responsáveis por processos alérgicos. *A. fumigatus* é encontrado tanto na aspergilose alérgica como em formas disseminadas de infecção. A aspergilose pulmonar pode ser causada pelo *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. nidulans* e *A. niveus*. Na forma disseminada estão envolvidos *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. restrictus* (LACAZ et al, 1991).

Fungos do gênero *Fusarium* são saprófitas encontrados no solo, sendo patogênicos para as plantas. *Fusarium* sp são identificados conforme a morfologia da colônia, inicialmente branca e cobertas por um micélio aéreo plumoso, que ao maturar, produzem um pigmento de cor lavanda a vermelho púrpuro na superfície e no reverso. Em sua micromorfologia apresenta hifas hialinas, septadas, microconídios de 2 a 3  $\mu$ m de diâmetro, e macroconídios com forma de “banana” ou de foice pela observação em microscopia óptica (KONEMAN et al, 1993), (RAAD, I., 1995). As espécies de *Fusarium* mais frequentemente relatadas em casos de infecções humanas são *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *F. chlamydosporum* e *F. verticillioides* e, que estão associados com infecções disseminadas e como colonizantes em pacientes imunocomprometidos (KNOW-CHUNG, K.J., 1992), (RAAD & HACHEN, 1995).

Fungos demáceos são definidos como aqueles que, em cultura, possuem pigmentação de melanina nas paredes das hifas e dos esporos. Caracterizam-se pelo desenvolvimento de colônias de cor verde intensa, marrom ou negra, cujo reverso apresenta uma coloração negra. Algumas colônias jovens possuem, consistência de leveduras. A maioria das espécies é de desenvolvimento rápido, produzindo colônias maduras em 5 dias (KONEMAN et al, 1993). Os quatro gêneros mais frequentemente encontrados em humanos são: *Alternaria* sp, *Bipolaris* sp, *Curvularia* sp, *Exserohilum* sp. Estes fungos são agentes de infecção oportunista em pacientes imunossuprimidos, causando também sinusites, síndromes subcutâneas e infecções cerebrais. A disseminação ocorre em pacientes com imunossupressão persistente. As síndromes subcutâneas são causadas frequentemente por espécies de *Alternaria*. Sinusites são causadas por espécies de *Bipolaris*, *Curvularia* e *Alternaria*. Foram relatados casos de infecções cerebrais por fungos demáceos, dois casos de meningoencefalites por *Bipolaris*, um caso de abscesso cerebral por *Rhinoctadiella atrovirens* (KNOW-CHUNG & BENETT, 1992), (VARLIVARIAN et al, 1993), um caso de *Chaetomium globosum* em paciente com transplante renal (ANANDI, et al 1989). Outras espécies de *Chaetomium* que também foram relatadas por causarem infecções cerebrais são: *C. atrobruneum* (GUPPY, K.H., 1998) (SEGAL & KUSNE, 1999), *C. strumarum* (ABBOT et al, 1995).



Os fungos dimórficos apresentam uma adaptação morfológica peculiar nos tecidos e ao crescimento a 37°C; algumas espécies de fungos apresentam a capacidade de crescer em duas formas segundo as condições ambientais: como bolor quando incubadas a uma temperatura de 25 a 30°C e como leveduras, quando incubadas a 35 a 37°C (KONEMAN et al, 1993). Esses fungos, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatides*, *Paracoccidioides brasiliensis* podem causar infecção disseminada e quase sempre fatal em pacientes imunodeprimidos (JAWETZ et al, 1998) (ESPINEL-INGROFF, A., 1998).

## 1.2. ASPECTOS AMBIENTAIS

A incidência das diferentes espécies de fungos no ar pode sofrer variações dependendo do local, da estação do ano, do grau higroscópio do ar, da radiação solar e outros fatores abióticos (LACAZ et al, 1991) (SOARES et al, 1997).

Esporos dos fungos filamentosos, estão extremamente disseminados no ambiente, e podem ser encontrados como colonizantes do trato respiratório do hospedeiro, causando, infecções sistêmicas ou disseminadas, como aspergilose broncopulmonar alérgica, aspergiloma e infecções invasivas em pacientes imunocomprometidos ou com alguma doença de base (CHAZATET et al, 1998), (CHYSSANTHOU, 1997), (DEBEAUPUIS et al, 1997), (LEENDERS et al, 1999), (SOARES et al, 1997), sendo espécies de *Aspergillus*, particularmente *A. fumigatus*, e fungos dos gêneros *Alternaria* sp, *Cladosporium* sp, *Mucor* sp, *Rhizopus* sp, os mais frequentemente relatados (CHAZATET et al, 1998), (CHYSSANTHOU, E., 1997). As infecções ocorrem por aquisição exógena dos fungos (DEBEAUPUIS et al, 1997) por inalação dos conídios. O risco de adquirir infecção fúngica está, relacionada com a concentração de conídios presentes no ar ambiental onde se encontra o paciente (ARNOW et al, 1991).

### 1.2.1. Métodos de avaliação ambiental

Existem alguns métodos disponíveis para avaliação da presença de fungos filamentosos no ar ambiental. A sedimentação em placa de Petri, é um dos métodos mais antigos. Consiste na exposição de um meio de cultura ao ar ambiental, durante um período

de tempo arbitrariamente escolhido, a fim de que os esporos aeroportáveis se depositem por simples sedimentação (LACAZ et al, 1991), germinem e cresçam, formando colônias que podem ser isoladas e identificadas. Essa técnica permite verificar variações sazonais de incidência, bem como a prevalência das espécies nessa via de dispersão (ZAITZ et al, 1998). Esta técnica, simples e pouco onerosa, é aleatória, tanto do plano qualitativo quanto do plano quantitativo. Os esporos de *Aspergillus* sp, muito leves, se sedimentam mal e o seu depósito varia de acordo com a localização da placa e das correntes de ar (LAJONCHERE & CHAUVIN, 1994) Segundo Krasinski o método gravitacional por sedimentação em placa (Gasp) embora seja capaz de demonstrar que a medida de controle de infecção reduz a contaminação de fungos no ar, é insensível para detectar níveis de fungos contaminantes a fim de prevenir a aspergilose invasiva (IWEN et al, 1994).

Os contadores de partículas (contador ao núcleo de condensação, contador óptico de partículas a laser), permitem enumerar as partículas em suspensão no ar de uma atmosfera em função do seu corte sem prejuízo da inércia ou da exatidão da natureza. Esses aparelhos são muito frágeis e caros. São úteis para verificar a manutenção da eficiência de filtros e o bom funcionamento de sistemas de tratamento de ar filtrado (LAJONCHERE & CHAUVIN, 1994)

O método do biocoletor pode ser utilizado para avaliar o ar em qualquer ambiente. Numerosos aparelhos estão comercialmente disponíveis, no entanto, a maior parte não é aferida e estudos comparativos de seu desempenho relativo são raros na literatura (LAJONCHERE & CHAUVIN, 1994).

A coleta de esporos fúngicos pode ser realizada por impactação ou filtração em um meio sólido. Os biocoletores que utilizam um meio líquido para imersão dos esporos não parecem aptos aos esporos aspergílares, pouco aderidos ao líquido (LAJONCHERE & CHAUVIN, 1994). Nos biocoletores por impactação, o ar é aspirado por meio de fendas (impactador Casella-Bourdellon MKII, 1941) através de uma peneira (impactador Andersen 2000 Inc Viable Microbial Particle Sampler, 1958) ou centrifugados por meio de um ventilador (impactador RCS). As partículas presentes são diretamente impactadas a um meio de cultura conhecido. Os mais usados são ágar Sabourand dextrose e extrato de malte, não havendo grandes diferenças entre eles (SMID, et al, 1989). Com este equipamento, o

volume de ar aspirado é determinado e os resultados são expressos em unidades formadoras de colônias (UFC) por metro cúbico. Os biocoletores por impactação (Andersen 2000 Inc Viable Microbial Particle Sampler, 1958 e Casella-Bourdellon MKII, 1941) foram largamente utilizados em diversos estudos (ARNOW et al, 1991), (BUTTNER & STETZENBACHN, 1993), (GOULD, D., 1991), (ROSE & HIRSCH, 1979), (SMID et al, 1989) e foram aferidos. São eles, por isso considerados como métodos de referência para os outros biocoletores, mais recentes, que se inspiram nos mesmos princípios (LAJONCHERE & CHAUVIN, 1994).

### 1.2.2. Microbiota ambiental em diferentes locais

Coletas realizadas em uma unidade hematológica em construção pelo método gravitacional por sedimentação em placa (Gasp) (IWEN et al, 1994) permitiram o isolamento de *Cladosporium* sp, *Alternaria* sp, *A. fumigatus*, *Chaetomium* sp, *Fusarium* sp, *A. niger*, *Monilia sterilia*, *Penicillium* sp, *Rhizopus* sp, *Mucor* sp próximo a construção e *Cladosporium* sp, *Alternaria* sp, *A. fumigatus*, *Chaetomium* sp, *A. niger*, *Monilia sitophila* *Penicillium* sp, *Mucor*, sp, *Nigrospora* sp distante da construção (IWEN et al, 1994).

Relatos para investigação de cepas ambientais e isoladas de espécimes clínicos mostraram, em uma inspeção temporária de contaminantes no ar, que algumas cepas podem persistir no ambiente por até 6 meses. Dois pacientes podem ter sido infectados com a mesma cepa (GIRARDIN et al, 1994). Análise por amplificação de DNA mostrou que 2 pacientes de uma Unidade de TMO foram infectados com cepas de *Aspergillus* que eram diferentes das cepas do ambiente (RATH, P., 1997).

No Brasil, os estudos pioneiros para verificação da micota ambiental, foram realizados por LIMA, em 1941, e PATTO, em 1943, que verificaram a presença de *Alternaria* sp e *Helminthosporium* sp em Belo Horizonte (M.G.-Brasil), *Aspergillus* sp e *Alternaria* sp, *Mucor* sp, *Cephalosporium* sp, *Helminthosporium* sp e *Penicillium* sp no Rio de Janeiro (R.J.-Brasil). Estes fungos também têm sido correlacionados como indicadores de poluição ambiental (SOARES et al, 1997).

Há também um estudo específico da cidade de Campinas, que está situada no Estado de São Paulo, Brasil, para avaliação da micota local. Foram expostas 130 placas contendo meio Sabouraud, empregando o método de sedimentação em 5 locais diferentes na cidade: DIC e centro (ambiente poluído), IAC (ambiente não poluído), Jardim Flaboyant e Pio XII (ambiente pouco poluído). Os principais gêneros mais frequentes durante os meses do ano foram: *Cladosporium* sp, *Epicoccum* sp, *Fusarium* sp, *Rhodotorula* sp e *Candida* sp. No outono, inverno e primavera, *Cladosporium* sp foi o gênero mais isolado enquanto que no verão, os fungos não esporulados predominaram. Espécies de *Aspergillus* foram mais frequentes no inverno e de *Fusarium*, no inverno e outono. Nos locais com alto índice de poluição ocorreu uma diminuição de fungos esporulados e um aumento de fungos não esporulados e leveduras como *Candida* sp e *Rhodotorula* sp (SOARES et al, 1997).

### 1.2.3. Medidas de controle de infecção

A redução na presença de esporos fúngicos no ar ambiental é imprescindível em unidade de tratamento de pacientes imunossuprimidos e pode ser obtida com a utilização de filtros de alta eficiência de partícula de ar (HEPA), assim como a limpeza terminal do quarto do paciente com desinfetantes após transferência do mesmo. Para entrar no quarto dos pacientes, os médicos, paramédicos e visitantes devem estar com vestimentas limpas, as mãos lavadas com sabonetes anti-sépticos e usando máscara se o contato com o paciente for prolongado ou se estiver com sintomas respiratórios (IWEN et al, 1994). Frutas frescas, vegetais e plantas não deixar inserir no quarto do paciente. Os pacientes devem permanecer isolados até que a neutropenia retorne a 500 células/ mL. Quando for necessária a saída do paciente para exames, ele deve fazer uso de uma máscara (IWEN et al, 1993), (LOO et al, 1996).

## 1.3. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS

A grande concentração de esporos fúngicos no ambiente natural do homem é responsável pela colonização do pulmão de 62,2% dos indivíduos (LASS-FLORL et al, 1999). Por sua vez, inúmeros fungos com baixa virulência e que são considerados

contaminantes ou colonizantes, são patógenos emergentes associados a significativa morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos (VARLIVARIAN et al 1993). Pacientes sob altas doses de quimioterapia, associada a longos períodos de neutropenia, apresentam maior risco de desenvolver aspergilose invasiva (IWEN et al, 1994)

De modo geral, o processo de quimioterapia provoca morte celular na pele desde a boca até os intestinos, o que fornece uma superfície colonizável por bactérias e fungos potencialmente patogênicos (TRABASSO, P., 2001).

A infecção por *Aspergillus* sp ocorre em 4,5% dos pacientes independentemente do tipo de transplante de medula óssea realizada e apresenta taxa de mortalidade de 84%, de acordo com o local de infecção avaliado. A aspergilose pulmonar invasiva é uma das enfermidades mais severas para pacientes imunossuprimidos, particularmente para os submetidos a transplante de medula óssea. Em transplante do tipo alogênico, ocorre API em 20% do pacientes sendo dentre estes, uma das maiores causas de mortalidade (CHAZATET et al, 1998). (SALERMO et al, 1998).

A aspergilose cutânea ocorre com menos frequência e envolve locais como acesso ao catéter intravenoso, locais com inoculação traumática, locais associados com queimaduras ou feridas cirúrgicas. Em 85% dos casos relativos a câncer, a aspergilose cutânea estava associada com instalação de catéter intravenoso e prancha de braço. A neutropenia recente é um importante fator de risco para aquisição de aspergilose cutânea em pacientes transplantados de medula óssea (Van BURIK et al, 1998).

A reação do enxerto contra o hospedeiro (DECH) é uma situação peculiar do TMO (CONOVER, W.J., 1971). Pacientes com DECH têm um risco aumentado de desenvolvimento de processos infecciosos por bactérias, fungos e protozoários. Nestes casos, a imunossupressão causada pela doença é reforçada pelo seu tratamento com imunossupressores (POWLES et al, 1978).

As complicações infecciosas e a mortalidade no período precoce dos TMO alogênicos são maiores do que as que ocorrem nos TMO autólogos, visto que estes, não apresentam Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro e têm menor período de neutropenia (WINGARD, J.R., 1999).

O segundo período, chamado pós-enxertia precoce ou intermediário, compreende o segundo e terceiro mês após o transplante, onde espécies de *Aspergillus* e *Candida* são as causas mais frequentes de infecção fúngica (TRABASSO, P., 2001).

Enquanto as espécies do gênero *Aspergillus* estão comumente associadas com a forma invasiva da doença, espécies do gênero *Penicillium* raramente causam infecção (LACAZ et al, 1991), (VARLIVARIAN et al, 1993).

Espécies de *Fusarium* são fungos oportunistas em pacientes com doença de base como leucemia, câncer e AIDS (SUGIURA et al, 1999). Estas infecções se limitavam a micoses superficiais, mas recentemente o número de infecções disseminadas tem crescido, particularmente em pacientes imunossuprimidos (CASTELLÁ et al, 1999). *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *F. chlamydosporum* e *F. verticillium* têm sido causa de infecção disseminada (RAAD, I., 1995), (VARLIVARIAN et al, 1993). A maioria das infecções oportunistas causadas por *Fusarium* spp ocorrem em pacientes com doenças malignas hematológicas e apresentam um prognóstico desfavorável com, taxa de letalidade de 57% (ROMBAUX et al, 1996).

Culturas positivas, sem evidências de enfermidade invasiva, podem ser decorrentes de colonização ou contaminação (YUEN et al, 1997). A presença de pelo menos uma cultura de vigilância positiva: swab nasal, swab oral ou urina, caracteriza colonização (BOLANOWSKI et al, 2000).

## 1.4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

### 1.4.1. Espécimes clínicos

Segundo a maioria dos autores, a investigação de colonização fúngica é realizada em coletas semanais de swab nasal, swab oral, swab perianal, swab vaginal e fezes dos pacientes hematológicos e transplantados (GUIOT et al, 1994), (YUEN et al, 1997). Em casos de suspeita de infecção fúngica, são coletados outros espécimes clínicos mais específicos, como: lavado broncoalveolar, escarro, biopsia de pulmão, drenagem dos sinus, sangue, entre outros (GOULD, D., 1991), (GUIOT et al, 1994).



Na Unidade de Transplante de Medula Óssea do HC-UNICAMP são coletados semanalmente, de todos os pacientes, swabs de região anal, cavidade oral, vaginal e escarro, denominados de “culturas de vigilância” para bactérias e fungos (TRABASSO, P., 2001).

#### **1.4.2. Isolamento e identificação**

A comprovação de infecção fúngica é determinada pela cultura e exame histológico de biópsia ou necrópsia de tecido, ou cultura e exame direto do material clínico (YUEN et al, 1997).

Embora a morfologia da colônia possa ser útil em alguns casos para a identificação de um fungo filamentosos, existe uma variação dependente das condições de culturas e do tipo de meio utilizado, (KONEMAN et al, 1993). O crescimento da cultura fúngica é dependente da quantidade do inóculo, do meio de cultura usado e da temperatura de incubação (KNOW-CHUNG et al, 1992). Portanto é necessário um exame microscópico antes de se efetuar uma identificação definitiva. A identificação e a classificação dos fungos depende principalmente das diferenças morfológicas de suas estruturas reprodutivas (KONEMAN et al, 1993). As características dos esporos são a base para esta identificação. Muitos isolados obtidos de espécimes clínicos perdem o poder de esporular devido a terapia antimicótica; deste modo, esses isolados precisam primeiramente serem cultivados em um meio nutricional que estimule a esporulação, para que possam ser identificados (KNOW-CHUNG et al, 1992).

A montagem direta e a técnica de microcultivo em lâmina, são os métodos mais utilizados para o exame microscópico de fungos filamentosos. Em cada caso, uma porção da colônia coletada, com o auxílio de agulhas com pontas afiladas, é colocada em contato com uma gota de lactofenol azul algodão sobre uma lâmina de microscopia. Coloca-se uma lamínula sobre a montagem e pressiona-se suavemente para dispersar a amostra de forma mais homogênea no líquido de montagem e examinar ao microscópico. Infelizmente, a natureza delicada de muitos fungos filamentosos não permite observar as características dos

esporos. Quando este método não permitir estabelecer uma identificação precisa é recomendada a técnica de microcultivo em lâmina. Esta permite a obtenção de preparações de alta qualidade, nas quais a disposição e estrutura dos esporos permanecem magnificamente (KONEMAN et al, 1993). Os testes bioquímicos não são muito úteis para a identificação de fungos filamentosos. Poucos são os testes utilizados. Recentes avanços nas técnicas de biologia molecular, possibilitam o desenvolvimento de “kits” que podem identificar os fungos antes que eles esporulem ou que cresçam suficientemente para a realização de testes com antígenos. São métodos bastante sensíveis, e podem ser realizados em colônias com menos de 1 cm de diâmetro (KNOW-CHUNG et al, 1992).

#### **1.4.3. Avaliação de potencial patogênico**

A patogenicidade dos fungos oportunistas é resultante de um conjunto de aspectos biológicos específicos, tais como o pequeno tamanho dos esporos em alta concentração no ar, facilitando a sua inalação, assim como a capacidade de germinar e crescer a temperaturas maiores que 37°C, sem exigir nenhuma nutrição específica (DEBEAUPUIS et al, 1997).

A maioria dos pacientes são infectados com uma única cepa de *Aspergillus fumigatus*, sendo que numerosas colônias estão presentes no ambiente hospitalar. Estes dados sugerem que alguns isolados de *Aspergillus fumigatus* devem ser mais patogênicos que outros (Aufauvre Brown, A., 1998).

Outras formas de testar a virulência das cepas é realizada por alguns autores em animais de experimento (Aufauvre Brown, A., 1998)

### **1.5. TRATAMENTO E PROFILAXIA**

O aumento da variedade de patógenos associados com infecções fúngicas graves não tem encontrado correspondência com o número de agentes antifúngicos disponíveis para tratamento. Entre os mais importantes grupos de agentes antifúngicos,

estão os compostos que interagem com a formação do ergosterol como os imidazólicos: miconazol, cetoconazol e os triazólicos: fluconazol e itraconazol. Estes inibidores da biossíntese do ergosterol, trazem como consequência alterações na fluidez e permeabilidade da membrana citoplasmática do fungo. Na célula fúngica íntegra, a biossíntese do ergosterol envolve a participação da enzima 14  $\alpha$ - demetilase, que é dependente do citocromo P-450 (ALVES et al, 2000). A 5-flucitosina é convertida em fluouracil pela citosina-desaminase, sendo este um potente inibidor da timidilato-sintetase. Esta inibição resulta em morte celular (ZAITZ et al, 1998).

Os antifúngicos poliênicos, anfotericina B e nistatina, interagem com a membrana citoplasmática do fungo, e especialmente nos sítios contendo o ergosterol danificando as funções de barreira da mesma. Dependendo da dose, ocorrerá apenas alteração da permeabilidade com alterações na nutrição ou a formação de um “poro” por onde escoará o conteúdo intracelular do fungo, levando-o a morte (ALVES et al, 2000).

A anfotericina B e os derivados azólicos, como fluconazol e itraconazol, são as drogas de primeira escolha para o tratamento das infecções fúngicas graves. Anfotericina B é eficiente, não somente contra agentes etiológicos de micoses endêmicas, mas também contra as micoses oportunistas (DRUTZ, D.J., 1987). É a droga que apresenta os melhores resultados *in vivo* (WOODS et al, 1988) e, mesmo assim, o sucesso no tratamento é limitado. Somente 34% dos pacientes apresentam uma resposta favorável (VERWEIJ et al, 1998). De modo geral, as reações agudas que acompanham a administração intravenosa de anfotericina B incluem: febre, calafrios, e hipotensão, nos casos onde é verificada uma tolerância ao efeito colateral agudo durante a terapia. Os efeitos colaterais crônicos, costumam resultar de nefrotoxicidade da droga.

A administração prolongada de flucitosina, pode resultar em uma supressão da medula óssea, perda dos cabelos e anormalidades da função hepática (DEBEUPIUS et al, 1997).

O uso do miconazol é restrito a micoses superficiais. Por sua vez, o cetoconazol, itraconazol e fluconazol, apresentam um amplo espectro no tratamento de infecções superficiais e sistêmicas. Embora, apresentem variações na farmacocinética,

Ceto, Fluco e Itra estão disponíveis para administração oral, na qual a absorção é afetada pela acidez gástrica e por ingestão de alimentos. Por outro lado, o fluconazol também pode ser administrado via endovenosa (SHEEHAN et al, 1999).

Entre os azóis o cetoconazol é o mais tóxico quando administrado em doses terapêuticas, inibindo a síntese de testosterona e cortisol. A terapêutica com azóis pode resultar em elevações assintomáticas das provas de função hepática e raros casos de hepatite (JAWETZ et al, 1998).

Limitações na eficácia e na tolerância dos agentes antifúngicos em uso, têm estimulado a pesquisa de novas drogas que possam ser mais eficientes para o tratamento de pacientes com infecções por fungos filamentosos ou leveduras (ESPINEL-INGROFF et al, 1998).

Novos derivados azólicos e triazólicos estão sendo atualmente desenvolvidos por diversas indústrias farmacêuticas. Três desses agentes, voriconazol, ER 30346, e D 0870 são derivados do fluconazol e, SCH 56592, é uma hidroxila análoga ao itraconazol. Com exceção do D 0860, UR 9746, e UR 9751, os quais apresentam pouca atividade contra *Aspergillus* spp, os novos derivados triazólicos possuem amplo espectro de atividade antifúngica, sendo agentes promissores no tratamento de infecções superficiais e sistêmicas causadas por patógenos fúngicos oportunistas e endêmicos (SHEEHAN et al, 1999).

Recentes estudos *in vitro* têm demonstrado a eficácia do voriconazol contra certos fungos filamentosos oportunistas e fungos dimórficos (ESPINEL-INGROFF et al, 1998). O voriconazol e a anfotericina B mostraram ser mais ativos que o itraconazol para espécies de *Fusarium solani*, e sugerindo uma ação fungicida do voriconazol contra espécies de *Aspergillus fumigatus* (JOHNSON et al, 1998).

Triazol oral também derivado do fluconazol o ER 30346 possui uma potente afinidade de ligação ao P-450 de leveduras, de forma similar ao itraconazol. Apresenta também amplo espectro de atividade contra *A. fumigatus* e *Cryptococcus neoformans* e outros (SHEEHAN et al., 1999).

SCH 56592 apresenta atividade de amplo espectro contra patógenos fúngicos oportunistas primários incluindo *Candida* spp, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* spp. e outros patógenos menos comuns como: dermatófitos, zygomycetos, e outros (SHEEHAN et al, 1999).

T 8581 é um triazol, aproximadamente, 20 vezes mais solúvel em água do que o fluconazol e pode ser particularmente usado, em altas doses, na terapia parenteral (SHEEHAN et al, 1999).

A atividade do UR 9746 e UR 9751 foi comparada à do fluconazol frente a *Aspergillus* spp pelo método padronizado pelo NCCLS e, a princípio, apresentaram baixa atividade (SHEEHAN et al, 1999).

Fusariose invasiva não responde bem à terapêutica antifúngica. Espécies de *Fusarium* são resistentes à quimioterapia disponível, sendo seu diagnóstico rápido, de extrema importância. Os fatores que influem na patogenicidade incluem a produção de micotoxinas e a termotolerância SUGIURA et al, 1999).

O prognóstico para infecções por fungos demáceos como *Curvularia*, *Bipolaris*, *Exserohilum* e *Alternaria* é pobre em pacientes imunocomprometidos. A localização da lesão é importante, tanto para o diagnóstico como para o tratamento. Para estes agentes a atividade da anfotericina B é limitada e a terapia com itraconazol deve ser recomendada com sérias considerações. Algumas cepas que envolvem estas infecções podem ser suscetíveis a flucitosina (KNOW-CHUNG et al, 1992), (VARLIVARIAN et al, 1993).

Em estudos prospectivos, o fluconazol mostrou eficiência na prevenção de candidíase em pacientes transplantados de medula óssea, no entanto não foi efetiva contra infecções por *Aspergillus* spp. e outros fungos. Foi observada diminuição de suscetibilidade ao itraconazol em algumas cepas de *Aspergillus fumigatus*. Efeito acumulativo de antifúngicos azóis, tem sido identificado como a causa de resistência pós tratamento, de isolados de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*. *C. glabrata* adquire rapidamente suscetibilidade reduzida ao fluconazol, e *C. krusei* é considerada resistente a este antifúngico. A resistência a anfotericina B não é observada (SHEEHAN, D.J., 1999).

Em estudo realizado por Pauw, B.E e cols, 1997. o uso de sprays e aerossóis de anfotericina B aparentemente foi eficaz, mas o número de pacientes avaliados foi insuficiente para se obter uma conclusão definitiva .

Conforme protocolo desenvolvido na Unidade de Transplante de Medula Óssea do HC-Unicamp, todos os pacientes recebem fluconazol 400mg/dia VO (cápsulas) como profilaxia para infecções fúngicas. Se o paciente apresentar mucosite, grau 3 ou 4, a administração passa a ser IV. Anfotericina B é associada nos casos em que não há defervescência da febre após 96h de tratamento, com antibacterianos. Nos casos sem identificação clínica, radiológica ou microbiológica de IFI, assim como nos casos de candidíase superficial, é empregada a dose de 0,5mg/kg/dia. Nos casos de IFI profunda, são utilizados 1 mg/kg/dia. A dose acumulativa, atingida em infecção não invasiva, foi de 500mg e, em Aspergilose invasiva, de 3000 a 4000 mg (TRABASSO, P., 2001).

A literatura já dispõe de alguns relatos a respeito de testes de suscetibilidade *in vitro*, no entanto, é comum a administração empírica de agentes antifúngicos, como anfotericina B, em pacientes com suspeita de aspergilose invasiva, devido às dificuldades diagnósticas. *Aspergillus* spp. são geralmente suscetíveis a anfotericina B *in vivo*, no entanto o teste de suscetibilidade *in vitro* ainda não está padronizado (VERWEIJ et al, 1998).

Recentemente foi desenvolvido o método para avaliar a atividade dos “azólicos” contra *Aspergillus fumigatus* (VERWEIJ et al, 1998), no entanto os estudos ainda não são suficientes para estabelecer protocolos genéricos, ou avaliar se já está ocorrendo o aparecimento de cepas resistentes à terapia empírica ou profilática preconizada até o momento (DENNING et al, 1997).

## 1.6. TESTES DE SUSCETIBILIDADE

Nas últimas décadas, mudanças expressivas na epidemiologia das micoses humanas foram observadas. Há consenso na literatura sobre o aumento na incidência de micoses sistêmicas, assim como mudança no espectro de microrganismos causadores destas



micoses. Em adição, novas opções terapêuticas à anfotericina B foram desenvolvidas, e há relatos da resistência de fungos às drogas disponíveis comercialmente (SIDRIM & MOREIRA, 1999). Apesar do baixo número de infecções causadas por fungos filamentosos, em comparação às infecções causadas por leveduras, a determinação da CIM é de extrema importância para os pacientes com infecção por fungos filamentosos. Tanto para orientação ao tratamento, geralmente difícil e frequentemente sem sucesso, assim como para a avaliação de novos agentes antifúngicos (DRUTZ, D.J., 1987).

### **1.6.1. Histórico**

Em 1982, o National Committee for Clinical and Laboratory Standards (NCCLS) organizou um sub-comitê para padronização do teste de suscetibilidade a antifúngicos para leveduras, pelo método de microdiluição em caldo. Em, 1985, foi liberado um relatório sobre o teste de suscetibilidade para leveduras, ainda sujeito a modificações (DRUTZ, D.J., 1987).

Os fatores pré-analíticos mais relevantes, foram estudados e, em 1992, foram definidos e publicados no documento M27-P(proposto), depois adaptado para M27-T(tentativa) (SHEEHAN et al, 1999).

Em 1997 foi liberado o documento NCCLS M27-A, referente ao teste de suscetibilidade a antifúngicos pelo método de macrodiluição e microdiluição em caldo para leveduras (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL OF LABORATORY STANDARD M27-A, 1997) (SHEEHAN, D.J., 1999) e, em 1998 foi editado o NCCLS M38-P, específico para formas de conídios de fungos filamentosos (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL OF LABORATORY STANDARD M38-P, 1998).

O método de microdiluição em caldo é uma miniaturização do método de macrodiluição (CORMICAN & PFALLER, 1996).

### 1.6.2. Variáveis pré-analíticas

Muitas das variações entre laboratórios, com relação a CIM, podem ser devidas a variações metodológicas. Tal como no teste de suscetibilidade para bactérias, a CIM é dependente do tamanho, da preparação do inóculo, da composição e pH do meio de cultura, do tempo e temperatura de incubação (CORMICAN & PFALLER, 1996).

- **Meio de cultura**

O meio de cultura a ser empregado em testes de suscetibilidade a antimicrobianos, deve ser capaz de suportar crescimento adequado dos microrganismos a serem avaliados sem, no entanto, causar qualquer interação com a atividade das drogas utilizadas no experimento. Meios de composição completamente definida, para viabilizar a reprodutibilidade dos ensaios, têm sido preconizados (SIDRIM & MOREIRA, 1999). Concentrações de glicose podem influenciar no crescimento dos fungos e consequentemente, no teste de suscetibilidade. Tal avaliação foi realizada com dermatófitos que cresceram pouco em meio de cultura com 0.2% de glicose, apresentando melhor crescimento em meio com 2.0% de glicose (CORMICAN & PFALLER, 1996). De modo geral, meios líquidos interferem menos na ação das drogas antifúngicas do que meios sólidos (ESPINEL-INGROFF, A., 1998).

PFALLER et al (1990) conduziram estudo multicêntrico comparando testes realizados em meios quimicamente definidos, incluindo Yeast Nitrogen Base (Difco Laboratories, Detroit, MI), RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), Synthetic Amino acid Medium-Fungal (American Biorganics, North Tonawanda, NY) e High Resolution (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England). O mais alto nível de concordância entre laboratórios, considerando tempo e temperatura de incubação, foi de 87% observado com meio RPMI 1640 (SIDRIM, J.J., 1999), um meio quimicamente definido, livre de macromoléculas.

Em 1992 o NCCLS preconizou a utilização do meio RPMI 1640, tamponado com MOPS, como meio padrão para testes com as diferentes classes de antifúngicos (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL OF LABORATORY STANDARD M38-P, 1998).



## • Inóculo

A concentração do inóculo é um fator importante para padronização do teste (ESPINEL-INGROFF, A., 1998). O tamanho do inóculo é crítico quando se avalia flucitosina e anfotericina B. Para o itraconazol, o tamanho do inóculo está diretamente relacionado às espécies em estudo (CORMICAN & PALLER, 1971). Para investigar a influência que os diferentes tamanhos de inóculo causam na CIM, foram realizados testes com anfotericina B, 5-flucitosina, itraconazol e miconazol para isolados clínicos *A. fumigatus*, *A. flavus*, *Rhizopus arrhizus*, *P. boydii* e *Fusarium solani* nas seguintes concentrações:  $1 \times 10^2$  a  $5 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$  a  $5 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  a  $5 \times 10^4$ , e  $1 \times 10^5$  a  $5 \times 10^5$  UFC/mL. Anfotericina B apresentou uma diferença mínima da CIM em relação aos diferentes tamanhos de inóculo, para todas as espécies de fungos, com exceção do *P. boydii*. Para 5-flucitosina., houve uma diferença significativa nos valores da CIM para todas as espécies de *Aspergillus* spp nas concentrações de  $10^2$  e  $10^4$  UFC/mL, Para o miconazol, que só foi avaliado para *P. boydii*, não foi observada nenhuma diferença da CIM. O aumento dos valores da CIM, em relação ao itraconazol, mostraram ser dependentes da espécie do microrganismo. Em resumo, o tamanho ideal do inóculo para determinação da CIM para fungos filamentosos, depende das características dos microrganismo e também do tipo de antifúngicos testados (GEHRT et al, 1995).

Até o presente, o tamanho do inóculo para conídios, foi estipulado em  $0.4 \times 10^4$  a  $5.0 \times 10^4$  UFC/ml pelo NCCLS (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL OF LABORATORY STANDARD M38-P, 1998) por um acordo entre laboratórios que identificaram estas como condições ideais, em 92% dos casos (ESPINEL-INGROFF et al, 1998).

Outros estudos avaliaram diferentes inóculos para fungos filamentosos, preparados de forma a conter: somente conídios, conídios e hifas, fragmentos de hifas e conídios germinados. A utilização de suspensões de conídios e de esporangióforos é conveniente, mas a forma parasitária da maioria desses organismos é a hifa. Seria ideal, a elaboração de um método para suspensão de fragmentos de hifa que fosse reprodutivo. A princípio, valores da CIM para formas de conídios não foram superiores a 4 em comparação com inóculo na forma de hifas (ESPINEL-INGROFF et al, 1998).

- **Tempo de incubação**

O tempo de incubação interfere significativamente nos valores da CIM, tanto para drogas fungistáticas, quanto para agentes fungicidas. Para a anfotericina B, uma alteração no tempo de incubação, de 48 para 72 horas, pode aumentar em até duas concentrações a CIM (ESPINEL-INGROFF et al, 1998).

Este tempo de incubação está relacionado a características de crescimento dos microrganismos. Observou-se por exemplo que, após incubação de 24 horas, *Aspergillus fumigatus* apresentava crescimento insuficiente, com significantes diferenças nos valores da CIM para leituras de 24 a 48 horas, contudo, os valores da CIM, não mudou para as leituras de 48 e 72 horas. Assim sendo, 48 horas de incubação foram suficientes para determinar a CIM dos antifúngicos para isolados de *A. fumigatus* (MANAVATHU et al, 1996).

De modo geral, o NCCLS preconiza leitura de 21 a 26 horas para espécies de *Rhizopus*, e 46 a 50 horas, para a maioria dos fungos filamentosos oportunistas (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL OF LABORATORY STANDARD M38-P, 1998).

Estudos realizados durante a padronização do teste de suscetibilidade para leveduras (documento M27-P), demonstraram que, o período de 48 horas de incubação é um pouco melhor que 24 horas. Esta diferença é atribuída ao pequeno numero de cepas que aumentam os valores da CIM em 48 horas. Entretanto este dado não apresenta nenhuma correlação com a resposta clínica do paciente (CORMICAN & PFALLER, 1996).

- **Temperatura de incubação**

Vários estudos foram realizados, na tentativa de padronizar a temperatura de incubação (CORMICAN & PFALLER, 1996), (ESPINEL-INGROFF et al, 1998), (PUJOL et al, 1997). Utilizando-se temperaturas de 30°C e 35°C, com a finalidade de determinar a CIM de isolados de *Aspergillus* spp., não puderam ser observadas variações significativas nos valores da CIM, para anfotericina B, cetoconazol, fluconazol e itraconazol (MANAVATHU et al, 1996).

Recentemente, o NCCLS preconizou 35°C para testes com qualquer dos antifúngicos (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL OF LABORATORY STANDARD M38-P, 1998).

- **Solubilidade das drogas**

Existem alguns antifúngicos com solubilidade limitada. Algumas drogas, como fluconazol, são dissolvidas em água e outras em dimetil sulfoxido (DMSO), como: anfotericina B, cetoconazol e itraconazol (MANAVATHU, E.K., 1996), (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL OF LABORATORY STANDARD M38-P, 1998).

- **Degradação das drogas**

Após longo período de incubação e/ou contato com a luz em especial, a anfotericina B, sofre degradação. Devendo portanto, os testes serem realizados no menor tempo possível e, ao abrigo da luz.

### **1.6.3. Procedimentos de leitura e interpretação dos resultados**

Diversos métodos para determinação do “ponto final” tem sido utilizados, em testes de suscetibilidade a antifúngicos. A análise espectrofotométrica tem sido usada, na observação da redução do crescimento em 20, 50 ou 70% em comparação com o controle positivo do teste. O crescimento do fungo nas cavidades da placa de microtitulação, incluindo a superfície, a lateral, pequenos grumos suspensos e os aderidos ao fundo da cavidade, sugere que a leitura do “ponto final” em espectrofotômetro deixa a desejar, em comparação com a leitura do “ponto final” a olho nu (DENNING et al, 1997).

O corante vermelho de fenol, presente no meio RPMI 1640, padronizado pelo NCCLS, não interfere na leitura (CORMICAN & PALLER, 1996).

Ainda não há dados para interpretação das CIM, para classificação dos patógenos como sensíveis ou resistentes. Testes confiáveis, para avaliação dos níveis de antifúngicos nos diferentes fluidos corpóreos, ainda não estão bem estabelecidos portanto, a

medição de sua concentração em circunstâncias clínicas é raramente garantida (DRUTZ, D.J., 1987). A literatura relata que os níveis séricos de anfotericina B variam entre 0.5 a 2,0 µg/ml (DICIONÁRIO DE ESPECIALIDADE FARMACÊUTICA, 98/99). Estudos sugerem que, parte da droga seja armazenada no fígado, rim e baço e, uma pequena porção de cada dose, excretada na bile. A concentração urinária da droga é muito baixa. A flucitosina, por sua vez, quase que completamente absorvida pelo trato gastrointestinal, é excretada pela urina, em altas concentrações (DRUTZ, D.J., 1987). Nível sérico da droga 30,0 a 40,0 µg/ml (DICIONÁRIO DE ESPECIALIDADE FARMACÊUTICA, 98/99). A absorção do cetoconazol depende da acidez gástrica, portanto, em pacientes com alterações desta acidez, como aqueles que fazem uso de antiácidos, o cetoconazol pode não ser absorvido em concentrações terapêuticas. Os níveis séricos são proporcionais à dose ingerida, sendo em média 3.5µg/ml, mas raramente excedem 15µg/ml (DRUTZ, D.J., 1987). Os níveis séricos aproximados para itraconazol e fluconazol são de respectivamente 2.0 e 6,7 µg/ml (DICIONÁRIO DE ESPECIALIDADE FARMACÊUTICA, 98/99) (KAMI et al, 2001).

Deste modo, a interpretação dos “breakpoints” da CIM não foi estabelecida para agentes antifúngicos. Alguns autores têm proposto “breakpoints” para fluconazol e cetoconazol baseados nos poucos dados disponíveis. Uma quantidade maior de dados, correlacionando resposta clínica com a CIM *in vitro* são necessários (CORMICAN et al, 1996).

Por causa da incerteza em relação a interpretação, ainda há recomendação para que o teste de susceptibilidade a antifúngico não seja realizado rotineiramente para fungos filamentosos. A menos que, o resultado do teste *in vitro* seja útil na determinação de casos difíceis (CORMICAN et al, 1996).

#### **1.6.4. Correlação *in vivo* e *in vitro***

Ainda é extremamente difícil estabelecer as correlações entre CIM e resposta clínica. A situação parece ser mais razoável para leveduras do que para fungos filamentosos, talvez pelo fato da morfologia das leveduras facilitar sua quantificação, padronização e uniformidade do inóculo (DRUTZ, D.J., 1987).

Durante os últimos anos, consideráveis progressos têm sido alcançados na implementação da reprodutibilidade dos testes de susceptibilidade *in vitro* para leveduras e fungos filamentosos (FLORL et al., 1998). Porém, os testes para estes últimos ainda têm sido menos estudados, que para leveduras. Estudos, *in vitro* assim como a padronização do inóculo na forma conidial, têm progredido. No entanto, a baixa incidência de infecções por estes patógenos filamentosos oportunistas, dificulta uma comparação prospectiva da CIM do agente, com a resposta clínica ao tratamento. Por esta razão muitos estudos tem sido realizados com animais de experimento (ODDS et al, 1998).

Em modelo animal, a avaliação da suscetibilidade a anfotericina B para espécies de *Aspergillus* spp., demonstrou confiabilidade devido a baixa variabilidade dos resultados analisados, e a boa reprodutibilidade dos valores da CIM, das cepas isoladas de diferentes espécimes clínicos (FLORL et al, 1998).

A evolução do quadro clínico para infecções com *Aspergillus* sp, depende da suscetibilidade dos isolados à anfotericina B. Altos valores da CIM para isolados de *Aspergillus* sp, resultaram numa menor sobrevida dos pacientes, enquanto que, valores baixos da CIM para o mesmo agente, resultaram numa maior sobrevida dos pacientes. *A. terreus* apresentou altos valores da CIM contra a anfotericina B e portanto, baixa sobrevida (FLORL et al, 1998).

Para que os testes, de suscetibilidade *in vitro* sejam úteis clinicamente, os resultados deveriam prover, um prognóstico confiável à terapêutica de infecções humanas. Entretanto, até o presente, a correlação entre resposta clínica e testes de suscetibilidade *in vitro* é limitada. Espera-se com o avanço da padronização dos métodos, a realização dos testes de suscetibilidade em larga escala, a fim de facilitar os estudos de correlação, podendo o teste ser utilizado no acompanhamento do tratamento (CORMICAN et al, 1996).

## 1.7. PERSPECTIVAS

O Hospital de Clínicas da UNICAMP, atende a um grande número de pacientes hematológicos submetidos ou não ao transplante de medula óssea e portanto, altamente suscetíveis às infecções fúngicas oportunistas.

Segundo TRABASSO, 2001 dentre os 115 pacientes submetidos a transplante de medula óssea de janeiro de 1997 a dezembro de 1999 no HC da Unicamp, 17,4% faleceram durante a internação. Na avaliação do dia +100, 21,7% haviam falecido sendo um dos fatores relacionados ao óbito, para os receptores de enxerto alogênico, infecção fúngica (TRABASSO, P., 2001).

Na unidade de TMO da UNICAMP, a colonização por fungos esteve presente em 45% dos pacientes. Destes, 17% desenvolveram infecção fúngica invasiva no decorrer da internação, 67% dos pacientes tiveram colonização em oro ou nasofaringe, e 32% em região perianal ou uretral. A proporção de indivíduos com colonização por fungos foi maior entre receptores de enxerto alogênico (52,7%) do que entre receptores de enxerto autólogo (16,7%). Foram diagnosticadas 15 infecções fúngicas profundas no período de janeiro de 1997 a dezembro de 1999, 80% em receptores de enxerto alogênico e 20% em receptores de enxerto autólogo (TRABASSO, P., 2001) .

Segundo dados retrospectivos do Laboratório de Microbiologia -HC - Unicamp, o número de “culturas de vigilância” positivas para fungos filamentosos, vem aumentando gradativamente, representando 3,1% em 1996, 5,8% em 1997 e 8,7% em 1998 (dados não publicados).

No entanto, não há até o momento dados numéricos relativos à prevalência das diferentes espécies de fungos filamentosos isoladas a partir de espécimes clínicos destes pacientes, como colonizantes, ou patógenos. Não se sabe qual a composição da microbiota fúngica do ambiente hospitalar, seu potencial patogênico, nem tampouco o padrão de suscetibilidade dos microrganismos, frente aos antifúngicos em uso na Unidade.



## ***2. OBJETIVOS***

- Isolar fungos filamentosos a partir de espécimes clínicos coletados nos protocolos rotineiros de investigação diagnóstica e nos protocolos de microbiota de pacientes com malignidades hematológicas e transplantados de medula óssea.
- Identificar e manter todos os fungos filamentosos isolados destes pacientes.
- Avaliar em diferentes períodos, durante um ano, as espécies de fungos filamentosos presentes no ar ambiental da unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da Unicamp.
- Avaliar o potencial patogênico das cepas isoladas dos pacientes e do ambiente.
- Avaliar a suscetibilidade aos antifúngicos dos microrganismos potencialmente patogênicos isolados, tanto dos pacientes quanto do ambiente.
- Correlacionar as espécies de fungos isoladas dos pacientes e do ambiente





### ***3. MATERIAL E MÉTODOS***

O trabalho experimental, em sua maior parte, foi desenvolvido no Setor de Micologia do Laboratório de Microbiologia da Divisão de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da UNICAMP. A coleta ambiental foi realizada na Unidade de Transplante de Medula Óssea com filtração HEPA nos quartos. A padronização dos testes de suscetibilidade, assim como a identificação de algumas cepas foram realizadas no Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicosis, Chiba University, Chiba- Japão.

### **3.1. ESPÉCIMES CLÍNICOS**

De acordo com os protocolos de procedimento da Unidade de Transplante de Medula Óssea, e enfermaria de hematologia, foram coletados pela equipe de enfermagem, swab de orofaringe, swab de nasofaringe, swab anal, urina, lavado broncoalveolar (BAL) e escarro, no período de novembro de 1998 a junho de 2000. O processamento das amostras foi realizado nos Setores de Micologia e Bacteriologia do Laboratório de Microbiologia da Divisão de Patologia Clínica-HC- Unicamp.

### **3.2. MICROBIOTA FÚNGICA AMBIENTAL**

As coletas foram realizadas no período de um ano, março de 1999 a março de 2000, para avaliação das diferentes estações.

A avaliação da micota da Unidade de TMO foi realizada pelo método gravitacional por sedimentação em placa GASP (IWEN, P.C., 1994). Placas contendo ágar Sabouraud dextrose foram abertas e ficaram expostas, por 60 minutos, nos diferentes locais da Unidade. As coletas foram realizadas semanalmente, nos quartos e banheiros dos pacientes e, quinzenalmente, nos corredores, cozinha, sala de reuniões, enfermaria, expurgo e sala de limpeza, um a dois dias antes da limpeza terminal.

---

\* Os reagentes e meio de cultura, cujas procedências não estão referidas no texto, foram provenientes da E. Merck, Darmstadt, Deutschland.

### 3.3. ISOLAMENTO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS

As placas expostas ao ambiente da Unidade de TMO, foram incubadas a temperatura ambiente, com observação diária do crescimento fúngico por até 7 dias. As diferentes colônias presentes, foram transferidas para tubos contendo ágar Sabouraud dextrose inclinado, incubados a temperatura ambiente. Após o crescimento dos fungos nos tubos, por 5 dias, os microrganismos foram submetidos aos testes de identificação presuntiva.

### 3.4. IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA DOS MICRORGANISMOS EM ESTUDO

Foi realizada, de acordo com metodologia clássica, já desenvolvida no Setor de Micologia do Laboratório de Microbiologia - HC-UNICAMP, utilizando a combinação de características macroscópicas e micromorfológicas com realização de exame direto da cultura, conforme Lacaz, C.A., et al, 1991.

### 3.5. TESTE DE CRESCIMENTO EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Foram submetidos ao teste de crescimento nas temperaturas de 35°C e 37°C, 84 cepas de fungos filamentosos isoladas de pacientes e, das 384 coletadas do ambiente, 167 foram submetidas ao teste. As cepas do gênero *Cladosporium* e outros fungos, demáceos ou hialinos, isolados do ambiente que, por não terem esporulado, não puderam ser identificados, foram excluídas destes testes. Para a execução do teste, cada cepa foi semeada em 2 tubos de ágar Sabouraud inclinado ou ágar batata, incubados, por até 7 dias, para avaliação de crescimento.

### 3.6. IDENTIFICAÇÃO DEFINITIVA

Apenas as 40 cepas isoladas de paciente e as 58 isoladas de ambiente que cresceram a 37°C foram encaminhadas para a identificação definitiva. As técnicas utilizadas para identificação dos fungos a nível de espécie foram: microcultivo em lâmina.(Lacaz, C.A., et al, 1991) e, para as cepas de *Aspergillus*, sempre que necessário foi

realizado o método de corte de colônia gigante em lâmina, desenvolvido pelo Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicosis, Chiba University, Chiba- Japão. Este método consiste em cortar verticalmente, com uma gilete a colônia em filetes, transferindo estes para uma placa com solução de água e sabão. Após ser lavado e separado, cada filete, é transportado para uma lâmina, coberto com uma lamínula e observado ao microscópio óptico. Tantos filetes quanto necessário, são transferidos respectivamente para uma lâmina, até que se obtenha condições ideais de observação das estruturas que possibilitam a identificação de *Aspergillus* spp até a espécie.

### 3.7. MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS

As cepas foram conservadas em frascos tipo penicilina, com tampa de borracha e lacre, contendo água destilada estéril, e em tubos com ágar Sabouraud dextrose, sempre à temperatura ambiente (DEBEAUPUIS, J.P., 1997).

### 3.8. TESTES DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS *IN VITRO*

#### 3.8.1. Microrganismos

Foram submetidas aos testes de suscetibilidade, somente cepas que se desenvolveram a 37°C, sendo 18 cepas de *Aspergillus* e 7 de *Fusarium*, isoladas dos pacientes e 18 cepas de *Aspergillus* e 5 de *Fusarium* isoladas do ambiente. Outros gêneros de fungos filamentosos que também cresceram a 37°C, foram avaliados de acordo com sua importância clínica. Sendo assim 5 cepas de *Paecilomyces* spp e 2 cepas de *Chaetomium* spp isoladas de paciente; 2 cepas de *Paecilomyces* spp e 1 cepa de *Chaetomium* sp, isoladas do ambiente também foram avaliadas.

#### 3.8.2. Inóculo

Após o crescimento fúngico de 7 dias, a 35°C, em tubos de ágar Sabouraud dextrose, o inóculo foi preparado adicionando-se 5ml de salina 0,85%, ou água destilada estéril, ao tubo até encobrir toda a colônia. Os esporos foram suavemente suspensos com

a ajuda de uma alça em anel. Transferiu-se a suspensão para um tubo estéril e aguardou-se, por 5 minutos, a separação das hifas, que tendem a sedimentar no fundo do tubo, dos esporos que, por serem mais leves, ficam no sobrenadante. O sobrenadante foi transferido para outro tubo estéril. A partir desta suspensão, foi feita uma diluição de 1/50 em água destilada estéril, realizando-se em seguida a contagem dos esporos no retículo central de uma câmara de Thoma. O objetivo foi a obtenção de um inóculo final de 0,4 a 5,0 x 10<sup>4</sup> UFC/ml, podendo-se obter este valor com a aplicação da fórmula:

$$N \times 10^4 \times 1/N = 1 \times 10^4 \text{ células}$$

onde “N” é igual ao número de células contadas e 1/N é a diluição a ser realizada (KURODA, J., et al, 2000).

### **3.8.3. Meio de cultura**

RPMI 1640 (R8755) Sigma Chemical Co., com L-glutamina e glicose sem bicarbonato de sódio tamponado com 0,165 M de MOPS (Sigma Chemical Co). O pH foi ajustado para 7.0 com NaOH 1N e a esterilização da solução foi realizada por filtração a vácuo, em filtro 0,45 µm (RSLHV02515) Millex-HV, Millipore, França. O meio pronto foi mantido sob refrigeração por até 15 dias.

### **3.8.4. Técnica de microdiluição em caldo**

Foi realizada, de acordo com o documento M38-P,1998, do NCCLS.

#### **3.8.4.1. Antifúngicos avaliados**

Anfotericina B (Bristol-Myers Squibb Incorporation, Japan), nistatina (Wako Pure Clinical Incorporation, Japan), miconazol (Mochida, Japan), cetoconazol (Yansen Kyouwa LTDA, Japan), itraconazol (Yansen Kyouwa Ltda, Japan), fluconazol (Pfizer Pharmaceutical Incorporation) e 5-Flucitosina (Wako Pure Clinical Incorporation, Japan)

#### 3.8.4.2. Solução estoque

Para sua preparação, foram pesados 12,8 mg de cada droga e dissolvidos em 1ml de DMSO. A solução foi armazenada em microtubos de polipropileno com tampa, mantidos a -5°C por até 6 meses.

#### 3.8.4.3. Preparação da placa de diluição

Foi utilizada para realizar a diluição prévia das drogas nas 10 diferentes concentrações avaliadas, que variaram, para todas as drogas, de 0,125 a 128,0 µg/mL. Foram adicionados 200 µL da solução estoque de cada droga na 1ª fileira vertical da placa de diluição, seguidos de, 100 µL de DMSO da 2ª à 12ª fileira. Procedeu-se então à diluição ao dobro, transferindo-se 100 µL da 1ª fileira para a 2ª; da 2ª para a 3ª e assim por diante até a 11ª fileira. Na 12ª fileira, por se tratar do controle positivo de crescimento, não foi adicionada a droga. Finalmente, foram acrescentados 900 µL de água destilada estéril, em todas as fileiras. O volume final em cada tubo da placa de diluição foi de 1 ml. Maiores detalhes, desta preparação podem ser observados em desenho esquemático, no Anexo 1.

#### 3.8.4.4. Cepa padrão

Para validação dos testes, foi utilizada a cepa de *Candida parapsilosis* ATCC 22019. Para cada lote de placas de microtitulação preparadas, uma foi avaliada com a cepa padrão, tendo seus resultados de CIM comparados com os valores estabelecidos pelo NCCLS M-38 P, 1998 (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL OF LABORATORY STANDARD M38-P, 1998). Não havendo concordância com estes dados, todo o lote foi desprezado.

### 3.8.4.5. Execução do teste e leitura da CIM

Foi realizado em placas de microtitulação, com fundo em “U” (estéril), para onde foram transferidos todos os componentes preparados anteriormente: 20  $\mu\text{L}$  de inóculo, 20  $\mu\text{L}$  de suspensão da droga nas diferentes concentrações e mais 160  $\mu\text{L}$  do meio de RPMI 1640. O volume final na placa de microtitulação foi de 200  $\mu\text{L}$ , resultando em uma concentração final do inóculo de  $1,0 \times 10^3$  UFC/ml. A leitura foi realizada após de 24, 48 e 72 horas de incubação, a 35°C comparando-se o crescimento de cada cavidade com a obtida no controle positivo (fileira 12). Este crescimento foi numericamente determinado, de acordo com os seguintes critérios:

- número 4: quando não houve nenhuma redução no crescimento, ou seja houve 100% de crescimento.
- número 3: quando ocorreu leve redução no crescimento, apenas 75% de crescimento em comparação ao do obtido no controle positivo.
- número 2: quando houve significativa redução no crescimento, isto é 50% de crescimento em comparação com o controle positivo do teste.
- número 1: quando ocorreu pouco crescimento, apenas 25% em comparação com o controle positivo.
- número 0 (zero): para ausência total de crescimento (NCCLS, M38-P, 1998).

Segundo o NCCLS M38-P (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL OF LABORATORY STANDARD M38-P, 1998), a CIM para a anfotericina B foi determinada, como sendo a menor concentração que permitiu crescimento igual a Zero, ou seja, nenhum sinal de crescimento fúngico.

Para os derivados azólicos e 5- flucitosina, a CIM foi determinada como sendo a menor concentração da droga que foi capaz de favorecer significativa redução de crescimento, ou seja, padrão 2.

Os resultados dos testes de suscetibilidade, pelo fato de serem experimentais, não foram liberados na papeleta de exame do paciente, tendo sido disponibilizados para o clínico responsável apenas diretamente no laboratório.

### 3.9. ANÁLISE DOS DADOS OBTIDOS

Para verificação da existência de associação entre presença ou ausência das espécies com relação as estações do ano e a patogenicidade relativa entre cepas ambientais e isoladas de espécimes clínicos, foi utilizado o teste Qui-quadrado. Quando os valores esperados foram menores que 5, utilizou-se o teste exato de Fisher (CONOVER, W.J., 1971),(SIEGEL, S., 1997).

Na comparação da variável CIM entre cepas de pacientes e ambiente, para cada antifúngico, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney (também conhecido como teste de Wilcoxon), que compara dois grupos em função da soma dos postos das observações para "n" pequenos. Em ambos os testes a diferença entre as variáveis foi considerada, estatisticamente significativa quando o p-valor do teste aplicado foi menor ou igual a 0.05 (CONOVER, W.J., 1971),(SIEGEL, S., 1997).





## ***4. RESULTADOS***

Durante o período de execução deste trabalho, foram coletados 1623 espécimes clínicos, de 349 pacientes, tendo sido isoladas 107 cepas de fungos filamentosos. Destas, 84 cepas foram selecionadas para este estudo sendo: 6 de *Aspergillus fumigatus*, 4 de *Aspergillus flavus*, 4 de *Aspergillus niger*, 2 de *Aspergillus terreus*, 6 de *Aspergillus* spp, 1 de *Aspergillus versicolor*, 7 de *Fusarium* spp, 1 de *Fusarium verticillioides*, 1 de *Fusarium solani* 21 de *Penicillium* spp, 23 de *Cladosporium* spp, 5 *Paecilomyces* spp e 1 *Curvularia* sp, 2 de *Chaetomium globosum* (Tabela 1 e Anexo 2).

**Tabela 1:** Fungos filamentosos isolados como colonizantes dos pacientes

Gênero	(n)*	% <sup>a</sup>	Espécies (n)	Porcentagem% <sup>b</sup>
<i>Aspergillus</i> spp	(23)	27,4	<i>A. fumigatus</i> (6)	26,0
			<i>Aspergillus</i> spp (6)	26,0
			<i>A. flavus</i> (4)	17,5
			<i>A. niger</i> (4)	17,5
			<i>A. terreus</i> (2)	8,7
			<i>A. versicolor</i> (1)	4,3
<i>Fusarium</i> spp	(9)	10,7	<i>Fusarium</i> spp (7)	78,0
			<i>Fusarium verticillioides</i> (1)	11,0
			<i>Fusarium solani</i> (1)	11,0
<i>Paecilomyces</i> spp	(5)	5,9	<i>Paecilomyces variotti</i> (5)	100,0
<i>Chaetomium</i> spp	(2)	2,4	<i>Chaetomium globosum</i> (2)	100,0
<i>Penicillium</i> spp	(21)	25,0		
<i>Cladosporium</i> spp	(23)	27,4		
<i>Curvularia</i> sp	(1)	1,2		

n= número de cepas isoladas

a= porcentagem do total de cepas

b= porcentagem dentro do gênero

A partir das 444 coletas ambientais realizadas nos diferentes locais da unidade de TMO (Anexo 9), resultaram no isolamento de 739 microrganismos, sendo 2 cepas de *Acremonium* spp, 31 de *Aspergillus* spp, 6 de *Alternaria* spp, 1 de *Aureobasidium* sp, 1 de *Bipolaris* sp, 9 de *Chaetomium* spp, 218 de *Cladosporium* sp, 6 de *Curvularia* spp, 5 de *Epicoccum* spp, 2 de *Exserohilum* spp, 9 de *Fusarium* spp, 13 de *Monilia sitophilia*, 6 de *Nigrospora* spp, 9 de *Paecilomyces* spp, 58 de *Penicillium* spp, 4 de *Pestalotiopsis guepinii*, 2 de *Phoma* spp, 1 de *Scopulariopsis* sp, 1 de *Sepedomium* sp, 1 de *Stachybotrys* sp e 354 cepas de fungos que não esporularam sendo 96 demáceos e 258 hialinos (Anexos 3 e 4). A partir desta avaliação, realizada no período de um ano, também foi possível demonstrar a distribuição e prevalência das espécies, nas diferentes estações do ano (Figura 1).

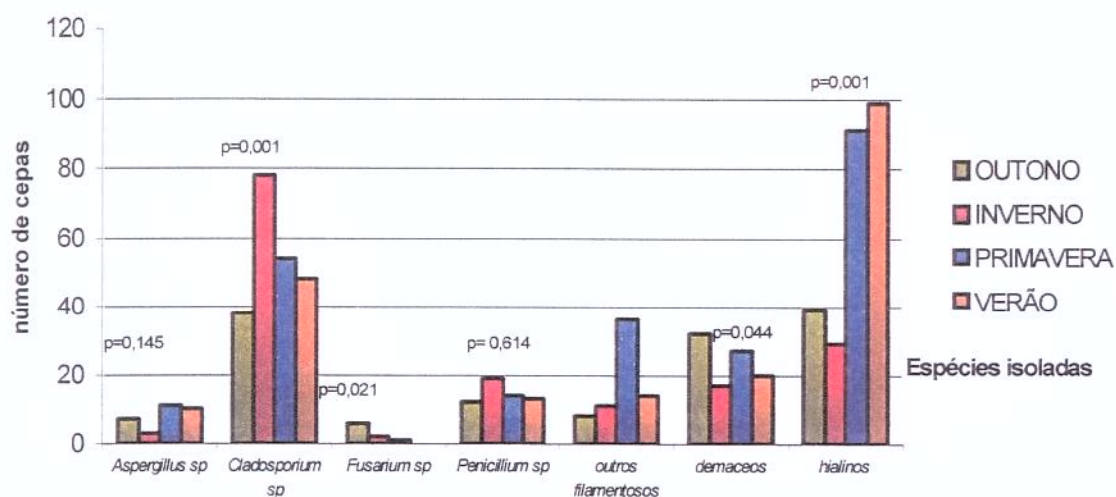
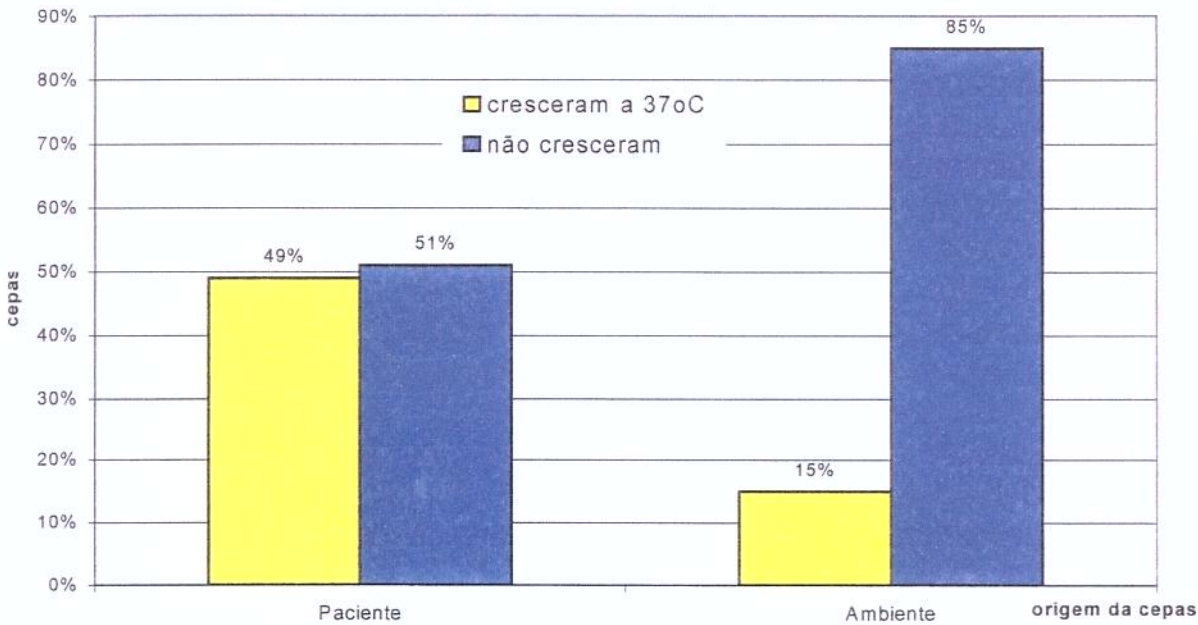


Figura 1: Percentagem de fungos filamentosos isolados do ar da Unidade de TMO do HC- Unicamp, de março de 1999 a março de 2000, distribuída de acordo com as estações do ano

Analisando-se a prevalência de cada um dos principais gêneros de microrganismos isolados, é estatisticamente significativa a presença de *Fusarium* spp no outono ( $p=0,021$ ) e *Cladosporium* spp ( $p=0,001$ ) no inverno. Fungos hialinos não esporulados estiveram mais significativamente presentes na primavera e no verão ( $p=0,001$ ), assim como os fungos demáceos não esporulados predominaram no outono ( $p=0,044$ ).

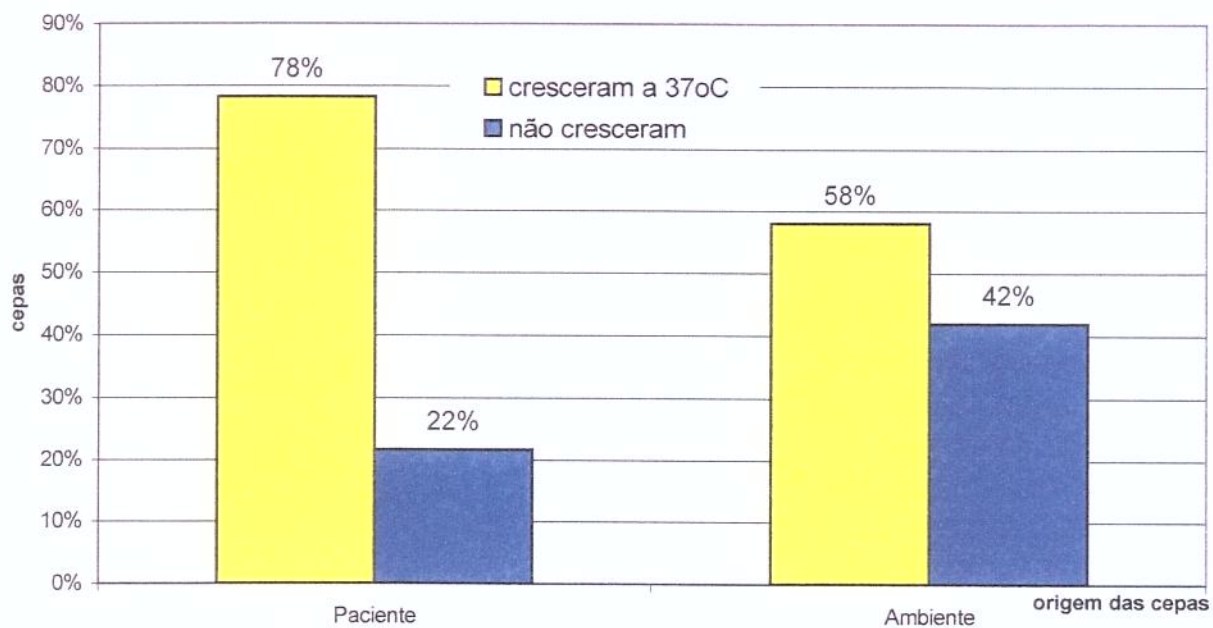
Excetuando-se as cepas ambientais de *Cladosporium* spp e as cepas de fungos que não esporularam, isoladas de ambiente, todas as 84 cepas isoladas de material clínico de pacientes e as 167 cepas ambientais, foram submetidas ao teste de crescimento a 37°C. Os resultados dos testes das cepas clínicas e ambientais podem ser observados, respectivamente nos anexos 5 e 6.

Para avaliação do potencial patogênico, foram considerados todos os fungos submetidos aos testes de temperatura. Como é possível observar na figura 2, as cepas isoladas dos pacientes, são potencialmente mais patogênicas do que as cepas ambientais (p=0,0001).

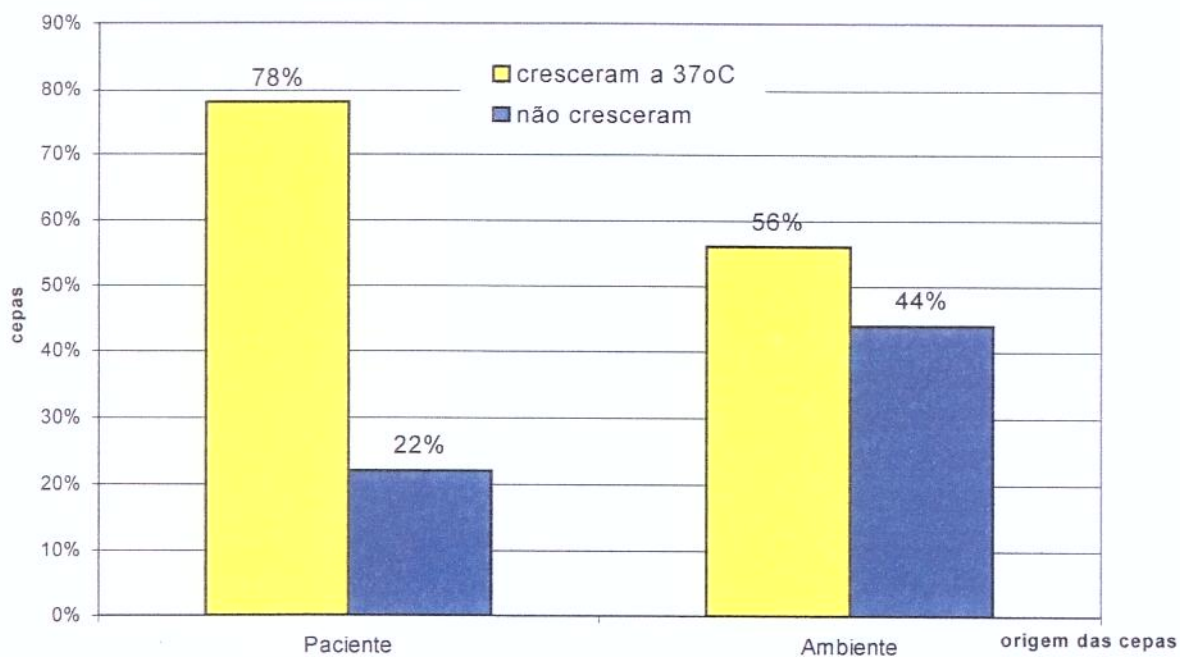


**Figura 2:** Avaliação de potencial patogênico das cepas de fungos filamentosos ambientais e isoladas de espécimes clínicos (p= 0,0001)

Analisando-se em particular, as espécies de *Aspergillus* e *Fusarium*, não houve diferença significativa entre cepas ambientais e isoladas de espécimes clínicos, quanto ao potencial patogênico (Figuras 3 e 4).



**Figura 3:** Avaliação de potencial patogênico de cepas de *Aspergillus* sp ambientais e isoladas de espécimes clínicos ( $p=0,120$ )



**Figura 4:** Avaliação de potencial patogênico de cepas de *Fusarium* sp ambientais e isoladas de espécimes clínicos ( $p=0,620$ )



Na tentativa de estabelecer uma possível relação entre os microrganismos isolados do ambiente e os colonizantes dos pacientes, foram realizados cruzamentos das datas de coleta de seus respectivos materiais. Estes dados constam na tabela 2.

**Tabela 2:** Associação entre isolados clínicos e ambientais

Amostra	Paciente	Material	Data	Local	Isolado	Amostra	Data	Isolado
clínico								
32P	ERRO 56	S.anal	08/11/99	Q 450	<i>Aspergillus</i> sp	15 A	26/10/99	<i>Aspergillus</i> sp
71P	NVG 60	SNF	06/11/99	Q 450	<i>A. niger</i>	21 A	13/09/99	<i>A. niger</i>
22P	EG 59	SNF	13/12/99	Q 454	<i>A. flavus</i>	40 A	09/12/99	<i>Aspergillus</i> sp
24P	EG 66	BAL	21/12/99	Q 454	<i>A. flavus</i>	40 A	09/12/99	<i>Aspergillus</i> sp
37P	GAM52/2B	inter-digital	13/10/99	Q 454	<i>A. versicolor</i>	40 A	09/12/99	<i>Aspergillus</i> sp
83P	AB81	Linfonodo axilar	20/03/00	Q 460	<i>C. globosum</i>	10 A	13/10/99	<i>C. globosum</i>
84P	AB82	Linfonodo epitroclear	20/03/00	Q 460	<i>C. globosum</i>	10 A	13/10/99	<i>C. globosum</i>

Os resultados dos testes de suscetibilidade a antifúngicos, para as 18 cepas de *Aspergillus* spp, 7 cepas de *Fusarium* spp, 5 cepas de *Paecilomyces* spp e 2 cepas de *Chaetomium globosum* isoladas de espécimes clínicos e 18 cepas de *Aspergillus* spp, 5 de *Fusarium* spp, 2 de *Paecilomyces variotti* e 1 de *Chaetomium globosum* do ambiente, estão respectivamente detalhados nos anexos 7 e 8.

Cepas de *Aspergillus* spp isoladas de espécimes clínicos, apresentaram CIM variando de 0,5 a 16,0 µg/mL para anfotericina B, 2,0 a >128,0 µg/mL para nistatina, 0,25 a 2,0 µg/mL para itraconazol, 0,5 a 16,0 µg/mL para cetoconazol, 0,5 a 8,0 µg/mL para

miconazol, 16,0 a >128,0 µg/mL para fluconazol e 8,0 a >128,0 µg/mL para 5-flucitosina. Por sua vez cepas de *Aspergillus* spp isoladas do ambiente, apresentaram CIM variando de 1,0 a 4,0 µg/mL para anfotericina B, 4,0 a >128,0 µg/mL para nistatina, 0,25 a 8,0 µg/mL para itraconazol, 0,5 a 8,0 µg/mL para cetoconazol, 1,0 a 16,0 µg/mL para miconazol, 32,0 a >128,0 µg/mL para fluconazol e 2,0 a >128,0 µg/mL para 5-flucitosina. (Tabela 3)

**Tabela 3:** Variação da CIM para as cepas de *Aspergillus* spp, frente aos antifúngicos avaliados

Origem (n <sup>o</sup> )♦	CIM DOS ANTIFÚNGICOS*						
	(em µg/mL)						
	AnB	Nist	Mcz	Ceto	Itra	Fluco	5-Fc
Paciente(18)	0,5-16,0	2,0->128,0	0,5-8,0	0,5-16,0	0,25-2,0	16,0->128,0	8,0->128,0
Ambiente(18)	1,0-4,0	4,0->128,0	1,0-16,0	0,5-8,0	0,25-8,0	32,0->128,0	32,0->128,0

\*AnB= anfotericina B, Nist= nistatina, Mcz= miconazol, Ceto= cetoconazol,

Itra= itraconazol, Fluco= fluconazol, 5-Fc= 5- flucitosina

♦ número de cepas avaliadas

Cepas de *Fusarium* spp isoladas de espécimes clínicos, apresentaram CIM variando de 2,0 a 8,0 µg/mL para anfotericina B, 8,0 a >128,0 µg/mL para nistatina, 0,25 a >128,0 µg/mL para itraconazol, 1,0 a 16,0 µg/mL para cetoconazol, 1,0 a 8,0 µg/mL para miconazol, 128,0 a >128,0 µg/mL para fluconazol e 1,0 a >128,0 µg/mL para 5-flucitosina. Cepas de *Fusarium* isoladas do ambiente, apresentaram CIM variando de 2,0 a 4,0 µg/mL

para anfotericina B, 4,0 a 16,0 µg/mL para nistatina, 2,0 a 128,0 µg/mL para itraconazol, 0,5 a 16,0 µg/mL para cetoconazol, 0,125 a 16,0 µg/mL para miconazol, 16,0 a >128,0 µg/mL para fluconazol e >128,0 µg/mL para 5-flucitosina (Tabela 4).

**Tabela 4:** Variação da CIM para cepas de *Fusarium* spp, frente aos antifúngicos avaliados

Origem (n <sup>o</sup> )♦	CIM DOS ANTIFÚNGICOS*						
	(em µg/mL)						
	AnB	Nist	Mcz	Ceto	Itra	Fluco	5-Fc
Paciente(7)	2,0-8,0	8,0->128,0	1,0-8,0	1,0-16,0	0,25->128,0	128,0->128,0	1,0->128,0
Ambiente(5)	2,0-4,0	4,0-16,0	0,125-16,0	0,5-16,0	2,0-128,0	16,0->128,0	>128,0

\*AnB= anfotericina B, Nist= nistatina, Mcz= miconazol, Ceto= cetoconazol,

Itra= itraconazol, Fluco= fluconazol, 5-Fc= 5- flucitosina

♦ número de cepas avaliadas

Cepas de *Paecilomyces* spp isoladas de espécimes clínicos, apresentaram CIM variando de 0,25 a 2,0 µg/mL para anfotericina B, 1,0 a 4,0 µg/mL para nistatina, 0,25 a 1,0 µg/mL para itraconazol, 0,5 a 1,0 µg/mL para cetoconazol, 0,5 a 16 µg/mL para miconazol, 32 a >128 µg/mL para fluconazol e 0,125 a > 4,0 µg/mL para 5-flucitosina. Cepas de *Paecilomyces* isoladas do ambiente, apresentaram CIM variando de 0,25 a 1,0 µg/mL para anfotericina B, 1,0 µg/mL para nistatina, 0,25 µg/mL para itraconazol, 0,5 a 1,0 µg/mL para cetoconazol, 1,0 a 16 µg/mL para miconazol, 32 a 64 µg/mL para fluconazol e 0,125 a 4,0 µg/mL para 5-flucitosina (Tabela 5).



**Tabela 5:** Variação da CIM para as cepas de *Paecilomyces* spp, frente aos antifúngicos avaliados

Origem (n <sup>o</sup> ) ♦	CIM DOS ANTIFÚNGICOS*						
	(em µg/mL)						
	AnB	Nist	Mcz	Ceto	Itra	Fluco	5-Fc
Paciente(5)	0,25-2,0	1,0-4,0	0,5-16,0	0,5-1,0	0,25-1,0	32,0->128,0	0,125-4,0
Ambiente(2)	0,25-1,0	1,0	1,0-16,0	0,5-1,0	0,25	32,0-64,0	0,125-4,0

\*AnB= anfotericina B, Nist= nistatina, Mcz= miconazol, Ceto= cetoconazol,

Itra= itraconazol, Fluco= fluconazol, 5-Fc= 5- flucitosina

♦ número de cepas avaliadas

Cepas de *Chaetomium* spp isoladas de espécimes clínicos, apresentaram CIM variando de 0,25 a 2,0 µg/mL para anfotericina B, 2,0 a 4,0 µg/mL para nistatina, 0,25 a 0,5 µg/mL para itraconazol, 0,5 a 1,0 µg/mL para cetoconazol, 0,125 a 0,25 µg/mL para miconazol, 32,0 µg/mL para fluconazol e >128,0 µg/mL para 5-flucitosina. Por sua vez, a cepa do ambiente apresentou CIM de 1,0 para anfotericina B, 4,0 para nistatina, 0,5 para miconazol, 0,5 para cetoconazol, 0,5 para itraconazol, 64,0 para fluconazol e >128,0 para 5-flucitosina (Tabela 6).

**Tabela 6:** Variação da CIM para as cepas de *Chaetomium globosum*, frente aos antifúngicos avaliados

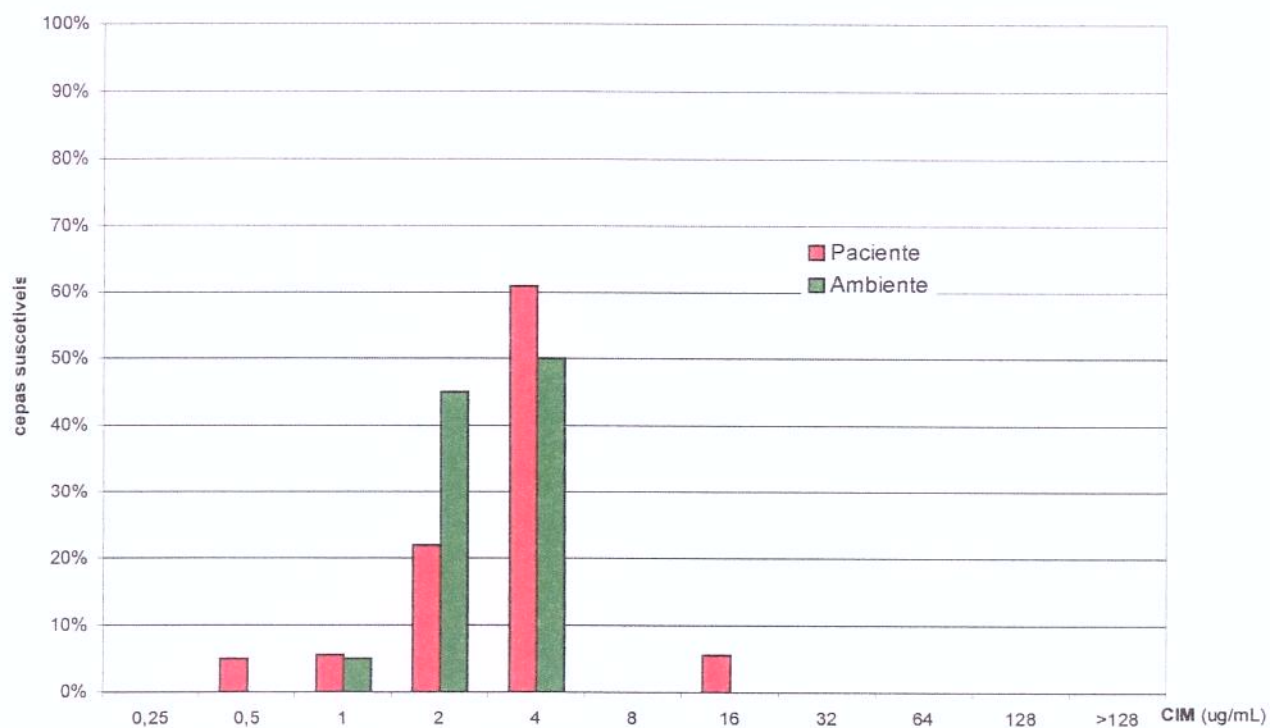
Origem (n <sup>o</sup> )♦	CIM DOS ANTIFÚNGICOS*						
	(em µg/mL)						
	AnB	Nist	Mcz	Ceto	Itra	Fluco	5-Fc
Paciente(2)	0,25-2,0	2,0-4,0	0,125-0,25	0,5-1,0	0,25-0,5	32,0	>128,0
Ambiente(1)	1,0	4,0	0,5	0,5	0,5	64,0	>128,0

\*AnB= anfotericina B, Nist= nistatina, Mcz= miconazol, Ceto= cetoconazol,

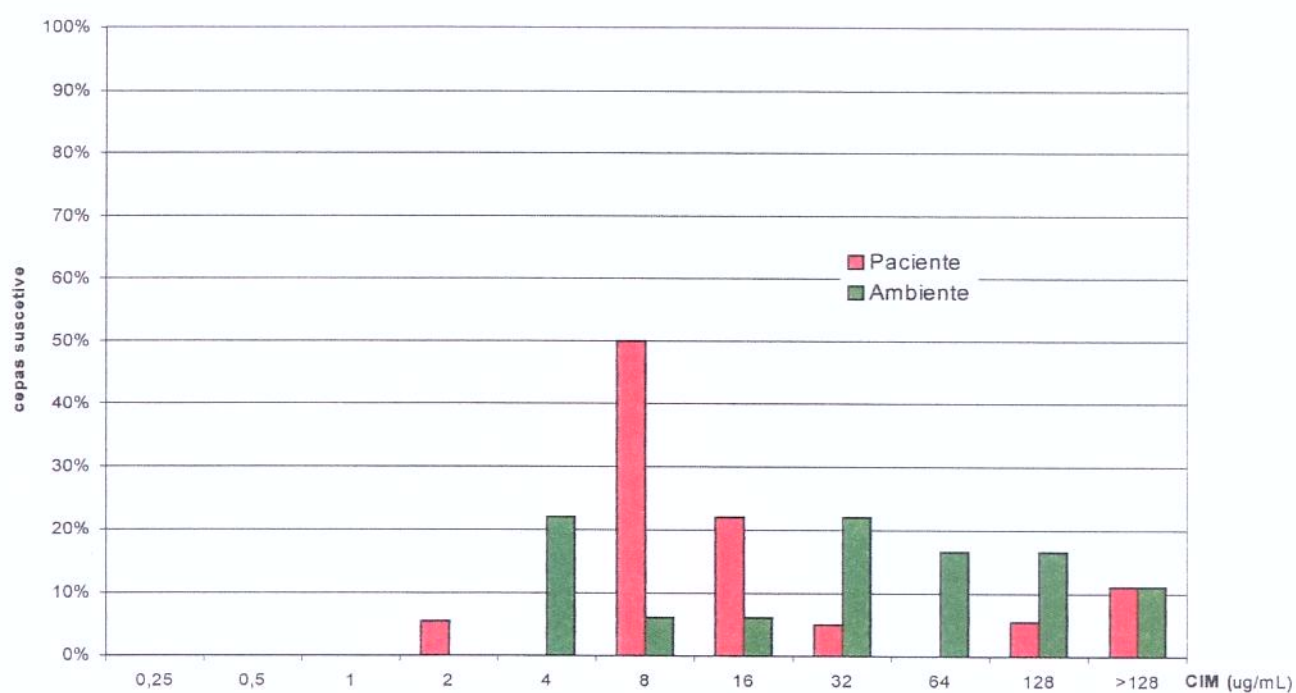
Itra= itraconazol, Fluco= fluconazol, 5-Fc= 5- flucitosina

♦ número de cepas avaliadas

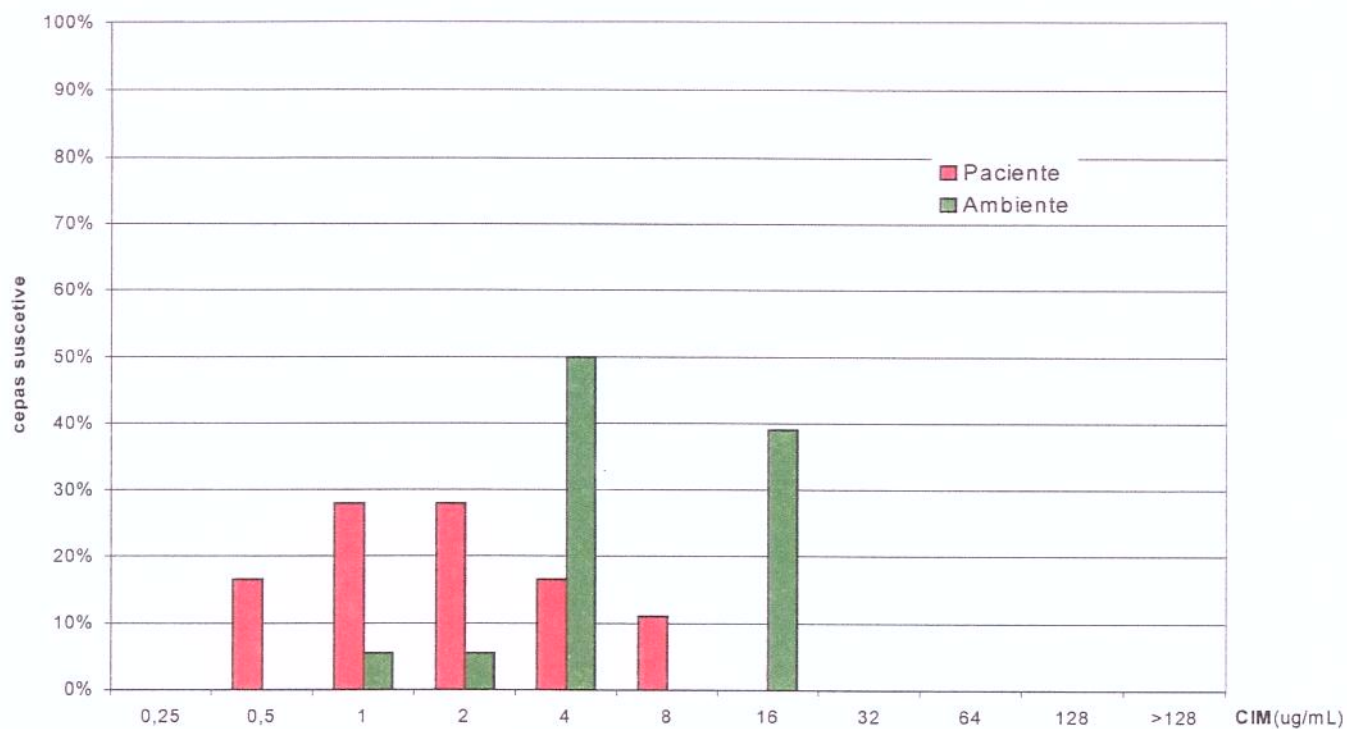
Analisando comparativamente a CIM das cepas de *Aspergillus* ambientais e as isoladas de pacientes, podemos observar que para anfotericina B (Figura 5), nistatina (Figura 6), cetoconazol (Figura 8), fluconazol (Figura 10) e 5- flucitosina (Figura 11), não houve diferença estatisticamente significativa entre as CIM dos dois grupos. Para miconazol (Figura 7) e itraconazol (Figura 9), a CIM das cepas ambientais é significativamente mais elevada do que para as cepas de pacientes, com valores de p, respectivamente = 0.003 e 0.057.



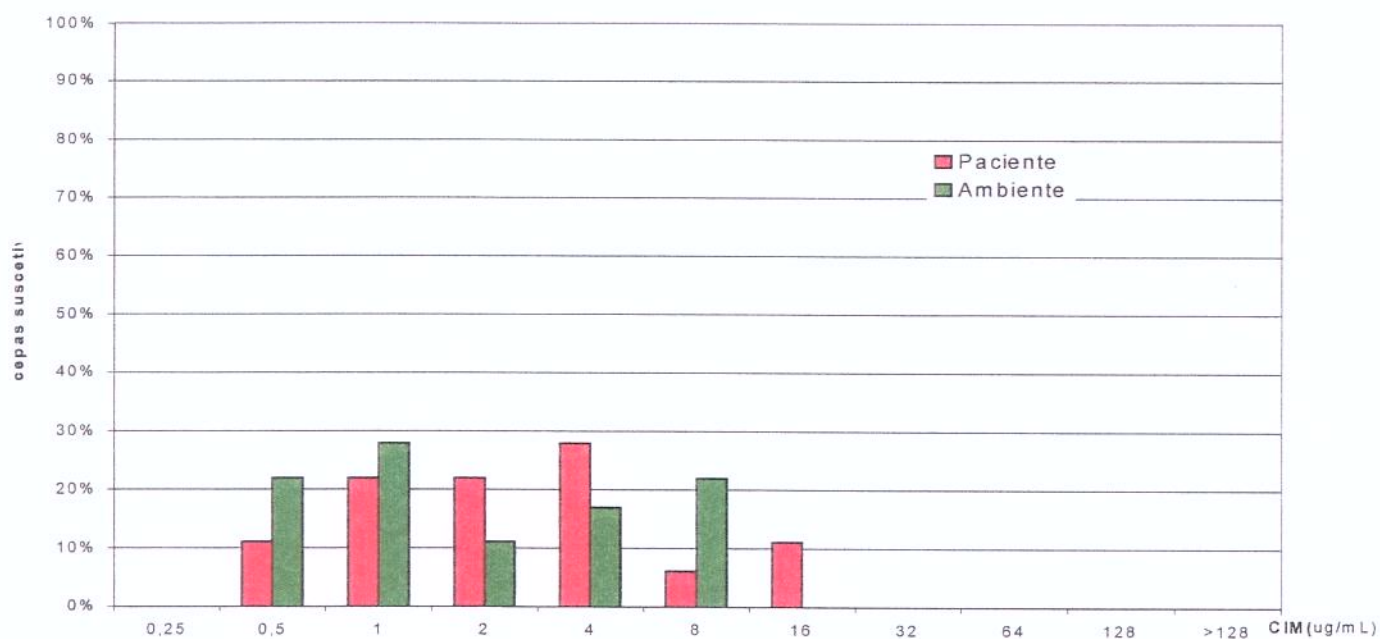
**Figura 5:** Valores de CIM de anfotericina B para cepas de *Aspergillus* sp isoladas de pacientes e ambiente ( $p=0,3837$ )



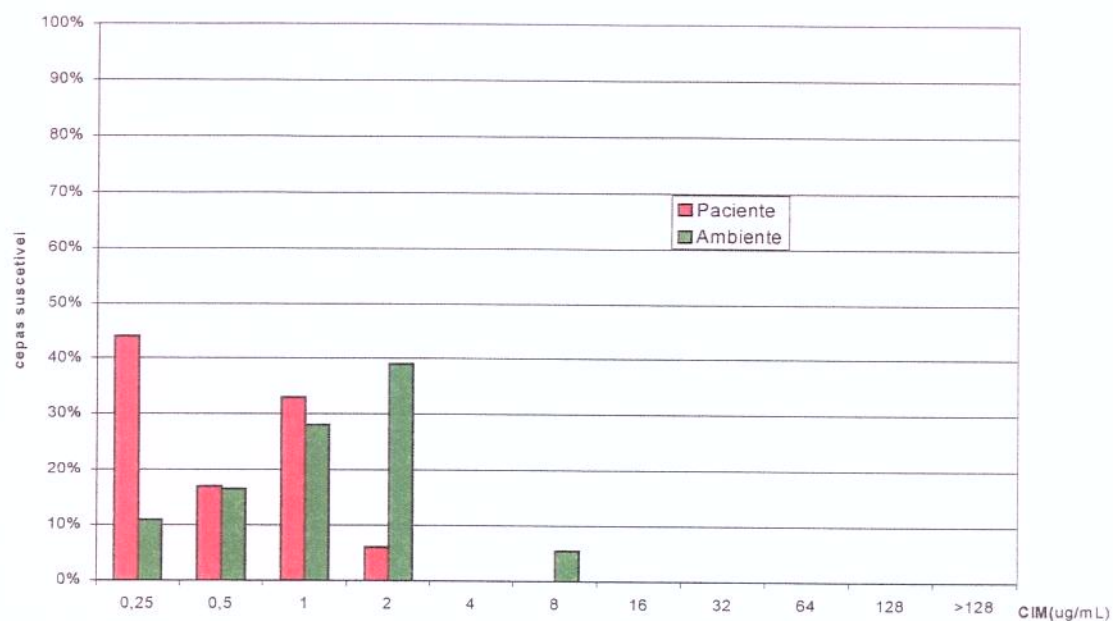
**Figura 6:** Valores de CIM de nistatina para cepas de *Aspergillus* sp isoladas de pacientes e ambiente ( $p=0,1720$ )



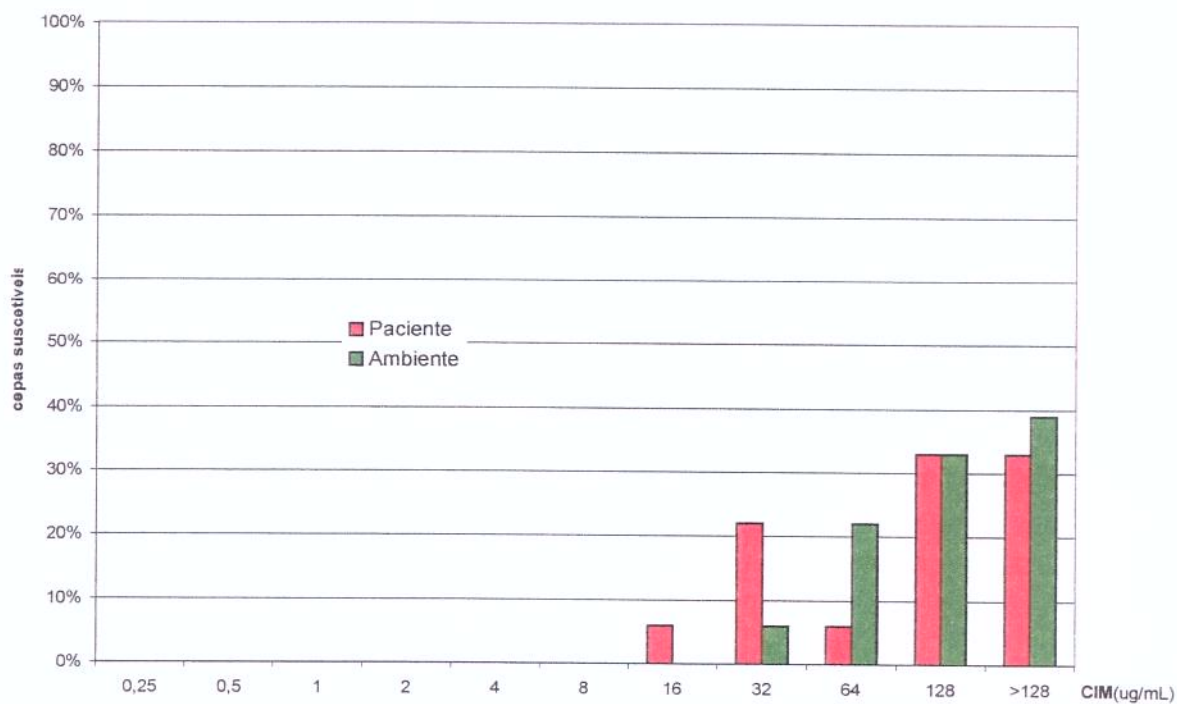
**Figura 7:** Valores de CIM de miconazol para cepas de *Aspergillus* sp aisladas de pacientes e ambiente ( $p=0,003$ )



**Figura 8:** Valores de CIM de itraconazol para cepas de *Aspergillus* sp aisladas de pacientes e ambiente ( $p=0,4779$ )

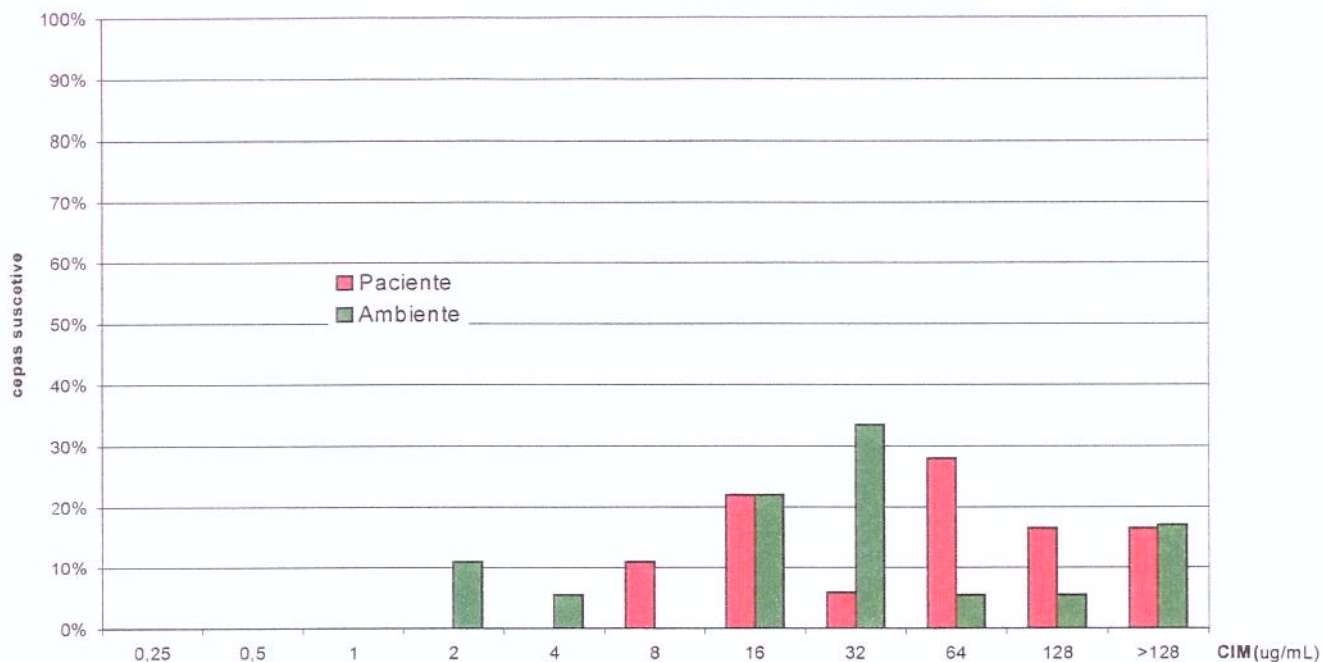


**Figura 9:** Valores de CIM de itraconazol para cepas de *Aspergillus* sp isoladas de pacientes e ambiente ( $p=0,0057$ )



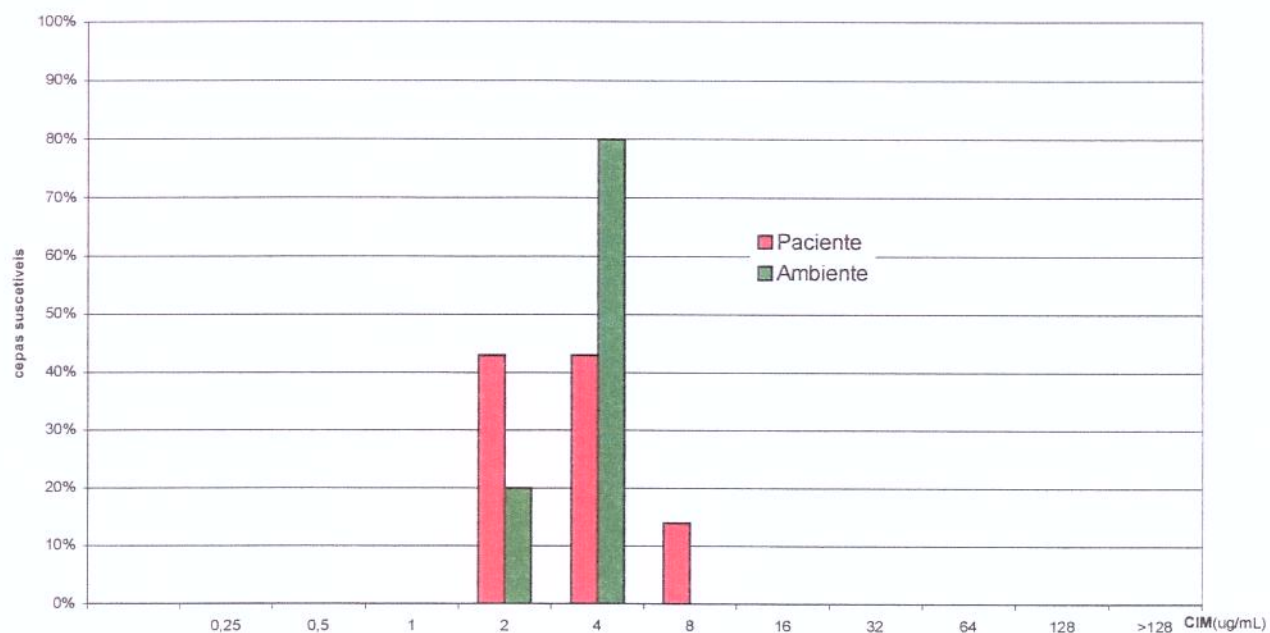
**Figura 10:** Valores de CIM de fluconazol para cepas de *Aspergillus* sp isoladas de pacientes e ambiente ( $p=0,4761$ )



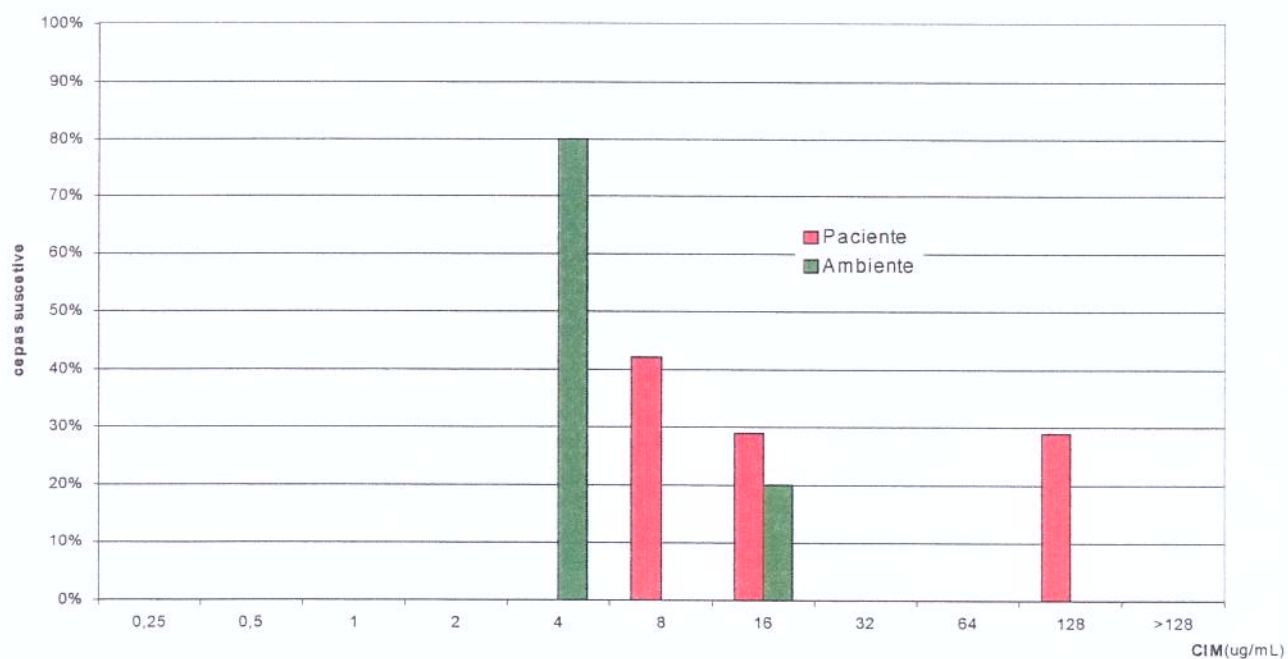


**Figura 11:** Valores de CIM de flucitosina para cepas de *Aspergillus* sp isoladas de pacientes e ambiente (p=0,2715)

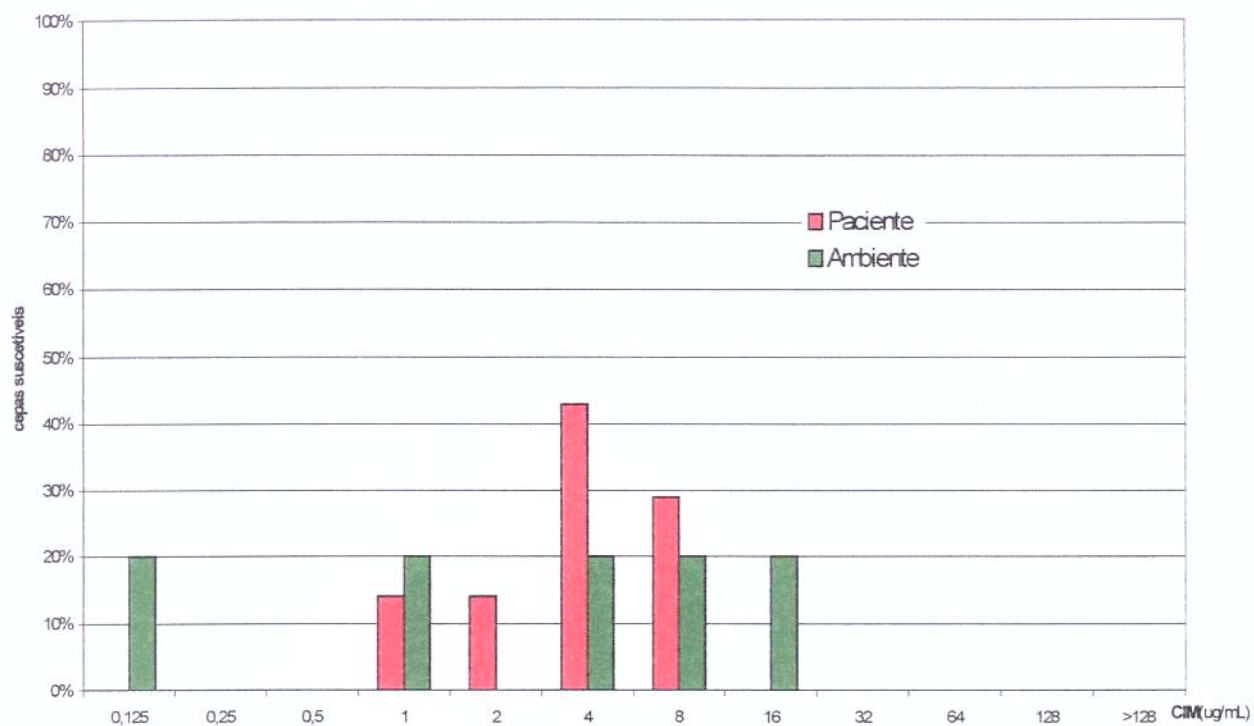
Considerando as espécies de *Fusarium*, não houve diferença significativa das CIM obtidas para cepas clínicas e ambientais, frente a anfotericina B (Figura 12), nistatina (Figura 13), miconazol (Figura 14), cetoconazol (Figura 15) e 5- flucitosina (Figura 18). É possível observar uma tendência das cepas de isolados clínicos, serem mais resistentes que as cepas ambientais, frente a itraconazol (p=0.067) (Figura 16). Frente a fluconazol (Figura 17), as cepas clínicas são significativamente mais resistentes que as cepas ambientais (p=0,02).



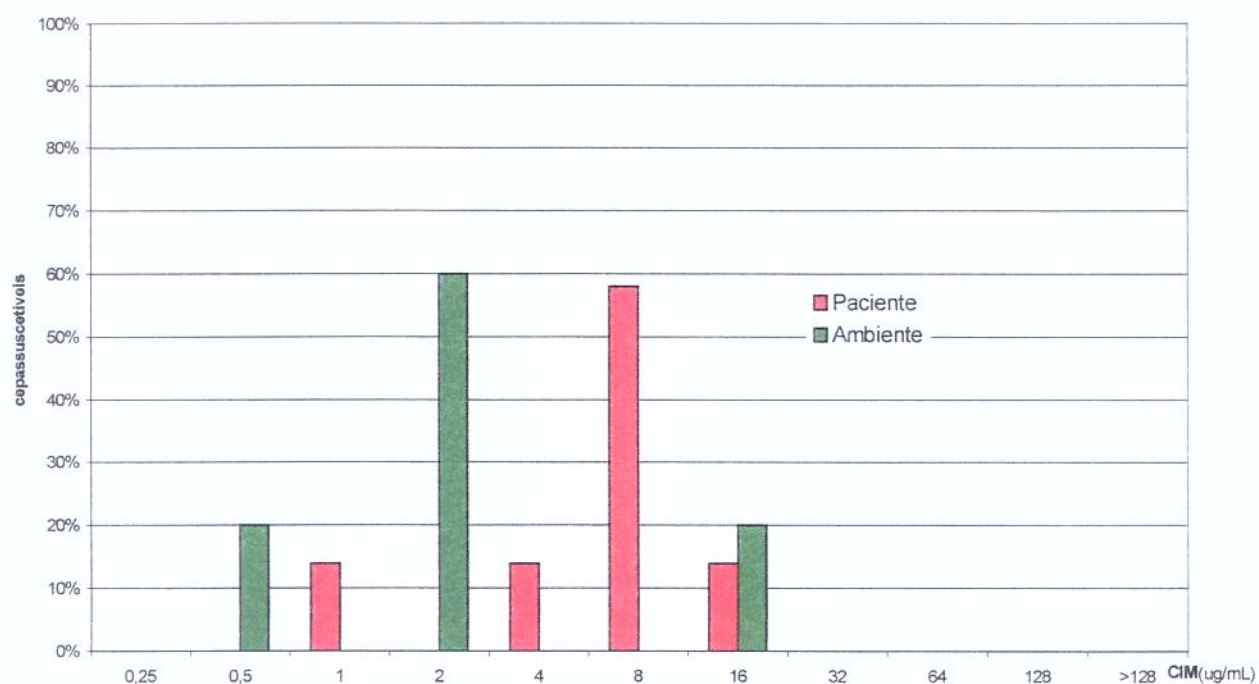
**Figura 12:** Valores de CIM de anfotericina B para cepas de *Fusarium* sp isoladas de pacientes e ambiente ( $p=0,841$ )



**Figura 13:** Valores de CIM de nistatina para cepas de *Fusarium* sp isoladas de pacientes e ambiente ( $p=0,823$ )

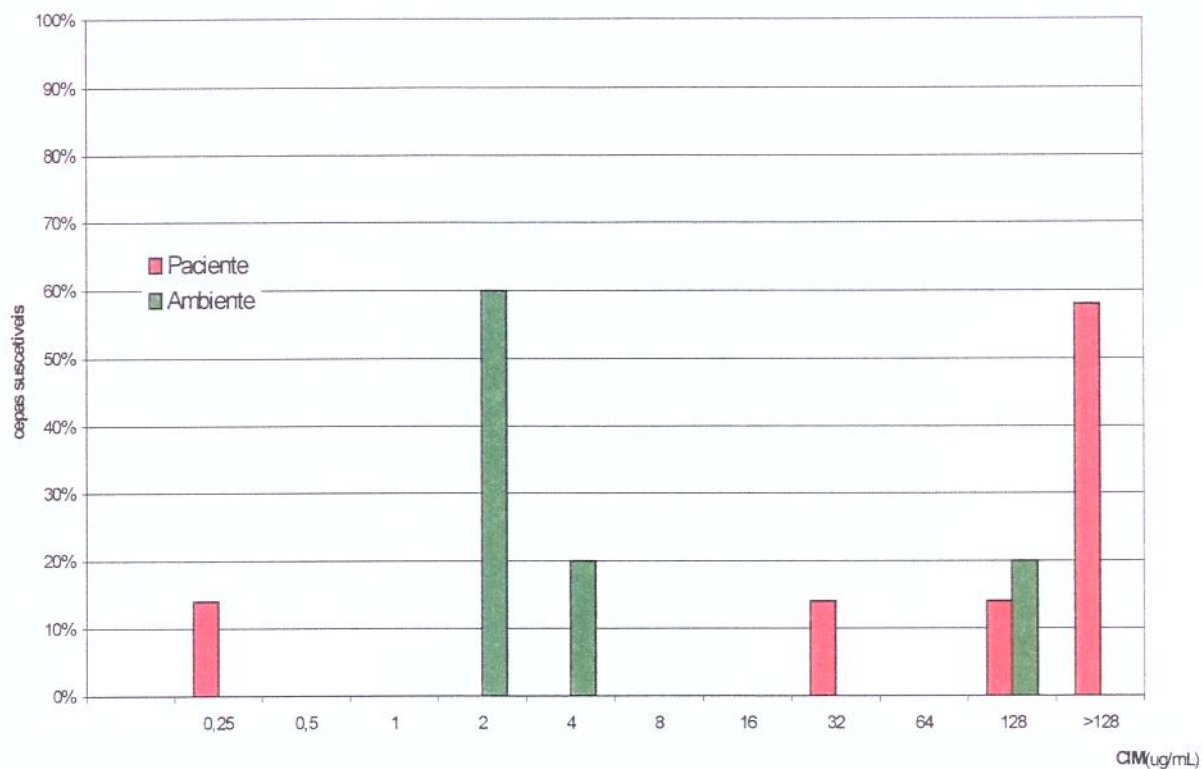


**Figura 14:** Valores de CIM de miconazol para cepas de *Fusarium* sp isoladas de pacientes e ambiente ( $p=0,995$ )

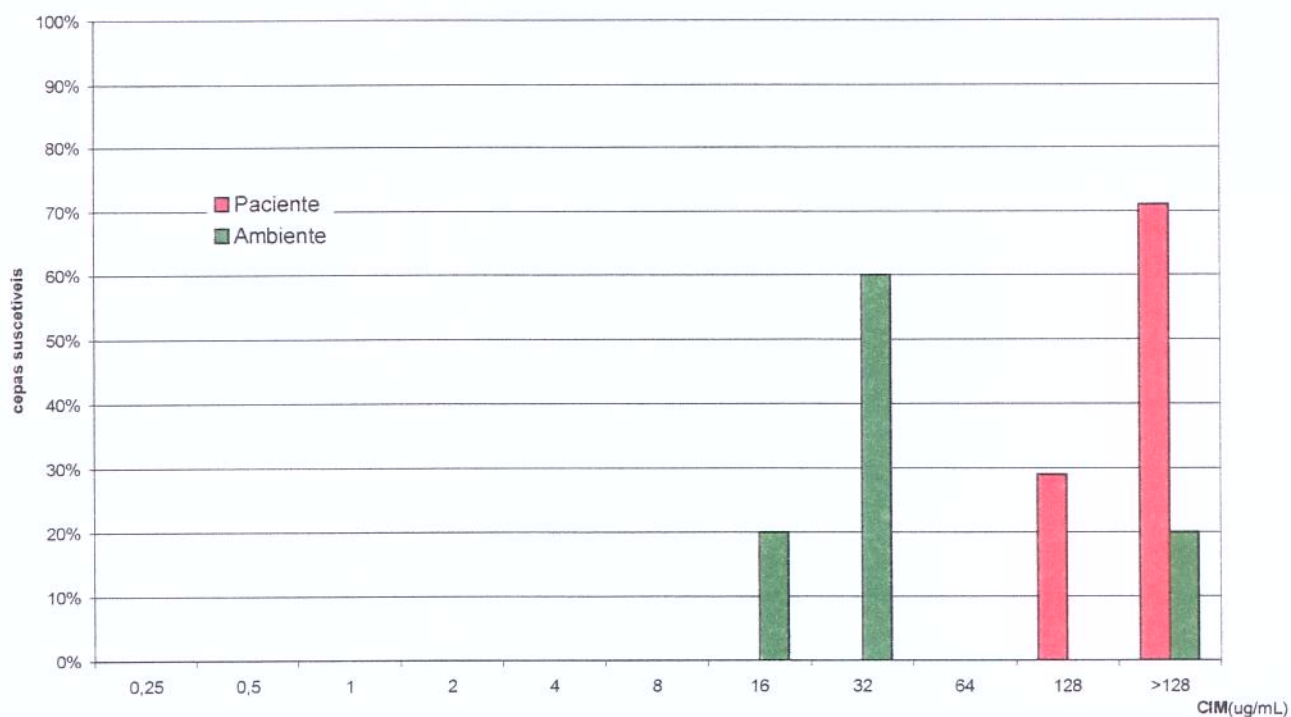


**Figura 15:** Valores de CIM de cetoconazol para cepas de *Fusarium* sp isoladas de pacientes e ambiente ( $p=0,227$ )

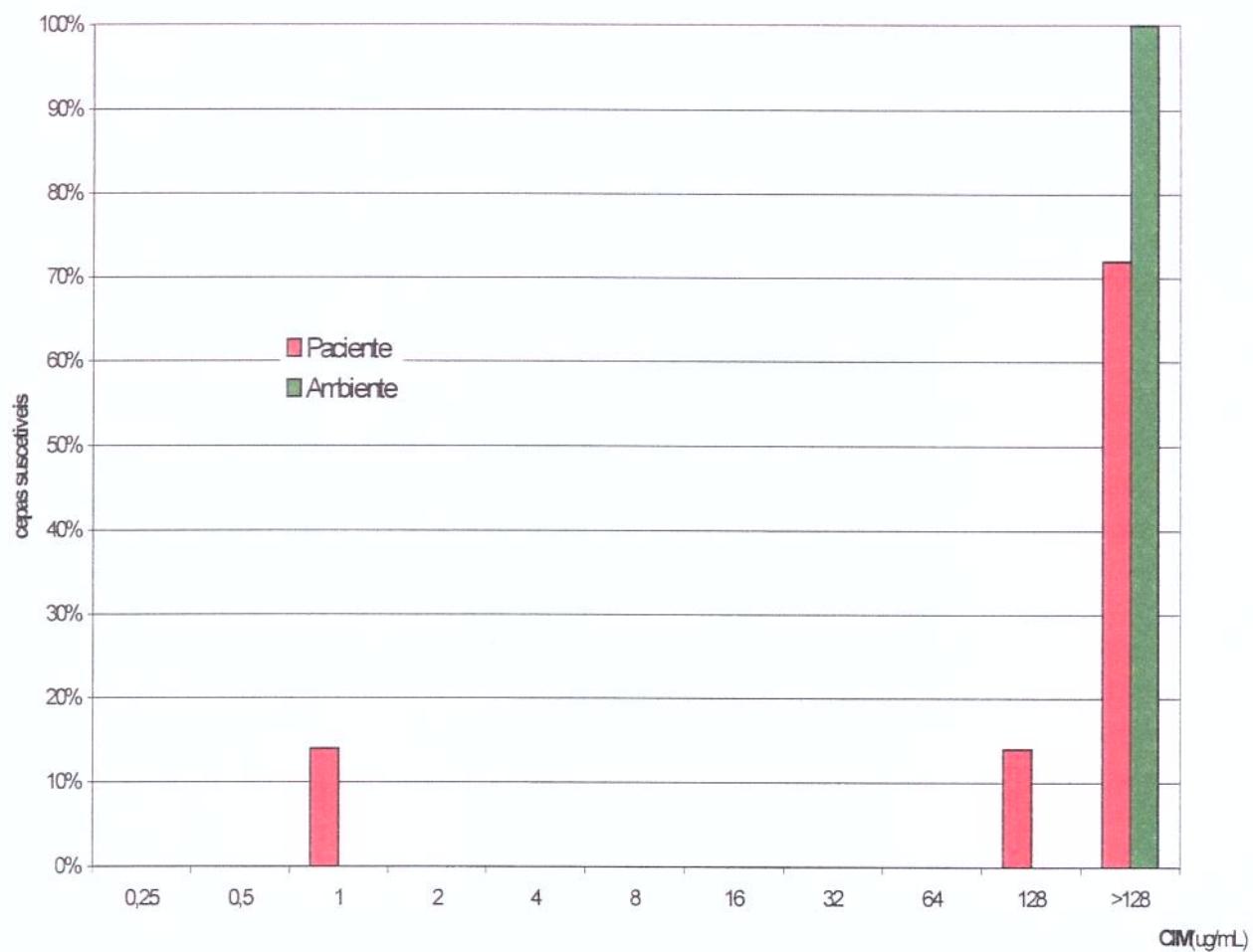




**Figura 16:** Valores de CIM de itraconazol para cepas de *Fusarium* sp isoladas de pacientes e ambiente (p=0,067)



**Figura 17:** Valores de CIM de fluconazol para cepas de *Fusarium* sp isoladas de pacientes e ambiente (p=0,021)



**Figura 18:** Valores de CIM de 5-flucitosina para cepas de *Fusarium* sp isoladas de pacientes e ambiente ( $p=0,823$ )



## ***5. DISCUSSÃO***

Micoses causadas por fungos oportunistas têm aumentado de maneira significativa. Em se tratando de fungos filamentosos, mais de 300 espécies já foram reportadas como agentes causais de doenças (PUJOL, I., 1997). Espécies de *Aspergillus* particularmente *A.fumigatus* e fungos dos gêneros *Fusarium*, *Curvularia* e *Alternaria* são os mais frequentemente relatados em casos de infecções sistêmicas ou disseminadas (CHAZATET, V., 1998), (CHYSSANTHOU, E., 1997), (VARLIVARIAN, S.E., 1993). Outros microrganismos oportunistas incluem *Fusarium*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Paecilomyces*, *Scopulariopsis* e vários bolores pigmentados, tais como espécies de *Chaetomium* (COSTA, A.R., 1988), (JAWETZ, M.A., 1998).

Esporos de fungos filamentosos, extremamente disseminados no ambiente, podem ser encontrados colonizando o trato respiratório do hospedeiro. Uma vez inalados, os conídios podem causar processos alérgicos, ou mesmo desencadear infecções sistêmicas ou disseminadas, dependendo do estado geral do paciente (CHAZATET, V., 1998), (CHYSSANTHOU, E., 1997), (DEBEAUPISUS, J.P., 1997), (LEENDERS, A.C.A.P., 1999). Pacientes sob altas doses de quimioterapia, associada a longos períodos de neutropenia, são mais suscetíveis a infecções oportunistas. Para estes pacientes, fungos com baixa virulência, considerados contaminantes ou colonizantes, são patógenos emergentes em potencial, associados a significativa morbidade e mortalidade (IWEN, P.C., 1994), (VARLIVARIAN, S.E., 1993).

A aspergilose invasiva é uma das enfermidades mais severas para pacientes imunossuprimidos, particularmente para os submetidos a transplante de medula óssea, sendo dentre estes, uma das causas de mortalidade (CHAZATET, V., 1998). A maioria das infecções oportunistas causadas por *Fusarium* spp, ocorrem em pacientes com malignidades hematológicas, apresentando prognóstico desfavorável, com taxa de mortalidade de 57% (ROMBAUX, E., 1996).

As dificuldades relacionadas ao diagnóstico das infecções fúngicas são inúmeras, em especial, as causadas por fungos filamentosos. Dentre elas podemos citar a escassez de técnicas práticas e avançadas, como as que vêm surgindo para a detecção e identificação de leveduras, tais como meios diferenciais (Cromagar Candida®), kits de identificação presuntiva e definitiva (Api Yeast ®, ID 32®) e até mesmo, métodos

automatizados, como Vitek ®. Estes métodos já estão disponíveis, a preços acessíveis, para os laboratórios de rotina, tendo alto índice de sensibilidade e reprodutibilidade, para os gêneros e espécies mais frequentes. A base para os processos de identificação de fungos filamentosos ainda é a avaliação de características macro e micromorfológicas, através de crescimento em diferentes condições nutricionais e ambientais. A literatura, de difícil acesso, também é bastante antiga (ELLIS, M.B., 1971), (RAPER, B.K., 1965). Testes bioquímicos, são aplicáveis, apenas em situações muito específicas. A literatura mais recente, sobre identificação de fungos filamentosos, já relata aplicação de técnicas moleculares para confirmação de identificação morfológica (CHAZATET, V., 1998), (GIRARDIN, H., 1994), (RADFORD, S.A., 1998), (RATH, P., 1997).

As dificuldades relacionadas ao processo de identificação, foram vivenciadas no decorrer deste trabalho, estando representadas nos anexos 2 e 3, pelos inúmeros microrganismos identificados apenas até o gênero. Em adição, por falta de recursos para induzir a produção de esporos, 258 fungos hialinos e 96 fungos demáceos, continuaram sem identificação, como pode ser observado no Anexo 4. As demais cepas avaliadas durante este trabalho, foram identificadas a nível de gênero e, apenas 69,2% das cepas submetidas aos processos de identificação definitiva, puderam ser classificadas em espécies. No entanto, todas as cepas isoladas estão sendo mantidas em água destilada estéril, à temperatura ambiente, para possibilitar estudos posteriores; sendo um total de 605 cepas.

Como podemos observar na tabela 1, as diferentes espécies isoladas como colonizantes dos pacientes estudados, não diferem dos relatos da literatura onde, a maioria dos trabalhos cita *Aspergillus* spp, *A. fumigatus*, espécies de *Alternaria*, *Penicillium* (VENNEWALD, 1999), *Curvularia*, *Bipolaris*, *Exserohilum* (KNOW-CHUNG, K.J., 1992), (VARLIVAVARIAN, S.E., 1993), e *Paecilomyces* (GUPPY, K.H., 1998), (VARLIVAVARIAN, S.E., 1993), como os mais frequentemente encontrados (BURIK, J.A.H., 1998), (LASS-FLORL, C., 1999), (SIBERRY, G.K., 1997), (VENNEWALD, I., 1999). Não há relatos sobre o isolamento de espécies de *Cladosporium* como colonizantes ou potenciais patógenos. Assim sendo, após o resultado negativo das cepas isoladas de pacientes na avaliação de crescimento a 37°C, as cepas de *Cladosporium* foram desprezadas.

Como não dispúnhamos de um equipamento para coleta do ar ambiental, optamos por utilizar o método de GASP (IWEN, P.C., 1994). Mesmo assim, foi surpreendente, a quantidade e variedade de cepas isoladas, independentemente de todos os protocolos de limpeza e filtração do ar realizados na Unidade de TMO do HC-UNICAMP (GUPPY, K.H., 1998). O grande número de microrganismos isolados, inviabilizou a extensão das coletas ambientais para a enfermaria de hematologia. Por várias vezes, os achados deste trabalho, serviram de subsídio para a redução do intervalo entre as trocas dos filtros de ar dos quartos.

Os dados obtidos a partir das coletas ambientais, detalhados na Figura 1, anexos 3 e 4, revelaram presença significativa de espécies de *Fusarium* no outono ( $p=0,021$ ) e *Cladosporium* spp ( $p=0,001$ ) no inverno. Fungos hialinos, não esporulados, estiveram mais significativamente presentes na primavera e no verão ( $p=0,001$ ), assim como os fungos demáceos, não esporulados, predominaram no outono ( $p=0,044$ ).

A literatura cita vários trabalhos, realizados em outros países, que avaliaram a micota de ambientes hospitalares como os que relatam: isolamento de *Aspergillus fumigatus* em Unidade hematológica CHAZATET, V., 1998), *Cladosporium* sp, *Alternaria* sp, *A.fumigatus*, *Chaetomium* sp, *Fusarium* sp, *A. niger*, *Monilia sitophila*, *Penicillium* sp, *Mucor* sp, *Nigrospora* sp isolados em quartos e corredores (IWEN, P.C., 1994), *Aspergillus* sp, e zigomicetos em Unidade oncológica e Unidade de transplante (EICKHOFF, T.C., 1994), *A. fumigatus* e *A flavus* em ambulatório e sala de recuperação cirúrgica (ROSE, H.R., 1979).

Trabalhos realizados no Brasil, relatam a flora exterior de cidades como um todo. Assim houve o domínio de *Alternaria* sp e *Helminthosporium* sp em Belo Horizonte e *Aspergillus* sp, *Alternaria* sp, *Mucor* sp, *Cephalosporium* sp, *Helminthosporium* sp e *Penicillium* sp no Rio de Janeiro (SOARES, M.M.S.R. et al, 1997).

Um trabalho realizado na cidade de Campinas -S.P, por SOARES, e cols, 1997, relata predominância de fungos em distintas estações do ano. No outono, inverno e primavera, *Cladosporium* foi o gênero mais isolado, enquanto que, no verão, os fungos não esporulados predominaram. Espécies de *Aspergillus* foram mais frequentes no inverno e *Fusarium* spp no inverno e outono.



A presença de *Cladosporium* spp, como no presente estudo, no inverno e fungos hialinos no verão encontrados na cidade de Campinas, ratifica o predomínio das cepas isoladas em nosso estudo e, de modo geral, os microrganismos encontrados em outros ambientes hospitalares, englobam a micota por nós detectada.

O potencial patogênico de um fungo oportunista pode ser sugerido por sua habilidade de crescer em pH fisiológico sob temperaturas maiores ou iguais a 37°C. LEENDERS, e cols,1999, classificaram como cepas não patogênicos, aquelas que cresceram em temperaturas de até 22°C e, como patogênicas, aquelas cepas que cresceram a 37°C ou mais. De acordo com Anfauvre-BROWN, e cols,1998, algumas cepas do ambiente também mostraram ser menos virulentas do que as cepas isoladas a partir de material clínico de pacientes, após inoculação em animais de experimento, pela técnica de marcação de conídios mutáveis com luz ultravioleta

Foram incubadas a 35 °C e 37°C 84 cepas isoladas de pacientes e 167 cepas isoladas do ambiente para avaliação do crescimento (Anexos 5 e 6). Como era esperado, as cepas isoladas dos pacientes, como um todo, podem ser consideradas potencialmente mais patogênicas do que as cepas ambientais. Analisando em separado as cepas de *Aspergillus* e *Fusarium*, não foi possível estabelecer diferença entre os potenciais patogênicos das cepas clínicas e ambientais, talvez pelo pequeno número de isolados ou mesmo devido às próprias características dos agentes. (Figura 3 e 4)

Na tentativa de estabelecer uma correlação entre as cepas ambientais e as isoladas como colonizantes dos pacientes, observamos uma possível correspondência entre as cepas 32P e 15A, 71P e 21A, 22P e 40A, 37P e 40A, 83P e 10A, 84P e 10A (Tabela 2). Para melhor estabelecer esta possível correlação, são necessários testes moleculares, como por exemplo: avaliação de homologia de DNA, repetição de seqüências de DNA (CHAZATET, V., 1998), (GOULD, D., 1991), amplificação de PCR de seqüência ribossomal (RADFORD, S.A., 1998) ou amplificação de DNA (RATH, P.M., 1997).

Em um caso específico, a correlação entre a cepa ambiental e as isoladas do material clínico, parece mais evidente. Este achado deu origem ao primeiro relato de isolamento de *Chaetomium globosum*, a partir de um processo infeccioso profundo, no Brasil. Culturas de aspirado de gânglio axilar e gânglio epitrocLEAR, revelaram a presença do

agente (cepas 83P e 84P), com crescimento ótimo a temperatura ambiente e a 37°C. As CIMs para as duas cepas variaram de: 0,25 a 2,0 µg/mL para AnB, 0,25 a 0,5 µg/mL para Itra, 0,125 a 0,25 µg/mL para Mcz, 0,5 a 1,0 µg/mL para Ceto, 32,0 µg/mL para Fluco, 2,0 a 4,0 µg/mL para Nist e >128,0 µg/mL para 5-Fc. A identificação do agente foi confirmada por um pesquisador do Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicosis, Chiba University, Chiba-Japão, Dr. Masaki Takada, e o relato do caso foi submetido a publicação (TEIXEIRA, A.B.A., 2001) (Anexo 10). Do ar ambiental de um dos quartos ocupados pelo mesmo paciente, também foi isolada uma cepa de *C. globosum*(10 A), com valores da CIM de 1,0 µg/mL para AnB, 4,0 µg/mL para Nist, 0,5 µg/mL para Ceto, 0,5 µg/mL para Itra, 64 µg/mL para Fluco e >128 µg/mL para 5-Fc. A avaliação molecular das 3 cepas está sendo providenciada para a comprovação de correlação entre as mesmas. Segundo Girardin, H. e cols, 1994, algumas cepas podem permanecer no ambiente por até 6 meses (GIRARDIN et al, 1994).

É provável que tenham ocorrido outras infecções, sistêmicas ou não, causadas por fungos filamentosos, no decorrer deste, e que não tenham sido diagnosticadas, pelas dificuldades diagnósticas que envolvem processos infecciosos desencadeados por estes agente. Dois anos antes do início deste trabalho, foram detectadas 2 infecções sistêmicas, com hemoculturas positivas para *Fusarium* sp em 2 pacientes submetidos a transplante de medula no HC- Unicamp.

Os agentes antimicrobianos disponíveis previnem infecções bacterianas comuns, virais e infecções fúngicas recentes. Entretanto, estudos demonstraram que a profilaxia, em pacientes transplantados de medula óssea, nem sempre é benéfica devido a toxicidade e os efeito colaterais no paciente e a possível seleção de microrganismos resistentes (MONIN, F.,1995), (SLAVIN, M.A., 1995).

No HC- UNICAMP todos os pacientes da Unidade de Hematologia e de Transplante de Medula Óssea recebem, até o presente, fluconazol 400mg/dia VO (cápsulas) como profilaxia para infecções fúngicas. Se o paciente apresenta mucosite, grau 3 ou 4, passa a ser administrado fluconazol IV. Nos casos em que não há defervescência da febre, após 96h de tratamento com antibacterianos, é associada anfotericina B (TRABASSO, P., 2001).



Uma vez diagnosticada a infecção por um fungo filamentosos, as dificuldades passam a ser relacionadas a terapêutica, tanto pelo reduzido número de antifúngicos liberados para uso, até o presente, assim como pela falta de um teste padronizado para avaliação da eficácia das drogas disponíveis. Para leveduras, a padronização da técnica de microdiluição em caldo está mais avançada tendo o documento M-27 do NCCLS (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL OF LABORATORY STANDARD M-27-A, 1997), como protocolo, ainda sujeito a modificações. Para fungos filamentosos, já existe o documento M-38P (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL OF LABORATORY STANDARD M-38-P, 1998), no entanto, fatores pré analíticos tais como: preparação do inóculo, tempo de incubação, temperatura de incubação, ainda necessitam de maiores estudos.

De acordo com o NCCLS (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL OF LABORATORY STANDARD M-38-P, 1998), a suspensão de conídios do inóculo pode ser preparada pelo método espectrofotométrico. A densidade da suspensão do inóculo é lida e ajustada para a densidade óptica de 80 a 82% de transmitância para *Aspergillus* sp e 68 a 70% para *Fusarium* sp..KURODA, et al, 2000, sugerem a utilização do método de contagem em hemocítômetro para a preparação do inóculo (KURODA, J., 2000). Dentre as dificuldades metodológicas, a padronização e uniformidade do inóculo, são fatores bastante críticos.

Neste trabalho, optamos por realizar a contagem de conídios em câmara de Thoma, uma vez que esta técnica evita que ocorra a valorização de hifas ao invés de conídios, sendo a presença dos mesmos confirmada por sua visualização ao microscópio óptico. Com a utilização da fórmula  $N \times 10^4 \times 1/N = 1 \times 10^4$ , também é possível manter um padrão de celularidade, que neste caso, foi  $1 \times 10^3$  UFC/MI (KURODA, J., 2000).

O tempo de incubação depende da velocidade de crescimento do fungo e da estabilidade do agente antifúngico a ser avaliado. Quanto menor o período de incubação, mais relevante se tornará o teste para utilização clínica, visto que, após vários dias de incubação, ocorre a perda de atividade do antifúngico. O NCCLS preconiza leituras de 46 a 50 horas, para a maioria dos fungos filamentosos oportunistas. O tempo de leitura da CIM varia de espécie para espécie, uma vez que, alguns fungos crescem mais rapidamente que

outros, com isso as leituras devem ocorrer a partir de 24, 48, 72 horas ou prosseguir até 5 dias, e nunca em tempo determinado. No presente trabalho, a maioria das leituras da CIM para *Aspergillus fumigatus* e *Paecilomyces variotti* foram de 48 horas, para *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp e *Chaetomium globosum* foram realizadas em 72 horas.

Em comparação aos testes de suscetibilidade a antifúngicos para leveduras, a leitura visual do teste de suscetibilidade, para fungos filamentosos, é ainda mais difícil. A princípio, pela dificuldade de padronização do tempo de leitura, em seguida, pelo crescimento gradativo que estes microrganismos apresentam frente os azólicos (com características fungistáticas). Frente à anfotericina B, a determinação das CIMs é mais nítida, provavelmente devido as suas características de agente fungicida (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL OF LABORATORY STANDARD M-38-P, 1998).

Neste trabalho, todas as cepas isoladas de espécimes clínicos, ou do ambiente, com capacidade de se desenvolverem adequadamente a 37°C, foram submetidas ao teste de suscetibilidade, pelo método de microdiluição em caldo. De modo geral, a literatura relata valores de CIM para *Aspergillus* isolados de espécimes clínicos entre 0,5 a 16,0 µg/mL frente anB, >64,0 µg/mL para Fluco, 0,03 a 0,25 µg/mL para Itra e 0,5 a 16,0 µg/mL para Ceto. Segundo o NCCLS, fungos filamentosos não são suscetíveis a 5- flucitosina e os valores de CIM são maiores que 64,0 µg/mL, com exceção de alguns isolados de *Aspergillus* spp. Não há relatos de teste de suscetibilidade realizados com isolados ambientais, assim como não foram relatados valores da CIM para Nistatina e Miconazol. As CIMs das cepas de *Aspergillus*, avaliadas neste trabalho, são semelhantes aos relatos da literatura menos para itraconazol onde os valores da CIM encontrados foram mais altos que os relatados (Tabela 3).

Para espécies de *Fusarium*, os estudos disponíveis apontaram CIM de 0.58 a >36,94µg/mL para AnB, 0,60 a >40,0 µg/mL para Mcz, 1,0 a >10,0 µg/mL para Itra (ESPINEL-INGROFF, A., 1998), >80,0 µg/mL para Fluco, >21,2 µg/mL para Ceto e >322,7 µg/mL para 5-Fc; de cepas de pacientes e cepas ambientais (PUJOL, I., 2000). Nossos resultados de CIM foram abaixo dos valores relatados na literatura, com exceção das CIMs frente a anfotericina B, que foram compatíveis (Tabela 4).

Para *Paecilomyces* spp as CIM relatadas na literatura estão entre 0,125 a 0,2 µg/mL para AnB, 0,25 a 2,0 µg/mL para Mcz, <0,25 a 2,0 µg/mL para 5-Fc, 0,125 a 1,0 µg/mL para Ceto, <0,03 a 0,06 µg/mL para Itra e 4,0 a 64,0 µg/mL para Fluco; de cepas de pacientes e cepas ambientais (GUARRO, J., 1997). Neste estudo os valores de CIM encontrados foram mais altos que os relatados, para AnB, Mcz, Itra, fluco e 5-Fc e semelhantes para Ceto (Tabela 5).

Para cepas de *Chaetomium globosum* os autores determinaram as CIM entre 1,16 a 2,31 µg/mL para Anb, >645,5 µg/mL para 5-Fc, 80,0 a 160,0 µg/mL para Fluco, 0,07 a 0,3 µg/mL para Itra, 0,8 a 1,6 µg/mL para Ceto, 0,075 a 0,15 µg/mL para Mcz, de cepas de pacientes e cepas ambientais (GUARRO, J., 1995). Os valores de CIM para cepas de *Chaetomium* estudadas (Tabela 6) são menores frente a AnB e Fluco, maiores para Itra e Mcz e semelhantes aos da literatura para Ceto e Itra.

A CIM das cepas de *Aspergillus* e *Fusarium* isoladas de pacientes e do ambiente, foram analisadas estatisticamente, pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney (CONOVER, W.J., 1971), (SIEGEL, S., 1975). Foi possível determinar que as CIMs das cepas ambientais de *Aspergillus* são significativamente mais elevadas para miconazol (Figura 7) e itraconazol (Figura 9). Para as espécies de *Fusarium*, há apenas uma tendência das cepas clínicas apresentarem CIMs mais elevadas frente a itraconazol (Figura 16) e significativa elevação das CIMs frente a fluconazol (Figura 17). PUJOL e cols, 1997, revelam que cepas ambientais apresentaram valores de CIM mais elevados do que as cepas clínicas frente a anfotericina B e itraconazol.

Ainda não há dados suficientes que permitam a interpretação de CIM para a classificação dos fungos filamentosos como sensíveis ou resistentes aos antifúngicos. Deste modo, ainda é extremamente difícil estabelecer as correlações entre CIM e resposta clínica.

Estudos recentes revelaram que, altos valores de CIM para isolados de *Aspergillus* sp frente a anfotericina B, resultaram em menor sobrevida dos pacientes, enquanto que valores baixos de CIM, foram compatíveis com aumento de sobrevida (FLORL, C.L., 1998).

Os estudos com testes de suscetibilidade para fungos filamentosos são muito mais recentes e, portanto, ainda menos evoluídos que os testes para leveduras. Estudos, *in vitro* e a padronização do inóculo na forma conidial tem progredido, no entanto, a baixa incidência de infecções por estes patógenos oportunistas, dificulta uma comparação prospectiva da CIM do agente com a resposta clínica ao tratamento (ODDS, F.C., 1998). Assim sendo, a terapêutica continua tendo embasamento empírico.

Ainda há muitas controvérsias em torno da avaliação de suscetibilidade a antifúngicos, para fungos filamentosos. Devido às características morfológicas destes microrganismos, no ambiente e nos pacientes, há questionamentos sobre se a forma conidial, seria a mais adequada para esta avaliação. Os conídios são formas de resistência dos fungos filamentosos, encontrados no ar em tamanhos pequenos e em altas concentrações, fáceis de serem inalados e de germinar. Considerando que a hifa é predominante e, praticamente a forma exclusiva em tecidos de indivíduos infectados, a relevância dos dados obtidos dos testes de crescimento conidial, em comparação com aqueles obtidos em testes de crescimento com hifas é contestado (GUARRO, J., 1997).

A determinação da CIM para fungos filamentosos poderia ser mais adequada com a utilização de um método que permitisse a quantificação do crescimento das hifas.

Em estudos preliminares, realizados no Research Center for Fungi and Microbial Toxicosis, Chiba University em Chiba, Japão, uma cepa de *Fusarium solani*, foi submetida ao teste de suscetibilidade, pelo método do BCT (Biocell Tracer) (TAGUCHI, H., 1995). Trata-se de um equipamento que permite a avaliação do crescimento da hifa, na presença de diferentes concentrações da droga teste. Os dados de CIM obtidos no teste da cepa 67P, com o BCT, foram 1,0 µg/mL para anfotericina B e >128,0 µg/mL para fluconazol, contra 4,0 e >128,0 µg/mL, respectivamente, pelo método de microdiluição em caldo.

A princípio, é possível apenas avaliar, que os dados fornecidos com o estudo da hifa, revelam CIMs mais baixas. No entanto, ainda serão necessários muitos estudos comparativos, assim como prospectivos, de acompanhamento da terapêutica, para que estes dados possam ser validados.

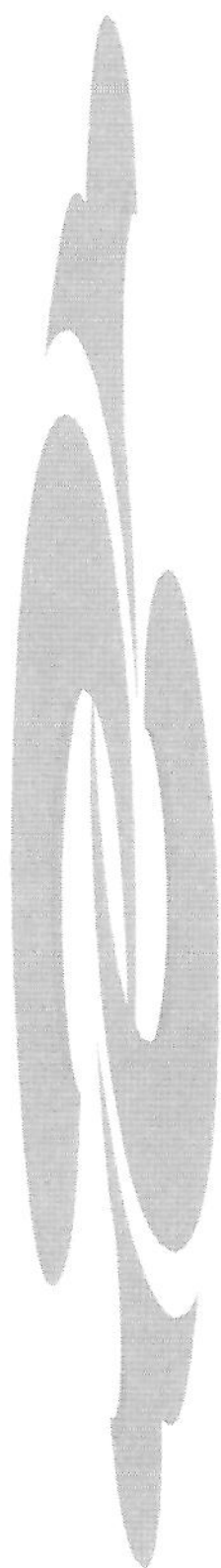


## ***6. CONCLUSÕES***

Avaliando os dados obtidos neste trabalho, pode-se relatar que:

- Espécies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, são os fungos filamentosos mais prevalentes como colonizantes dos pacientes das enfermarias de hematologia e TMO do HC-Unicamp.
- Os processos disponíveis para identificação de fungos filamentosos ainda precisam evoluir muito em termos de recursos laboratoriais. Até o presente demandam grandes conhecimentos de taxonomia, morfologia, são extremamente demorados e algumas vezes, sem o sucesso esperado.
- Mesmo tratando-se de um ambiente fechado, com ar condicionado, como na Unidade de TMO, ainda pode ser grande o número de esporos em suspensão no ar, sendo a concentração das diferentes espécies, variável de acordo com as estações do ano.
- Embora não exista uma normatização específica quanto à monitorização de esporos nos ambientes com ar controlado, a avaliação da presença de espécies potencialmente patogênicas de *Aspergillus* e *Fusarium* pode servir como termômetro da qualidade do processo de filtração do ar.
- É possível que uma análise molecular comparando todas as cepas isoladas da mesma espécie, revelasse a presença da mesma em diferentes ambientes, ou eventualmente, sua transferência de paciente para ambiente, ou vice-versa. Podendo-se determinar o tempo de permanência de uma mesma cepa no ambiente.
- Cepas colonizantes de paciente, são potencialmente mais patogênicas do que cepas ambientais que, no entanto, não podem ter seu potencial patogênico menosprezado quando se trata de pacientes imunodeprimidos.

- A técnica de microdiluição em caldo, para fungos filamentosos, pode ser viável, inclusive para realização rotineira, desde que alguns fatores pré-analíticos evoluídos sejam melhor estabelecidos, em especial, o inóculo.
- Ainda não é possível classificar as cepas isoladas como sensíveis ou resistentes, no entanto, as cepas clínicas de *Fusarium* apresentam CIM mais elevadas frente a fluconazol e as cepas ambientais de *Aspergillus* revelaram CIM mais elevadas frente a miconazol e itraconazol.
- Testes de sensibilidade comparativos, entre inóculos de conídios e hifas, seriam de grande interesse, principalmente se realizadas para acompanhamento de tratamento.
- Em apenas um caso foi possível correlacionar, quase com certeza, uma cepa ambiental em um processo infeccioso.



## ***7. SUMMARY***



Infection is a major cause of morbidity and mortality in bone marrow transplant recipients and in patients with hematologic malignancies. The source of the infecting organism is almost always endogenous flora or the hospital environment. Of the hospital acquired infections complication, infection with opportunistic molds is especially devastating in immunocompromised patients. Aspergillosis is acquired via inhalation of spores, and in some cases, nasal colonization prior to the development of invasive disease has been demonstrated.

The present study evaluated bone marrow transplant recipients and malignant hematologic patient colonizing filamentous fungi. During one year, environmental air samples were taken from the bone marrow transplant unit. The same genus of molds were recovered from environmental and clinical sources like *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, *Fusarium* spp, *Cladosporium* spp, *Paecilomyces* spp and *Chaetomium* spp. The most prevalent genus was *Fusarium*, in the fall and *Cladosporium* in the winter. Clinical isolated strains grew better at 37° C than environmental strains, giving evidence to be potentially more pathogenic. Antifungal susceptibility tests by the broth microdilution method were performed, according to the NCCLS M-38P (1998) guidelines. Environmental *Aspergillus* strains were more resistant to miconazol and itraconazole, and clinical *Fusarium* strains were more resistant to fluconazole. It is extremely difficult to identify a clear relation between minimal inhibitory concentration, evaluated with fungal conidia, and clinical outcome. Infections caused by filamentous fungi are characterized by the presence of hyphae elements in tissue. Susceptibility testing with hyphae would be, perhaps, a possibility to obtain a better correlation between *in vitro* and *in vivo* results.



## ***8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

- ABBOT, S.P.; SIGLER, L.; McALFER, R., et al.- Fatal cerebral mycoses caused by ascomycete *Chaetomium strumarum*. **J. Clin. Microbiol.** **33(10)**: 2692-2698, 1995.
- ALVES, S.H.; LOPES, J.O.; CURY, A.E.- Teste de suscetibilidade aos antifúngicos: Por que, quando e como realizar. **News lab** **25**, 2000.
- ANANDI, V.; JACOBJOHN, T.; WALTER, <sup>a</sup>; SHASTRY, J.C.M.; LALITHA, M.K.; PADHYE, A.A.; AJELLO, L.; CHANDLER, F.W.- Cerebral phaeohyphomycosis caused by *Chaetomium globosum* in renal transplant recipient. **J. Clin. Microbiol.** **27(10)**: 2226-2229, 1989.
- ARNOW, P.M.; SADIGH, M.; COSTAS, C.; WEIL, D.; CHUDY, R.- Endemic and epidemic aspergillosis associated with In-hospital replication of *Aspergillus* organisms. **J. Infect. Dis.**, **164**: 998-1002, 1991.
- ARUNDEL, A .; STERLING, E.M.; BIGGIN, J.H.; STERLING, T.D.- Indirect health effects of relative humidity in indoor environments. **Environ. Heath Persp.**, **65**: 351-361, 1986.
- AUFAUVRE-BROWN, A.; BROWN, D.W.; HOLDEN, D.W.- Comparison of virulence between clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, **17(11)**: 778-780, 1998.
- BOLANOWSKI, W.; TRELINSKA, J.; BODALSKI, J.- Fungal colonization and infection in children with acute leukemia and lymphoma during induction therapy. **Med. Pediatr. Oncol.**, **34**: 76, 2000. [Letter]
- BUTTNER, M.P.; STETZENBACH, L.D.- Monitoring airborne fungal spores in an experimental indoor environment to evaluate sampling methods and the effects of human activity on air sampling. **Appl. Environ. Microbiol.**, **59 (1)**: 219-226, 1993.
- CARVALHAES, J. – **Micologia Médica**, 1.ed., Rio de Janeiro (R.J), Control lab, 1999.

- CASTELLÁ, G.; CANO, J.; GUARRO, J.; CABAÑES, F.J. – DNA fingerprinting of *Fusarium solani* isolates related to cutaneous infection in a sea turtle. **Med. Mycology.**, **37**: 223-226,1999.
- CHAZATET, V.; DEBEAUPUIS, J.P.; SARFATI, J.; LORTHOLARY, J.; RIBAUD, P.; SHAH, P.; CORNET, M.; THIEN, H.V.; GLUCKMAN, E.; BRUCKER, G.; LATGÉ, J.P.- Molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus* from various hospital settings. **J. Clin. Microbiol.**, 1998. p1494-1500
- CHRYSSANTHOU, E. -In vitro susceptibility of respiratory isolates of *Aspergillus* species to itraconazole and amphotericin B. acquired resistance to itraconazole. **Scand J Infect Dis.**; **29**: 509-512,1997.
- CONOVER, W.J.; **Practical Nonparametric Statistics**. New York: John Wiley & Sons, 1971.
- CORMICAN, M.G.; PFALLER, M.A.- Standardization of antifungal susceptibility testing. **J. Antimicrobial. Chemother.**, **38**: 561-578, 1996.
- COSTA, A.R.; PORTO, E.; LACAZ, C.; MELO, N.T.; CALUX, M.J.F.; VALENTE, N.Y.S. – Cutaneous and ungual phaeohyphomycoses caused by species of *Chaetomium* Kunze (1817) ex Fresenius, 1829. **J. Med.Vet. Mycol.**, **26**: 261-268, 1988.
- DEBEAUPUIS, J.P.; SARFATI, J.; CHAZALET, V.; LATGÉ, J.P.- Genetic diversity among clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. **Infect. Immun.**, **65(8)**: 3080-3085,1997.
- DENNING, D.W.; RADFORD, S.A .; OAKLEY, K.L.; HALL, L.; JOHNSON, E.M.; WARNOCK, D.W. -Correlation between *in vitro* susceptibility testing to itraconazole and *in vivo* outcome of *Aspergillus fumigatus* infection. **J. Antimicrobial Chemother.**, **40**: 401-414,1997.

DICIONÁRIO de Especialidade Farmacêutica- DEF. 27.ed., Produção: Jornal Brasileiro de Medicina- JBM, 98/99.

DRUTZ,D.J.- *In vitro* antifungal susceptibility testing and measurement of levels of antifungal agents in body fluids. **Rev. Infect. Dis.**, 9(2): 392-397, 1987.

EICKHOFF, T.C. -Airborne nosocomial infection: a contemporary perspective. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**,15(10): 663-672,1994.

ELLIS, M.B.; **Dematiaceous Hyphomycetes**, 1.ed., Surrey, England Commowealth Mycological Institute, 1971

ESPINEL-INGROFF, A.- *In vitro* activity of the new triazole voriconazole (UK- 109, 496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungal and common and emerging yeast pathogens. **J. Clin. Microbiol.**, 36(1):.198-202, 1998.

ESPINEL-INGROFF, A.; BARCHIESI, F.; HAZEN, K.C.; MARTINEZ-SUARES, J.V.; SCALISE, G.- Standardization of antifungal susceptibility testing and clinical relevance. **Med. Mycol.**, 36(1):68-78,1998.

FLORL, C.L.; KOFLER, G.; KROPSHOFER,G.; HERMANS, J.; KRECZY, A.; DIERICH, M.P.; NIEDERWIESER, D. – *In vitro* testing of susceptibility to amphotericin B is a reliable predictor of clinical outcome in invasive aspergillosis. **J. Antimicrobial Chemother.**, 42: 497-502,1998.

GEHRT, A .; PETER, J.; PIZZO, P.A .; WALSH, T.J. -Effect of increasing inoculum sizes of pathogenic filamentous fungi on MICs of antifungal agents by broth microdilution method. **J.Clin. Microbiol.**, 33(5): 1302-1307,1995.

GIRARDIN, H.; SARFATI, J.; TRAORÉ, F.; CAMET, J.D.; DEROUIN, F.; LATGÉ, J.P. - Molecular epidemiology of nosocomial invasive aspergillosis. **J.Clin.Microbiol.**, 32 (2):684-690,1994.

- GOULD, D. -Nurses' hands as vectors of hospital- acquired infection. **J. Adv. Nurses.**, **16(10)**:1216-1225, 1991.
- GUARRO, J.; LLOP, C.; AGUILAR, C.; PUJOL, I.- Comparison of *in vitro* antifungal susceptibilities of conidia and hyphae of filamentous fungi. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **41(12)**: 2760-2762, 1997
- GUARRO, J.; SOLER, L.; RINALDI, M.G. – Pathogenicity and antifungal susceptibility of *Chaetomium* species. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, **14**:613-18, 1995.
- GUIOT, H.F.L.; FIBBE, W.E.; WOUT, J.W. – Risk factors for fungal infection in patients with malignant hematologic disorders: implications for empirical therapy and prophylaxis. **Clin. Infect. Dis.**, **18**: 525-32, 1994.
- GUPPY, K.H.; THOMAS, K.; ANDERSON, D. – Cerebral fungal infection in the immunocompromised host: a literature review and a new pathogen *Chaetomium atrobrunneum*: case report. **Neurosurgery**, **43(6)**:1463-9, 1998.
- HOGAN, L.H.; KLEIN, B.S.; LEVITZ, S.M. - Virulence factors of medically important fungi. **Clin. Microbiol. Rev.**, **9(4)**:469-488, 1996.
- IWEN, P.C.; MS; M(ASCP); SM(AAM); CLS/M.; DAVIS, J.C.; MD; REED, E.C.; WINFIELD, B.A. ; MN; CIC; HINRICHS, S.H.; MD.- Airborne fungal spore monitoring in a protective environment during hospital construction, and correlation with an outbreak of invasive aspergillosis. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, **15(5)**: 303-306, 1994.
- IWEN, P.C.; REED, E.C.; ARMITAGE, J.; BIERMAN, P.J.; KESSINGER, A.; VOSE, J.M.; ARNESON, M.A.; WINFIELD, B.A.; WOODS, G.L.- Nosocomial invasive aspergillosis in lymphoma patients treated with bone marrow or peripheral stem cell transplants. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, **14(3)**: 131-139, 1993.

- JAHN, B.; STUBEN, A .; BHAKDI, S. -Colorimetric susceptibility testing for *Aspergillus fumigatus*: comparison of menadione -augmented tetrazolium and alamar blue test. **J. Clin. Microbiol.**,**34(8)**: 2039-2041,1996.
- JAWETZ, M.A., BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; ORNSTON, L.N.- **Microbiologia Médica** 20° ed, Rio de Janeiro, R.J., Guanabara, 1998.p 420-443
- JOHNSON, E.M.; SZEKELY, A.; WARNOCK, D.W.- In-vitro activity of voriconazole, itraconazole and amphotericin B against filamentous fungi. **J. Antimicrobial Chemother.**, **42**: 741-745, 1998 .
- KAMI, M.; SAWADA, Y., MORI, S.I.; HIRATE, J.; KOJIMA, N.; KANDA, Y.; MORIYA, A.; YUJI, K.; SAITO, T.; CHIBA, T.; CHIBA, S.; HIRAI, H - Serum levels of fluconazole in patients after cytotoxic chemotherapy for hematological malignancy . **American J. Hematol** **66**: 85-91, 2001
- KNOW-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E.- **Medical Mycology**. Philadelphia, London, Lea & Febiger, 1992
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; DOWELL, V.R.Jr.; SOMMERS, H.M.- **Diagnóstico Microbiológico Texto e Atlas Colorido** 2. Ed., São Paulo-S.P., Panamericano, 1993. p 537-599
- KRASINSKI, K.; HOLZMAN, R.S.; HANNA, B.; GRECO, M.A.; GRAFF, M.; BHOGAL, M.- Nosocomial fungal infection during hospital renovation. **Infect. Control**, **6(1)**: 278-282, 1985.
- KURODA, J.; FUKAI, T.; KONISHI, M.; UNO, J.; KURUSU, K.; NOMURA, T.- LI-F Antibiotics, a family of antifungal cyclic depsipeptides produced by *bacillus polymyxa* L-1129. **Heterocycles**, **53(7)**: 1533-1549, 2000.
- LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.- **Micologia Médica: Fungos, Actinomicetos e Algas de Interesse Médico**. 3.ed., São Paulo (S.P), Sarvier, 1991.p 31-58



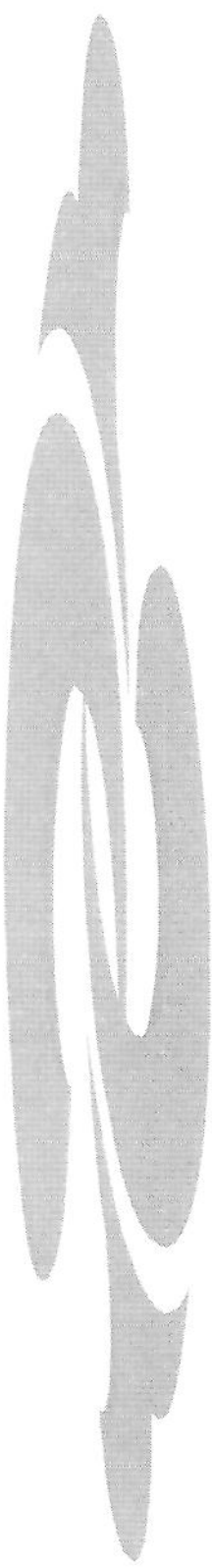
- LAJONCHERE, J.P.; CHAUVIN, M.F. -Contamination aspergillaire: evaluation des mesures de prévention et surveillance de l'environnement. **Pathol. Biol.**, **42(7)**:7718-729,1994.
- LASS-FLORL, C.; SALZER, G.M.; SCHMID, T.; RABL, W.; ULMER, H.; DIERICHE, M.P.- Pulmonary *Aspergillus* colonization in humans and its impact on management of critically ill patients. **British Journal Haematology**, **104**: 745-747, 1999.
- LEENDERS, A.C.A.P.; van BELKUM, A.; BEHRENDT, M.; LUIJENDIJK, A.; VERBRUGH, H.A.; - Density and molecular epidemiology of *Aspergillus* in air and relationship to outbreaks of *Aspergillus* Infection. **J. Clin. Microbiol.** **37(6)**:1752-1757,1999.
- LOO, V.G.; BERTRAND, C.; DIXON, C.; VITYE, D.; De SALIS, B.; McLEAN, A.P.H.; BROX, A.; ROBSON, H.G.- Control of construction-associated nosocomial aspergillosis in an antiquated hematology unit. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**,**17**: 360-364, 1996.
- MANAVATHU, E.K.; ALANGADEN, G.J.; LERNER, S.A . -A comparative study of the broth micro and macro-dilution techniques for the determination of the in vitro susceptibility of *Aspergillus fumigatus*. **Can J. Microbiol.**, **42**: 960-964,1996.
- MONIN F.; CHANDRASEKAR, P.H.- Antimicrobial prophylaxis in bone marrow transplantation. **Ann. Intern Med.**, **123(3)**: 205-215,1995.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL OF LABORATORY STANDARD.-  
Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast;  
approved standard 17(9) NCCLS document M27-A, 1997.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL OF LABORATORY STANDARD,-  
Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of  
Conidium-Forming Filamentous Fungi; Proposed Standard, NCCLS document  
M38P, 1998.

- ODDS, F.C.; GERVEN, F.; ESPINEL-IGROFF, A.; BARTLETT, M.S.; GHANNOUM, M.A.; LANCASTER, M.V.; PFALLER, M.A.; REX, J.H.; RINALDI, M.G.; WALSH, T.J.- Evaluation of possible correlations between antifungal susceptibilities of filamentous fungi *in vitro* and antifungal treatment outcomes in animal infection models. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **42(2)**: 282-288, 1998.
- PAUW, B.E.- Practical modalities for prevention of fungal infections in cancer patients. **Eur. J. Clin. Microbiol. Dis.**, **16**: 32-41, 1997.
- PFALLER, M.A. ; MARCO, F.; MESSER, S.A. ; JONES, R.N. -*In vitro* activity of two echinocardin derivatives, LY303366 and MK 0991 against clinical isolates of *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, and other filamentous fungi. **Diag Microbiol. Infect. Dis.**; **30**: 251-255, 1998.
- POWLES R.L.; BARRETT, A.J.; CLINK, H.; KAY, H.E.; SLOANE, J.; MCELWAIN, T.J.- Cyclosporin A for the treatment of graft-versus-host disease in man. **Lancet**, **2**: 1327-1331, 1978.
- PUJOL, I.; GUARRO, J.; SALA, J.; RIBA, M.D.; -Effects of incubation temperature, inoculum size, and time of reading on broth microdilution susceptibility test results for amphotericin B against *Fusarium*. **Antimicrob agents Chemother.**, **41(4)**: 808-811, 1997.
- PUJOL, I.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; SALA, J. - *In vitro* antifungal susceptibility of clinical and environmental *Fusarium* spp. strains. **J. Antimicrob. Chemother.**, **39**: 163-167, 1997.
- RAAD, I.; HACHEN, R.- Treatment of central venous catheter-related fungemia due to *Fusarium oxysporum*. **Clin. Infect. Dis.**, **20**: 709-711, 1995.
- RADFORD, S. A.; JOHNSON, E.M.; LEEMING, J.P.; MILLAR, M.R.; CORNISH, J.M.; FOOT, A. B. M.; WARNOCK, D.W.- Molecular epidemiological study of *Aspergillus fumigatus* in a bone marrow transplantation unit by PCR amplification of ribosomal intergenic spacer sequences.; **J. Clin. Microbiol.**, **36(5)**: 1294-1299, 1998.

- RAPER, B. K.; **The genus *Aspergillus***, 1.ed., Baltimore USA, Williams & Wilkins company, 1965.
- RATH, P.M. -Susceptibility of *Aspergillus* strain from culture collections to amphotericin B and itraconazole. **J. Antimicrob. Chemother.**, **41**: 567-570,1998.
- RATH, P.-M.; ANSORG, R. – Value of environmental sampling and molecular typing of aspergilli to assess nosocomial sources of aspergillosis. **J. Hosp. Infect.**,**37**: 47-53,1997.
- ROMBAUX; ELOY; BERTRAND, B.; DELOS, M.; DOYEN- Lethal disseminated *Fusarium* infection with sinus involvement in the immunocompromised host: case report and review of the literature. **Rhinology**, **34**: 237-241, 1996.
- ROSE, H.R.; HIRSCH, S.R.- Filtering hospital air decreases *Aspergillus* spore counts. **Am Ver Respir Dis.**,**119**(3): 511-513, 1979.
- SALERMO, C.T.; OUYANG, D.W.; PEDERSON, T.S.; LARSON, D.M.; SHAKE, J.P.; JOHNSON, E.M.; MADDAUS, M.A.- Surgical therapy for pulmonary Aspergillosis in immunocompromised patients. **Ann Thorac Surg.**,**65**: 1415-1419, 1998.
- SEGAL, R.; KUSNE, S.- Cerebral fungal infections in the immunocompromised host: a literature review and a new pathogen- *Chaetomium atrobrunneum*: case report. **Neurosurgery** **45**(1): 200, 1999.
- SHEEHAN, D.J.; HITCHCOCK, C.A.; SIBLEY, C. M.– Current and emerging azole antifungal agents. **Clin. Microb. Ver.**,**12**(1): 40-79,1999.
- SIBERRY, G.K.; COSTARANGOS, C.; COHEN, B.A.- Destruction of the nasal septum by *Aspergillus* infection after autologous bone marrow transplantation. **The New England Journal of Medicine**, **337**(4): 275-276, 1997.
- SIDRIM, J.J.; MOREIRA, J.L.B. – **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**, 1.ed., Rio de Janeiro (R.J), Guanabara,1999.

- SIEGEL, S.- **Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento**. São Paulo (SP) Mc Graw Hill, 1975.
- SLAVIN, M.A.; OSBORNE, B.; ADAMS, R.; LEVENSTEIN, M.J.; SCHOCH, H.G.; FELDMAN, A.R.; MEYERS, J.D.; BOWDEN, R.A.- Efficacy and safety of fluconazole prophylaxis for fungal infections after marrow transplantation- a prospective, randomized, double-blind study. **J. Infect. Dis.**, **171**:1545-1552, 1995.
- SMID, T.; SCHOKKIN, E.; BOLEIJ, J.S.M.; HEEDERIK, D.- Enumeration of viable fungi in occupational environments: a comparison of samplers and media. **Am. Ind. Hyg. Assoc. J.**, **50(5)**: 235-239, 1989.
- SOARES, M.M.S.R.; RIBEIRO, M.C.; AMARAL, M.E.C.; TEIXEIRA, A.B.A.; ANTONELLI, L.R.V.; CASTRO, L.C.M.- Micota do ar na cidade de Campinas. **Rev. Bioikos, PUC-Campinas**, **11(1,2)**: 33-39, 1997.
- SUGIURA, Y.; BARR, J.R.; BARR, D.B.; BROCK, J.W.; ELIE, C.M.; UENO, Y. PATTERSON, D.G.J.; POTTER, M.E.; REISS, E. – Physiological characteristics and mycotoxins of human clinical isolates of *Fusarium* species. **Mycol. Rev.**, **103(11)**:1462-1468,1999.
- TAGUCHI, H.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K.; MIN-LI XU. – Studies on the synergistic effect of amphotericin B and 5-fluorocytosine on the growth rate of single hyphae of *Aspergillus fumigatus* by biocell-tracer system. **Micoscience**, **36**: 341-344,1995.
- TEIXEIRA, A.B.A.; TRABASSO, P.; MORETTI-BRANCHINI, M.L.; AOKI, F.H.; VIGORITO, A.C.; MIYAJI, M.; MIKAMI, Y.; TAKADA, M.; SCHEREIBER, A.Z. - Phaeohyphomycoses caused by *Chaetomium globosum* in an allogenic bone marrow transplant recipient. (submitted Clin Infec Dis)
- TRABASSO, P.;- Estudo Clínico-Epidemiológico das Infecções Fúngicas em Receptores de Transplante de Medula Óssea no Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas **Tese de Doutorado da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade estadual de Campinas**, Campinas, S.P, 2001.

- Van BURIK, J.A.; COLVEN, R.; SPACH, D.H.- Cutaneous Aspergillosis. **J. Clin. Microbiol.**, **36 (11)**: 3115-3121, 1998. [Minireview]
- VARLIVARIAN, S.E.; ANAISSIE, E.J.; BODEY, G.P.- Emerging fungal pathogens in immunocompromised patients: classification, diagnosis and management. **Clin. Infect. Dis.**, **17(2)**: 487-491, 1993.
- VENNEWALD, I.; HENKER, M.; KLEMM, E.; SEEBACHER, C.- Fungal colonization of the paranasal sinuses. **Mycoses**, **42(2)**: 33-36, 1999.
- VERWEIJ, P.E.; MENSINK, M.; RIJS, ANTONIUS J.M.M.; DONNELLY, J.P.; MEIS, J.F.M.; DENNING, D.W. – *In vitro* activities of amphotericin B, itraconazole and voriconazole against 150 clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates. **J. Antimicrob. Chemother.**, **42**: 389-392, 1998.
- WINGARD, J.R.- Opportunistic infections after blood and marrow transplant. **Transpl Infect Dis** **1**: 3-20, 1999.
- WOODS, G.L.; DAVIS, J.C.; VAUGHAN, W.P. – Failure of the sterile air-flow component of a protected environment detected demonstration of *Chaetomium* species colonization of four consecutive immunosuppressed occupants. **Infect Control Hospital Epidemiol.**, **9(10)**: 451-456, 1988.
- YUEN, K.Y.; WOO, P.C.Y.; IP, M.S.M.; LIANG, R.H.S.; CHIU, E.K.W.; SIAU, C.H.; HO, P.L.; CHEN, F.F.E.; CHAN, T.K. – Stage-specific manifestation of mold infections in bone marrow transplant recipients: risk factors and clinical significance of positive concentrated smears. **Clin. Infect. Dis.**, **25**: 37-42, 1997.
- ZAITS, C.; CAMPEBELL, I.; MARQUES, S.A.; RUIZ, L.R.B.; SOUZA, V.M.- **Micologia Médica**: 1.ed., Medsi, 1998.



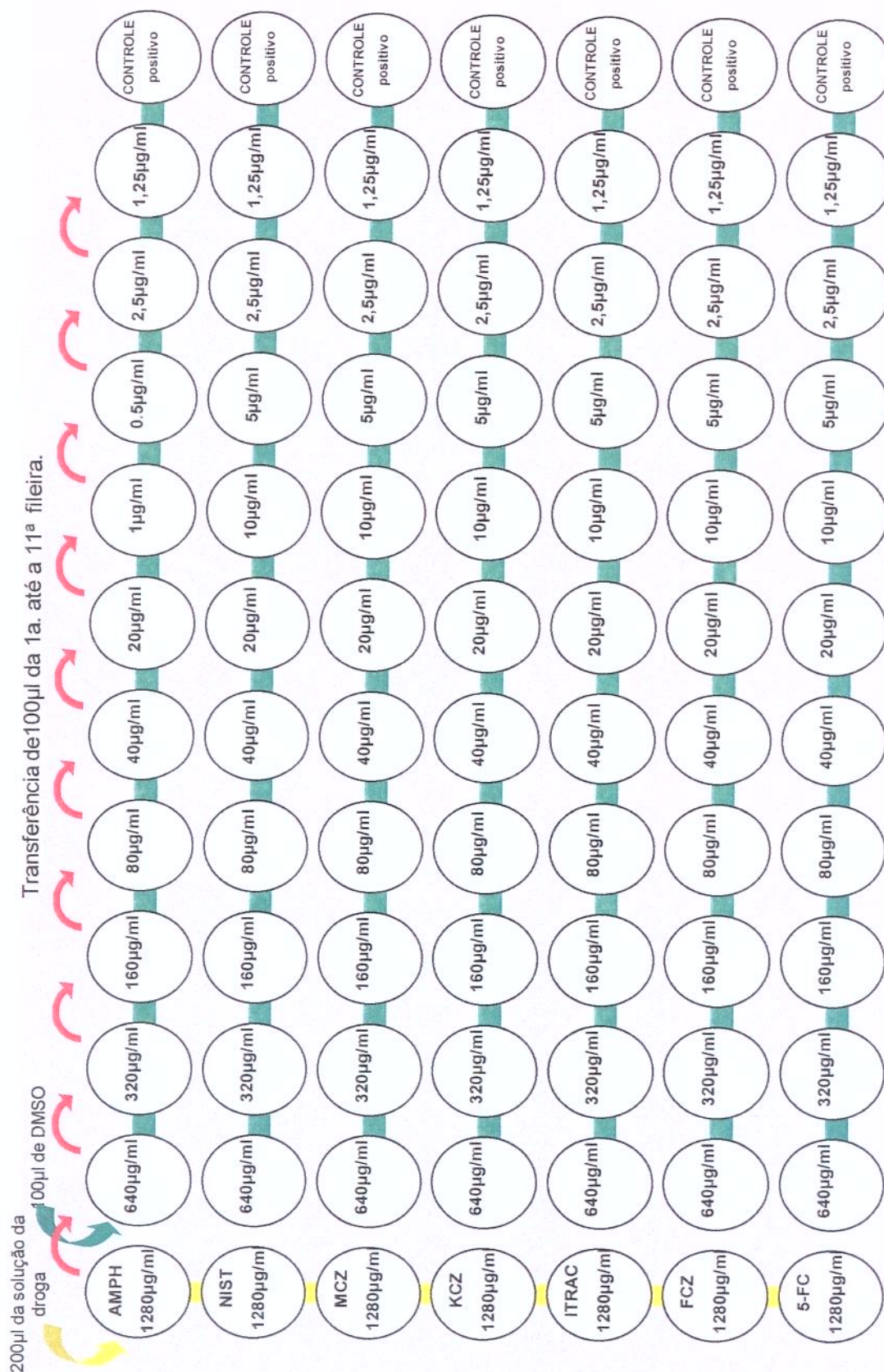
## **9. *ANEXOS***



# Anexo 1

## Esquema detalhado da preparação da Placa de Diluição

900µl de água em todas as fileiras





## Anexo 2

### Fungos filamentosos isolados a partir de espécimes clínicos

AMOSTRA	PACIENTE	REGISTRO	MATERIAL CLÍNICO	DATA DA COLETA	QUARTO	MICROORGANISMO ISOLADO
01P	AAB 50	6934506	swab nasofaringe	23/09/99	*	<i>Cladosporium sp</i>
02P	AB 61	6926147	swab nasofaringe	02/12/99	Q 458	<i>Penicillium sp</i>
03P	ALO 03	6528092	swab nasofaringe	09/11/98	*	<i>Penicillium sp</i>
04P	AM 25	5965045	swab anal	22/02/99	Hemato	<i>Aspergillus fumigatus</i>
05P	ASE 91	7080786	swab nasofaringe	02/05/00	*	<i>Cladosporium sp</i>
06P	ASE 94	7080786	swab nasofaringe	14/05/00	*	<i>Penicillium sp</i>
07P	AZC 78	6304216	escarro	25/02/00	Hemato	<i>Aspergillus niger</i>
08P	BCSDV 51	3244596	swab nasofaringe	13/10/99	Hemato	<i>Penicillium sp</i>
09P	BCSDV 51/2	3244596	swab nasofaringe	13/10/99	Hemato	<i>Paecilomyces sp</i>
10P	CF 62	6596758	swab nasofaringe	29/11/99	Q 452	<i>Penicillium sp</i>
11P	CF 97	6596758	swab nasofaringe	17/05/00	*	<i>Curvularia sp</i>
12P	CHFB 80	7084417	swab nasofaringe	28/02/00	*	<i>Paecilomyces sp</i>
13P	CMZ 84	7061615	escarro	12/04/00	Hemato	<i>Aspergillus niger</i>
14P	CRS 32	6546644	swab nasofaringe	28/04/99	*	<i>Penicillium sp</i>
15P	CRS 18	6546644	swab anal	25/01/99	*	<i>Aspergillus sp</i>
16P	DM 85	4661452	swab nasofaringe	02/05/00	*	<i>Fusarium sp</i>
17P	DPS 39	6152881	swab nasofaringe	07/06/99	Q 458	<i>Cladosporium sp</i>
18P	DPS 44	6152881	swab nasofaringe	21/06/99	Q 450	<i>Cladosporium sp</i>
19P	DRCLT 64	5787277	swab nasofaringe	06/12/99	Q 456	<i>Cladosporium sp</i>
20P	EF 49	5948108	swab nasofaringe	25/07/99	*	<i>Cladosporium sp</i>
21P	EG 58	6555536	swab nasofaringe	16/11/99	Q 454	<i>Cladosporium sp</i>
22P	EG 59	6555536	swab nasofaringe	13/12/99	Q 454	<i>Aspergillus flavus</i>
23P	EG 65	6555536	swab nasofaringe	13/12/99	Q 454	<i>Aspergillus flavus</i>
24P	EG 66	6555536	lavado broncoalveolar	21/12/99	Q 454	<i>Aspergillus flavus</i>
25P	EG 68	6555536	swab orofaringe	04/01/00	Q 454	<i>Aspergillus flavus</i>
26P	EG 69	6555536	swab anal	04/01/00	Q 454	<i>Aspergillus terreus</i>
27P	EG 71	6555536	swab orofaringe	07/02/00	Q 456	<i>Aspergillus flavus</i>
28P	EG 75	6555536	swab nasofaringe	07/02/00	Q 456	<i>Cladosporium sp</i>
29P	EG 83	6555536	swab orofaringe	10/04/00	*	<i>Aspergillus terreus</i>
30P	EG 86	6555536	swab nasofaringe	17/04/00	*	<i>Penicillium sp</i>
31P	EG 98	6555536	swab nasofaringe	07/06/00	*	<i>Penicillium sp</i>
32P	ERO 56	6638360	swab anal	08/11/99	Q 450	<i>Aspergillus sp</i>
33P	ES 79	6851740	swab nasofaringe	28/02/00	*	<i>Paecilomyces sp</i>
34P	FAM 37	6393586	swab nasofaringe	24/05/99	Q 450	<i>Cladosporium sp</i>
35P	GAM 52/1	3938367	secreção purulenta	13/10/99	Q 454	<i>Fusarium sp</i>
36P	GAM 52/2a	3938367	inter-digitais	13/10/99	Q 454	<i>Fusarium sp</i>
37P	GAM 52/2b	3938367	inter-digitais	13/10/99	Q 454	<i>Aspergillus versicolor</i>
38P	GAM 52/3	3938367	secreção purulenta	13/10/99	Q 454	<i>Fusarium sp</i>
39P	GAM 52/4	3938367	inter-digitais	13/10/99	Q 454	<i>Fusarium sp</i>
40P	GAM 54	3938367	swab nasofaringe	03/11/99	Q 460	<i>Penicillium sp</i>
41P	GAR 20	6588208	swab nasofaringe	21/02/99	*	<i>Penicillium sp</i>
42P	GAR 26	6588208	swab nasofaringe	17/03/99	Q 456	<i>Penicillium sp</i>
43P	GECB 55	6923321	swab nasofaringe	01/11/99	Q 454	<i>Cladosporium sp</i>
44P	HDS 43	6347276	escarro	22/06/99	*	<i>Aspergillus flavus</i>
45P	IDO 42	4078394	swab nasofaringe	14/06/99	Q 454	<i>Cladosporium sp</i>
46P	IDO 46	4078394	swab nasofaringe	05/07/99	Q 454	<i>Cladosporium sp</i>
47P	JAS 31	6182737	swab nasofaringe	19/04/99	Hemato	<i>Aspergillus sp</i>
48P	JBMC 63	6931885	swab nasofaringe	06/12/99	Q 452	<i>Cladosporium sp</i>
49P	JFS 87	6625842	swab orofaringe	17/04/00	*	<i>Penicillium sp</i>
50P	JFS 89	6625842	swab nasofaringe	23/04/99	*	<i>Cladosporium sp</i>
51P	JLM 17	6612083	escarro	25/01/99	Hemato	<i>Aspergillus fumigatus</i>

\* não foi possível determinar o quarto que o paciente ocupava no momento da coleta.

## Anexo 2

(Continuação)

AMOSTRA	PACIENTE	REGISTRO	MATERIAL CLÍNICO	DATA DA COLETA	QUARTO	MICRORGANISMO ISOLADO
52P	JMO 48	5444013	swab nasofaringe	19/07/99	Q 452	<i>Cladosporium sp</i>
53P	LCC 02	6567876	swab nasofaringe	04/11/98	Hemato	<i>Fusarium sp</i>
54P	LCS 57	6847230	swab orofaringe	22/11/99	Q 460	<i>Paecilomyces sp</i>
55P	LGM 01	5564815	swab nasofaringe	03/11/98	*	<i>Penicillium sp</i>
56P	LGM 09	5564815	swab nasofaringe	23/11/98	*	<i>Cladosporium sp</i>
57P	LJ 96	7193375	urina	23/05/00	Hemato	<i>Fusarium sp</i>
58P	LSO 08	6584981	swab nasofaringe	23/11/98	*	<i>Penicillium sp</i>
59P	LSO 35	6584981	swab nasofaringe	24/05/99	Q 452	<i>Cladosporium sp</i>
60P	MAA 92	6935148	swab orofaringe	02/05/00	*	<i>Cladosporium sp</i>
61P	MAA 93	6935148	swab nasofaringe	14/05/00	*	<i>Penicillium sp</i>
62P	MAA 95	6935148	swab nasofaringe	21/05/00	*	<i>Cladosporium sp</i>
63P	MAO 88	5680736	swab nasofaringe	17/04/00	*	<i>Penicillium sp</i>
64P	MAO 90	5680736	swab nasofaringe	24/04/00	*	<i>Paecilomyces sp</i>
65P	MBS 36	6556932	swab nasofaringe	24/05/99	Q 458	<i>Cladosporium sp</i>
66P	MCM 16	5949245	swab nasofaringe	25/01/99	*	<i>Penicillium sp</i>
67P	MCV 10	4676695	lavado broncoalveolar	19/11/98	Hemato	<i>Fusarium solani</i>
68P	MLMP 30	4730217	swab orofaringe	18/04/99	Hemato	<i>Aspergillus sp</i>
69P	MMC 70	6377627	escarro	19/01/00	*	<i>Aspergillus niger</i>
70P	NVG 53	4908983	swab orofaringe	25/10/99	Q 456	<i>Penicillium sp</i>
71P	NVG 60	4908983	swab nasofaringe	06/12/99	Q 450	<i>Aspergillus niger</i>
72P	OP 74	6563595	swab nasofaringe	07/02/00	Q 460	<i>Cladosporium sp</i>
73P	PC 07	6568363	swab nasofaringe	23/11/98	*	<i>Penicillium sp</i>
74P	PPS 41	6476879	swab nasofaringe	07/06/99	Q 452	<i>Cladosporium sp</i>
75P	PPS 76	6476879	swab nasofaringe	31/01/00	Q 450	<i>Fusarium moniliforme</i>
76P	RBS 34	6279512	escarro	19/05/99	Hemato	<i>Aspergillus fumigatus</i>
77P	RPRR 73	6563595	swab nasofaringe	07/02/00	*	<i>Penicillium sp</i>
78P	RR 72	7003710	swab anal	17/01/00	*	<i>Aspergillus sp</i>
79P	SJF 04	5944422	swab orofaringe	11/11/98	Hemato	<i>Aspergillus fumigatus</i>
80P	SRB 27	6619108	swab nasofaringe	22/03/99	*	<i>Aspergillus sp</i>
81P	SRB 28	6619108	swab nasofaringe	29/03/99	*	<i>Cladosporium sp</i>
82P	WHVL 06	6494594	swab nasofaringe	09/11/98	Hemato	<i>Penicillium sp</i>
83P	AB 81	6926147	linfonodo axilar direito	20/03/00	Q 460	<i>Chaetomium sp</i>
84P	AB 82	6926147	linfonodo epitroclear	20/03/00	Q 460	<i>Chaetomium sp</i>

\* não foi possível determinar o quarto que o paciente ocupava no momento da coleta.

Anexo 3

Fungos filamentosos isolados na avaliação ambiental da Unidade de TMO, de março de 1999 a março de 2000

AMOSTRA NÚMERO	ÁREA	DATA DA COLETA	MICRORGANISMO NÚMERO	IDENTIFICAÇÃO
001A	Quarto 448	08/06/99	079-d	<i>Penicillium</i> sp
002A	Quarto 448	23/06/99	098-c	<i>Curvularia</i> sp
003A	Quarto 448	22/07/99	140-a	<i>Monilia Sitophila</i>
004A	Quarto 448	05/08/99	148-a	<i>Penicillium</i> sp
005A	Quarto 448	25/02/00	408-b	<i>Penicillium</i> sp
006A	Banheiro 448	08/06/00	080-b	<i>Fusarium oxysporum</i>
007A	Banheiro 448	29/10/00	255-b	<i>Fusarium</i> sp
008A	Quarto 450	24/05/99	060-a	<i>Epicoccum</i> sp
009A	Quarto 450	05/07/99	114-a	<i>Penicillium</i> sp
010A	Quarto 450	13/10/99	228-a	<i>Chaetomium</i> sp
011A	Quarto 450	13/10/99	228-c	<i>Chaetomium</i> sp
012A	Quarto 450	13/10/99	228-d	<i>Curvularia</i> sp
013A	Quarto 450	13/10/99	228-f	<i>Chaetomium</i> sp
014A	Quarto 450	13/10/99	228-g	<i>Chaetomium</i> sp
015A	Quarto 450	26/10/99	249-a	<i>Aspergillus</i> sp
016A	Quarto 450	17/12/99	318-a	<i>Penicillium</i> sp
017A	Quarto 450	09/03/00	420-c	<i>Penicillium</i> sp
018A	Banheiro 450	24/05/99	061-a	<i>Aspergillus versicolor</i>
019A	Banheiro 450	07/06/99	077-d	<i>Sepedonium</i> sp
020A	Banheiro 450	21/06/99	096-a	<i>Bipolaris</i> sp
021A	Banheiro 450	13/09/99	193-b	<i>Aspergillus niger</i>
022A	Quarto 452	14/07/99	125-a	<i>Penicillium</i> sp
023A	Quarto 452	15/09/99	198-a	<i>Monilia Sitophila</i>
024A	Quarto 452	15/12/99	314-b	<i>Alternaria</i> sp
025A	Quarto 452	15/12/99	314-c	<i>Epicoccum</i> sp
026A	Quarto 452	13/03/00	425-b	<i>Curvularia</i> sp
027A	Banheiro 452	20/04/99	022-b	<i>Aspergillus versicolor</i>
028A	Banheiro 452	20/04/99	022-d	<i>Aspergillus versicolor</i>
029A	Banheiro 452	03/11/99	260-c	<i>Penicillium</i> sp
030A	Banheiro 452	03/11/99	260-d	<i>Alternaria</i> sp
031A	Banheiro 452	04/02/00	382-a	<i>Penicillium</i> sp
032A	Banheiro 452	25/02/00	409-b	<i>Aspergillus flavus</i>
033A	Banheiro 452	31/03/00	444-a	<i>Aspergillus</i> sp
034A	Quarto 454	19/05/99	051-a	<i>Penicillium</i> sp
035A	Quarto 454	22/10/99	244-a	<i>Penicillium</i> sp
036A	Quarto 454	03/01/00	335-b	<i>Aspergillus</i> sp
037A	Quarto 454	17/02/00	397-a	<i>Aspergillus</i> sp
038A	Banheiro 454	03/11/99	258-b	<i>Penicillium</i> sp
039A	Banheiro 454	09/12/99	307-b	<i>Aspergillus flavus</i>
040A	Banheiro 454	09/12/99	307-d	<i>Aspergillus</i> sp
041A	Quarto 456	15/09/99	195-a	<i>Monilia Sitophila</i>
042A	Quarto 456	15/09/99	195-a1	<i>Penicillium</i> sp
043A	Quarto 456	27/09/99	214-a	<i>Penicillium</i> sp
044A	Quarto 456	19/10/99	242-e	<i>Aspergillus versicolor</i>
045A	Quarto 456	22/10/99	246-a	<i>Aspergillus versicolor</i>
046A	Quarto 456	22/10/99	246-c	<i>Chaetomium</i> sp
047A	Quarto 456	29/10/99	253-b	<i>Phoma</i> sp
048A	Quarto 456	29/10/99	253-d	<i>Aspergillus versicolor</i>
049A	Quarto 456	04/11/99	263-e	<i>Aspergillus fumigatus</i>
050A	Quarto 456	27/12/99	330-a	<i>Penicillium</i> sp
051A	Quarto 456	07/02/00	383-b	<i>Penicillium</i> sp
052A	Banheiro 456	20/04/99	024-a	<i>Penicillium</i> sp

Anexo 3  
(Continuação)

AMOSTRA NÚMERO	ÁREA	DATA DA COLETA	MICROORGANISMO NÚMERO	IDENTIFICAÇÃO
053A	Banheiro 456	20/04/99	024-b	<i>Penicillium sp</i>
054A	Banheiro 456	20/04/99	024-c	<i>Penicillium sp</i>
055A	Banheiro 456	15/09/99	196-a	<i>Monilia Sitophilia</i>
056A	Banheiro 456	22/10/99	247-a	<i>Aspergillus spp</i>
057A	Banheiro 456	18/11/99	282-c	<i>Paecilomyces sp</i>
058A	Banheiro 456	11/08/00	154-a	<i>Fusarium moniliforme</i>
059A	Quarto 458	16/09/99	200-d	<i>Acremonium sp</i>
060A	Quarto 458	01/10/99	217-a	<i>Penicillium sp</i>
061A	Quarto 458	18/11/99	279-c	<i>Paecilomyces sp</i>
062A	Quarto 458	06/12/99	302-b	<i>Monilia sitophilia</i>
063A	Quarto 458	18/01/00	357-a	<i>Aspergillus sp</i>
064A	Quarto 458	27/03/00	438-a	<i>Paecilomyces sp</i>
065A	Banheiro 458	05/05/99	035-b	<i>Fusarium moniliforme</i>
066A	Banheiro 458	05/05/99	035-d	<i>Fusarium moniliforme</i>
067A	Banheiro 458	01/07/99	113-b	<i>Penicillium sp</i>
068A	Banheiro 458	18/08/99	166-a	<i>Penicillium sp</i>
069A	Banheiro 458	01/10/99	217-b	<i>Epicocum sp</i>
070A	Banheiro 458	18/01/00	358-b	<i>Alternaria sp</i>
071A	Banheiro 458	24/01/00	363-a	<i>Curvularia sp</i>
072A	Quarto 460	21/07/99	137-a	<i>Epicocum sp</i>
073A	Quarto 460	21/09/99	203-a	<i>Penicillium sp</i>
074A	Quarto 460	16/11/99	277-c	<i>Alternaria sp</i>
075A	Quarto 460	03/01/00	341-b	<i>Nigrospora sp</i>
076A	Quarto 460	21/02/00	403-b	<i>Aspergillus sp</i>
077A	Quarto 460	05/07/00	116-a	<i>Aspergillus versicolor</i>
078A	Banheiro 460	21/06/99	093-c	<i>Nigrospora sp</i>
079A	Banheiro 460	08/09/99	183-c	<i>Penicillium sp</i>
080A	Banheiro 460	21/09/99	204-a	<i>Penicillium sp</i>
081A	Banheiro 460	16/11/99	278-d	<i>Nigrospora sp</i>
082A	Banheiro 460	02/03/00	414-c	<i>Nigrospora sp</i>
083A	copa	06/05/99	038-a	<i>Penicillium sp</i>
084A	copa	06/05/99	038-b	<i>Penicillium sp</i>
085A	copa	10/05/99	043-b	<i>Penicillium sp</i>
086A	copa	07/06/99	078-a	<i>Phoma sp</i>
087A	copa	14/06/99	084-a	<i>Monilia Sitophilia</i>
088A	copa	02/09/99	181-b	<i>Penicillium sp</i>
089A	copa	09/09/99	190-a	<i>Penicillium sp</i>
090A	copa	09/09/99	190-b	<i>Penicillium sp</i>
091A	copa	16/09/99	202-a	<i>Penicillium sp</i>
092A	copa	04/10/99	220-d	<i>Stachybotrys sp</i>
093A	copa	13/10/99	227-a	<i>Monilia Sitophilia</i>
094A	copa	19/10/99	239-e	<i>Monilia sitophilia</i>
095A	copa	02/12/99	299-b	<i>Penicillium sp</i>
096A	copa	03/01/00	345-a	<i>Penicillium sp</i>
097A	copa	13/01/00	350-b	<i>Penicillium sp</i>
098A	copa	18/01/00	361-a	<i>Curvularia sp</i>
099A	copa	14/02/00	393-b	<i>Paecilomyces sp</i>
100A	copa	14/02/00	393-d	<i>Pestalotiopsis guepinii</i>
101A	copa	25/02/00	412-b	<i>Penicillium sp</i>
102A	copa	25/02/00	412-c	<i>Paecilomyces sp</i>
103A	copa	02/03/00	415-d	<i>Curvularia sp</i>
104A	copa	27/03/00	440-b	<i>Aspergillus sp</i>

Anexo 3  
(Continuação)

AMOSTRA NÚMERO	ÁREA	DATA DA COLETA	MICROORGANISMO NÚMERO	IDENTIFICAÇÃO
105A	copa	27/03/00	440-c	<i>Pestalotiopsis gypsum</i>
106A	corredor	15/09/99	197-a	<i>Monilia Sitophila</i>
107A	corredor	19/10/99	238-e	<i>Monilia sitophila</i>
108A	corredor	27/12/99	328-c	<i>Penicillium sp</i>
109A	corredor	27/12/99	328-d	<i>Pestalotiopsis guepinii</i>
110A	corredor	24/01/00	364-a	<i>Penicillium sp</i>
111A	corredor	24/01/00	364-d	<i>Paecilomyces sp</i>
112A	sala de reunião	21/07/99	134-b	<i>Penicillium sp</i>
113A	sala de reunião	13/10/99	227-c	<i>Penicillium sp</i>
114A	sala de reunião	13/10/99	230-d	<i>Penicillium sp</i>
115A	sala de reunião	13/10/99	230-g	<i>Chaetomium sp</i>
116A	sala de reunião	04/11/99	267-e	<i>Penicillium sp</i>
117A	sala de reunião	04/11/99	267-f	<i>Exserohilum sp</i>
118A	sala de reunião	04/11/99	267-g	<i>Alternaria sp</i>
119A	sala de reunião	04/11/99	267-h	<i>Pestalotiopsis guepinii</i>
120A	sala de reunião	04/11/99	267-i	<i>Nigrospora sp</i>
121A	sala de reunião	12/11/99	270-d	<i>Penicillium sp</i>
122A	sala de reunião	24/11/99	290-c	<i>Aspergillus flavus</i>
123A	sala de reunião	24/11/99	290-d	<i>Aspergillus sp</i>
124A	sala de reunião	07/02/00	385-b	<i>Aspergillus niger</i>
125A	expurgo	23/03/99	002-c	<i>Penicillium sp</i>
126A	expurgo	26/04/99	030-a	<i>Penicillium sp</i>
127A	expurgo	26/04/99	030-c	<i>Penicillium sp</i>
128A	expurgo	31/05/99	069-d	<i>Alternaria sp</i>
129A	expurgo	30/06/99	108-b	<i>Penicillium sp</i>
130A	expurgo	14/07/99	122-c	<i>Penicillium sp</i>
131A	expurgo	16/08/99	160-c	<i>Aureobasidium sp</i>
132A	expurgo	13/09/99	193-c	<i>Penicillium sp</i>
133A	expurgo	27/09/99	213-a	<i>Epicocum sp</i>
134A	expurgo	27/09/99	213-b	<i>Paecilomyces sp</i>
135A	expurgo	13/10/99	232-f	<i>Chaetomium sp</i>
136A	expurgo	24/11/99	291-a	<i>Exserohilum sp</i>
137A	expurgo	24/11/99	291-f	<i>Nigrospora sp</i>
138A	expurgo	13/12/99	310-c	<i>Monilia sitophila</i>
139A	expurgo	13/01/00	349-a	<i>Aspergillus niger</i>
140A	expurgo	13/01/00	349-b	<i>Penicillium sp</i>
141A	expurgo	14/02/00	392-e	<i>Aspergillus versicolor</i>
142A	expurgo	26/04/00	030-b	<i>Aspergillus versicolor</i>
143A	expurgo	14/07/00	122-a	<i>Aspergillus niger</i>
144A	expurgo	14/07/00	122-e	<i>Fusarium moniliforme</i>
145A	sala de material	21/07/99	135-a	<i>Penicillium sp</i>
146A	sala de material	13/10/99	231-b	<i>Penicillium sp</i>
147A	sala de material	13/10/99	231-d	<i>Chaetomium sp</i>
148A	sala de material	14/02/00	391-a	<i>Paecilomyces sp</i>
149A	posto de enfermagem	10/05/99	040-a	<i>Fusarium moniliforme</i>
150A	posto de enfermagem	14/06/99	083-a	<i>Penicillium sp</i>
151A	posto de enfermagem	14/06/99	083-b	<i>Aspergillus versicolor</i>
152A	posto de enfermagem	14/06/99	083-c	<i>Scopulariopsis sp</i>
153A	posto de enfermagem	12/07/99	121-c	<i>Penicillium sp</i>
154A	posto de enfermagem	27/09/99	212-a	<i>Penicillium sp</i>
155A	posto de enfermagem	27/09/99	212-c	<i>Acremonium sp</i>
156A	posto de enfermagem	27/09/99	212-c1	<i>Chaetomium sp</i>

# Anexo 3

(Continuação)

AMOSTRA NÚMERO	ÁREA	DATA DA COLETA	MICROORGANISMO NÚMERO	IDENTIFICAÇÃO
157A	posto de enfermagem	26/10/99	248-c	<i>Monilia sitophila</i>
158A	posto de enfermagem	22/11/99	285-c	<i>Aspergillus spp</i>
159A	posto de enfermagem	18/01/00	356-b	<i>Penicillium sp</i>
160A	posto de enfermagem	18/01/00	356-c	<i>Aspergillus sp</i>
161A	posto de enfermagem	21/02/00	406-c	<i>Penicillium sp</i>
162A	posto de enfermagem	21/02/00	406-f	<i>Aspergillus sp</i>
163A	posto de enfermagem	10/05/00	040-c	<i>Fusarium moniliforme</i>
164A	posto de enfermagem	10/05/00	040-d	<i>Fusarium sp</i>
165A	sala de limpeza	13/10/99	233-d	<i>Penicillium sp</i>
166A	sala de limpeza	13/12/99	311-c	<i>Monilia sitophila</i>
167A	sala de limpeza	13/01/00	351-a	<i>Paecilomyces sp</i>



Dados obtidos a partir de coletas do ar ambiental da Unidade de TMO, de março de 1999 a março de 2000, distribuídos por estações do ano

	PRIMAVERA 23/9-22/12	VERÃO 23/12-19/03	OUTONO 20/03-20/06	INVERNO 21/06-22/09	TOTAL
<b>TOTAL DE COLETAS</b>	116 (100%)	107 (100%)	107 (100%)	114 (100%)	444 (100%)
<b>COLETAS POSITIVAS</b>	90 (77,6%)	82 (76,6%)	69 (64,5%)	78 (68,4%)	319 (71,8%)
<b>COLETAS NEGATIVAS</b>	26 (22,4%)	25 (23,4%)	38 (35,5%)	36 (31,6%)	125 (28,2%)
<i>Acremonium sp</i>	1 (0,427%)	0	0	1 (0,628%)	2 (0,273%)
<i>Alternaria sp</i>	4 (1,709%)	1 (0,496%)	1 (0,704%)	0	6 (0,812%)
<i>Aspergillus sp</i>	11 (4,700%)	10 (4,901%)	7 (4,929%)	3 (1,886%)	31 (4,194%)
<i>Aureobasidium sp</i>	0	0	0	1 (0,628%)	1 (0,135%)
<i>Bipolaris sp</i>	0	0	0	1 (0,628%)	1 (0,135%)
<i>Chaetomium sp</i>	9 (3,846%)	0	0	0	9 (1,217%)
<i>Cladosporium sp</i>	54 (23,076%)	48 (23,529%)	38 (26,760%)	78 (49,056%)	218 (29,499%)
<i>Curvularia sp</i>	1 (0,427%)	4 (1,960%)	0	1 (0,628%)	6 (0,812%)
<i>Epicoccum sp</i>	3 (1,284%)	0	1 (0,704%)	1 (0,628%)	5 (0,676%)
<i>Exserohilum sp</i>	2 (0,856%)	0	0	0	2 (0,273%)
<i>Fusarium sp</i>	1 (0,427%)	0	6 (4,225%)	2 (1,257%)	9 (1,217%)
<i>Monilia sitophila</i>	7 (2,991%)	0	1 (0,704%)	5 (3,144%)	13 (1,759%)
<i>Nigrospora sp</i>	3 (1,284%)	2 (0,980%)	0	1 (0,628%)	6 (0,812%)
<i>Paecylomices sp</i>	3 (1,284%)	5 (2,450%)	1 (0,704%)	0	9 (1,217%)
<i>Penicillium sp</i>	14 (5,982%)	13 (6,372%)	12 (8,450%)	19 (11,960%)	58 (7,848%)
<i>Pestalotiopsis guipini</i>	1 (0,427%)	2 (0,980%)	1 (0,704%)	0	4 (0,541%)
<i>Phoma sp</i>	1 (0,427%)	0	1 (0,704%)	0	2 (0,273%)
<i>Scopulariopsis sp</i>	0	0	1 (0,704%)	0	1 (0,135%)
<i>Sepedomium sp</i>	0	0	1 (0,704%)	0	1 (0,135%)
<i>Stachybotrys sp</i>	1 (0,427%)	0	0	0	1 (0,135%)
<b>Fungos demáceos</b>	27 (11,538%)	20 (9,803%)	32 (22,540%)	17 (10,691%)	96 (12,990%)
<b>Fungos hialinos</b>	91 (98,888%)	99 (48,529%)	39 (27,464%)	29 (18,238%)	258 (34,912%)
<b>Total de fungos filamentosos</b>	234 (100%)	204 (100%)	142 (100%)	159 (100%)	739 (100%)



## Anexo 5

### Teste de crescimento das cepas de fungos filamentosos isoladas a partir de espécimes clínicos

AMOSTRA	MICROORGANISMO	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO	
		35°C	37°C
01P	<i>Cladosporium</i> sp	( - )	*
02P	<i>Penicillium</i> sp	( + )	( + )
03P	<i>Penicillium</i> sp	( - )	*
04P	<i>Aspergillus fumigatus</i>	( + )	( + )
05P	<i>Cladosporium</i> sp	( - )	*
06P	<i>Penicillium</i> sp	( + )	( + )
07P	<i>Aspergillus niger</i>	( + )	( + )
08P	<i>Penicillium</i> sp	( + )	( + )
09P	<i>Paecilomyces</i> sp	( + )	( + )
10P	<i>Penicillium</i> sp	( - )	*
11P	<i>Curvularia</i> sp	( - )	*
12P	<i>Paecilomyces</i> sp	( + )	( + )
13P	<i>Aspergillus niger</i>	( + )	( + )
14P	<i>Penicillium</i> sp	( - )	*
15P	<i>Aspergillus</i> sp	( - )	*
16P	<i>Fusarium</i> sp	( - )	*
17P	<i>Cladosporium</i> sp	( - )	*
18P	<i>Cladosporium</i> sp	( - )	*
19P	<i>Cladosporium</i> sp	( - )	*
20P	<i>Cladosporium</i> sp	( - )	*
21P	<i>Cladosporium</i> sp	( - )	*
22P	<i>Aspergillus flavus</i>	( + )	( + )
23P	<i>Aspergillus flavus</i>	( + )	( + )
24P	<i>Aspergillus flavus</i>	( + )	( + )
25P	<i>Aspergillus flavus</i>	( + )	( + )
26P	<i>Aspergillus terreus</i>	( + )	( + )
27P	<i>Aspergillus flavus</i>	( + )	( + )
28P	<i>Cladosporium</i> sp	( - )	*
29P	<i>Aspergillus terreus</i>	( + )	( + )
30P	<i>Penicillium</i> sp	( + )	( + )
31P	<i>Penicillium</i> sp	( - )	*
32P	<i>Aspergillus</i> sp	( - )	*
33P	<i>Paecilomyces</i> sp	( + )	( + )
34P	<i>Cladosporium</i> sp	( - )	*
35P	<i>Fusarium</i> sp	( + )	( + )
36P	<i>Fusarium</i> sp	( + )	( + )
37P	<i>Aspergillus versicolor</i>	( + )	( + )
38P	<i>Fusarium</i> sp	( + )	( + )
39P	<i>Fusarium</i> sp	( + )	( + )
40P	<i>Penicillium</i> sp	( + )	( + )
41P	<i>Penicillium</i> sp	( + )	( + )
42P	<i>Penicillium</i> sp	( - )	*
43P	<i>Cladosporium</i> sp	( - )	*
44P	<i>Aspergillus flavus</i>	( + )	( + )

\* Teste não realizado, ( + ) crescimento positivo, ( - ) ausência de crescimento

# Anexo 5

(Continuação)

AMOSTRA	MICRORGANISMO	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO	
		35°C	37°C
45P	<i>Cladosporium</i> sp	( - )	*
46P	<i>Cladosporium</i> sp	( - )	*
47P	<i>Aspergillus</i> sp	( + )	( - )
48P	<i>Cladosporium</i> sp	( - )	*
49P	<i>Penicillium</i> sp	( - )	*
50P	<i>Cladosporium</i> sp	( - )	*
51P	<i>Aspergillus fumigatus</i>	( + )	( + )
52P	<i>Cladosporium</i> sp	( - )	*
53P	<i>Fusarium</i> sp	( - )	*
54P	<i>Paecilomyces</i> sp	( + )	( + )
55P	<i>Penicillium</i> sp	( - )	*
56P	<i>Cladosporium</i> sp	( - )	*
57P	<i>Fusarium</i> sp	( + )	( + )
58P	<i>Penicillium</i> sp	( + )	( - )
59P	<i>Cladosporium</i> sp	( - )	*
60P	<i>Cladosporium</i> sp	( - )	*
61P	<i>Penicillium</i> sp	( + )	( + )
62P	<i>Cladosporium</i> sp	( - )	*
63P	<i>Penicillium</i> sp	( + )	( + )
64P	<i>Paecilomyces</i> sp	( + )	( + )
65P	<i>Cladosporium</i> sp	( - )	*
66P	<i>Penicillium</i> sp	( + )	( - )
67P	<i>Fusarium solani</i>	( + )	( + )
68P	<i>Aspergillus</i> sp	( + )	( - )
69P	<i>Aspergillus niger</i>	( + )	( + )
70P	<i>Penicillium</i> sp	( + )	( + )
71P	<i>Aspergillus niger</i>	( + )	( + )
72P	<i>Cladosporium</i> sp	( - )	*
73P	<i>Penicillium</i> sp	( + )	( - )
74P	<i>Cladosporium</i> sp	( - )	*
75P	<i>Fusarium moniliforme</i>	( + )	( + )
76P	<i>Aspergillus fumigatus</i>	( + )	( + )
77P	<i>Penicillium</i> sp	( + )	( + )
78P	<i>Aspergillus</i> sp	( + )	( + )
79P	<i>Aspergillus fumigatus</i>	( + )	( + )
80P	<i>Aspergillus</i> sp	( - )	*
81P	<i>Cladosporium</i> sp	( - )	*
82P	<i>Penicillium</i> sp	( - )	*
83P	<i>Chaetomium</i> sp	( )	( )
84P	<i>Chaetomium</i> sp	( )	( )

\* Teste não realizado, ( + ) crescimento satisfatório, ( - ) ausência de crescimento

## Anexo 6

### Teste de crescimento das cepas de fungos filamentosos isoladas do ambiente

AMOSTRA	MICRORGANISMO	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO	
		35°C	37°C
001A	<i>Penicillium sp</i>	( - )	*
002A	<i>Curvularia sp</i>	( + )	( + )
003A	<i>Monilia sitophila</i>	( - )	*
004A	<i>Penicillium sp</i>	( + )	( + )
005A	<i>Penicillium sp</i>	( + )	( - )
006A	<i>Fusarium oxysporum</i>	( + )	( - )
007A	<i>Fusarium sp</i>	( + )	( + )
008A	<i>Epicocum sp</i>	( - )	*
009A	<i>Penicillium sp</i>	( - )	*
010A	<i>Chaetomium sp</i>	( + )	( + )
011A	<i>Chaetomium sp</i>	( + )	( - )
012A	<i>Curvularia sp</i>	( + )	( - )
013A	<i>Chaetomium sp</i>	( - )	*
014A	<i>Chaetomium sp</i>	( + )	( - )
015A	<i>Aspergillus spp</i>	( - )	*
016A	<i>Penicillium sp</i>	( - )	*
017A	<i>Penicillium sp</i>	( + )	( + )
018A	<i>Aspergillus versicolor</i>	( + )	*
019A	<i>Sepedomium sp</i>	( - )	*
020A	<i>Bipolaris sp</i>	( - )	*
021A	<i>Aspergillus niger</i>	( + )	( + )
022A	<i>Penicillium sp</i>	( + )	( + )
023A	<i>Monilia Sitophila</i>	( + )	( + )
024A	<i>Alternaria sp</i>	( + )	( - )
025A	<i>Epicoccum sp</i>	( - )	*
026A	<i>Curvularia sp</i>	( + )	( + )
027A	<i>Aspergillus versicolor</i>	( + )	*
028A	<i>Aspergillus versicolor</i>	( + )	*
029A	<i>Penicillium sp</i>	( + )	( - )
030A	<i>Alternaria sp</i>	( - )	*
031A	<i>Penicillium sp</i>	( - )	*
032A	<i>Aspergillus flavus</i>	( + )	( + )
033A	<i>Aspergillus sp</i>	( + )	( + )
034A	<i>Penicillium sp</i>	( - )	*
035A	<i>Penicillium sp</i>	( + )	( + )
036A	<i>Aspergillus sp</i>	( - )	*
037A	<i>Aspergillus sp</i>	( - )	*
038A	<i>Penicillium sp</i>	( + )	( + )
039A	<i>Aspergillus fumigatus</i>	( + )	( + )
040A	<i>Aspergillus sp</i>	( + )	( + )
041A	<i>Monilia Sitophila</i>	( - )	*
042A	<i>Penicillium sp</i>	( + )	( - )
043A	<i>Penicillium sp</i>	( - )	*
044A	<i>Aspergillus versicolor</i>	( + )	( + )

\*Teste não realizado, ( + ) crescimento satisfatório, ( - ) ausência de crescimento.

Anexo 6

(Continuação)

AMOSTRA	MICRORGANISMO	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO	
		35°C	37°C
045A	<i>Aspergillus versicolor</i>	(+)	(+)
046A	<i>Chaetomium sp</i>	(+)	(-)
047A	<i>Phoma sp</i>	(-)	*
048A	<i>Aspergillus versicolor</i>	(+)	(+)
049A	<i>Aspergillus fumigatus</i>	(+)	(+)
050A	<i>Penicillium sp</i>	(-)	*
051A	<i>Penicillium sp</i>	(-)	*
052A	<i>Penicillium sp</i>	(+)	(+)
053A	<i>Penicillium sp</i>	(+)	(+)
054A	<i>Penicillium sp</i>	(+)	(+)
055A	<i>Monilia Sitophila</i>	(-)	*
056A	<i>Aspergillus sp</i>	(-)	*
057A	<i>Paecilomyces sp</i>	(-)	*
058A	<i>Fusarium moniliforme</i>	(+)	(+)
059A	<i>Acremonium sp</i>	(-)	*
060A	<i>Penicillium sp</i>	(-)	*
061A	<i>Paecilomyces sp</i>	(+)	(+)
062A	<i>Monilia sitophila</i>	(+)	(+)
063A	<i>Aspergillus sp</i>	(-)	*
064A	<i>Paecilomyces sp</i>	(+)	(+)
065A	<i>Fusarium moniliforme</i>	(+)	(+)
066A	<i>Fusarium moniliforme</i>	(+)	(+)
067A	<i>Penicillium sp</i>	(+)	(+)
068A	<i>Penicillium sp</i>	(+)	(+)
069A	<i>Epicoccum sp</i>	(-)	*
070A	<i>Alternaria sp</i>	(-)	*
071A	<i>Curvularia sp</i>	(-)	*
072A	<i>Epicoccum sp</i>	(-)	*
073A	<i>Penicillium sp</i>	(+)	(-)
074A	<i>Alternaria sp</i>	(-)	*
075A	<i>Nigrospora sp</i>	(-)	*
076A	<i>Aspergillus sp</i>	(-)	*
077A	<i>Aspergillus versicolor</i>	(+)	*
078A	<i>Nigrospora sp</i>	(-)	*
079A	<i>Penicillium sp</i>	(+)	(+)
080A	<i>Penicillium sp</i>	(+)	(-)
081A	<i>Nigrospora sp</i>	(-)	(-)
082A	<i>Nigrospora sp</i>	(-)	*
083A	<i>Penicillium sp</i>	(-)	*
084A	<i>Penicillium sp</i>	(-)	*
085A	<i>Penicillium sp</i>	(-)	*
086A	<i>Phoma sp</i>	(-)	*
087A	<i>Monilia Sitophila</i>	(-)	*
088A	<i>Penicillium sp</i>	(-)	*
089A	<i>Penicillium sp</i>	(-)	*

\*Teste não realizado, ( + ) crescimento satisfatório, ( - ) ausência de crescimento.

# Anexo 6

(Continuação)

AMOSTRA	MICROORGANISMO	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO	
		35°C	37°C
090A	<i>Penicillium sp</i>	( - )	*
091A	<i>Penicillium sp</i>	( - )	*
092A	<i>Stachybotrys sp</i>	( - )	*
093A	<i>Monilia Sitophila</i>	( - )	*
094A	<i>Monilia sitophila</i>	( - )	*
095A	<i>Penicillium sp</i>	( - )	*
096A	<i>Penicillium sp</i>	( - )	*
097A	<i>Penicillium sp</i>	( - )	*
098A	<i>Curvularia sp</i>	( - )	*
099A	<i>Paecilomyces sp</i>	( - )	*
100A	<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	( - )	*
101A	<i>Penicillium sp</i>	( + )	( - )
102A	<i>Paecilomyces sp</i>	( + )	( + )
103A	<i>Curvularia sp</i>	( + )	( + )
104A	<i>Aspergillus sp</i>	( + )	( + )
105A	<i>Pestalotiopsis gypsum</i>	( - )	*
106A	<i>Monilia sitophila</i>	( + )	( + )
107A	<i>Monilia sitophila</i>	( - )	*
108A	<i>Penicillium sp</i>	( + )	( - )
109A	<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	( - )	*
110A	<i>Penicillium sp</i>	( + )	( - )
111A	<i>Paecilomyces sp</i>	( + )	( - )
112A	<i>Penicillium sp</i>	( - )	*
113A	<i>Penicillium sp</i>	( + )	( - )
114A	<i>Penicillium sp</i>	( - )	*
115A	<i>Chaetomium sp</i>	( + )	( - )
116A	<i>Penicillium sp</i>	( - )	*
117A	<i>Exserohilum sp</i>	( + )	( - )
118A	<i>Alternaria sp</i>	( - )	*
119A	<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	( - )	*
120A	<i>Nigrospora sp</i>	( - )	( - )
121A	<i>Penicillium sp</i>	( - )	*
122A	<i>Aspergillus flavus</i>	( + )	( + )
123A	<i>Aspergillus flavus</i>	( - )	*
124A	<i>Aspergillus niger</i>	( + )	( + )
125A	<i>Penicillium sp</i>	( + )	( + )
126A	<i>Penicillium sp</i>	( + )	( + )
127A	<i>Penicillium sp</i>	( + )	( + )
128A	<i>Alternaria sp</i>	( - )	*
129A	<i>Penicillium sp</i>	( - )	*
130A	<i>Penicillium sp</i>	( + )	( - )
131A	<i>Aureobasidium sp</i>	( - )	*
132A	<i>Penicillium sp</i>	( - )	*
133A	<i>Epicocum sp</i>	( + )	( + )
134A	<i>Paecilomyces sp</i>	( + )	( + )
135A	<i>Chaetomium sp</i>	( - )	*
136A	<i>Exserohilum sp</i>	( + )	( - )
137A	<i>Nigrospora sp</i>	( - )	*

\*Teste não realizado, ( + ) crescimento satisfatório, ( - ) ausência de crescimento.

## Anexo 6

(Continuação)

AMOSTRA	MICRORGANISMO	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO	
		35°C	37°C
138A	<i>Monilia sitophila</i>	( + )	( + )
139A	<i>Aspergillus niger</i>	( + )	( + )
140A	<i>Penicillium sp</i>	( + )	( + )
141A	<i>Aspergillus versicolor</i>	( + )	( + )
142A	<i>Aspergillus versicolor</i>	( + )	*
143A	<i>Aspergillus niger</i>	( + )	( + )
144A	<i>Fusarium moniliforme</i>	( + )	( + )
145A	<i>Penicillium sp</i>	( - )	*
146A	<i>Penicillium sp</i>	( + )	( - )
147A	<i>Chaetomium sp</i>	( + )	( - )
148A	<i>Paecilomyces sp</i>	( + )	( + )
149A	<i>Fusarium moniliforme</i>	( + )	( - )
150A	<i>Penicillium sp</i>	( + )	( + )
151A	<i>Aspergillus versicolor</i>	( + )	( + )
152A	<i>Scopulariopsis sp</i>	( - )	*
153A	<i>Penicillium sp</i>	( + )	( + )
154A	<i>Penicillium sp</i>	( + )	( + )
155A	<i>Acremonium sp</i>	( - )	*
156A	<i>Chaetomium sp</i>	( - )	*
157A	<i>Monilia sitophila</i>	( - )	( - )
158A	<i>Aspergillus sp</i>	( + )	( + )
159A	<i>Penicillium sp</i>	( + )	( - )
160A	<i>Aspergillus sp</i>	( - )	*
161A	<i>Penicillium sp</i>	( - )	*
162A	<i>Aspergillus sp</i>	( + )	( + )
163A	<i>Fusarium moniliforme</i>	( - )	*
164A	<i>Fusarium sp</i>	( + )	( - )
165A	<i>Penicillium sp</i>	( + )	( + )
166A	<i>Monilia sitophila</i>	( + )	( + )
167A	<i>Paecilomyces sp</i>	( + )	( + )

\*Teste não realizado, ( + ) crescimento satisfatório, ( - ) ausência de crescimento.

## Anexo 7

Resultado dos testes de suscetibilidade aos antifúngicos das cepas isoladas a partir de espécimes clínicos

AMOSTRA	CIM DOS ANTIFÚNGICOS*							MICRORGANISMO
	(em ug/mL)							
	AnB	Nist	Mcz	Ceto	Itra	Fluco	5-Fc	
04P	1	2	0,5	2	0,25	64	64	<i>Aspergillus fumigatus</i>
07P	0,5	16	8	16	1	32	64	<i>Aspergillus niger</i>
09P	2	2	0,5	1	1	128	2	<i>Paecilomyces variotti</i>
12P	1	4	2	1	0,25	>128	0,12 5	<i>Paecilomyces variotti</i>
13P	4	32	8	4	1	128	8	<i>Aspergillus niger</i>
22P	4	8	2	0,5	0,5	16	16	<i>Aspergillus flavus</i>
23P	4	16	4	4	1	>128	>128	<i>Aspergillus flavus</i>
24P	2	8	1	1	0,25	32	32	<i>Aspergillus flavus</i>
25P	4	8	2	1	0,5	32	16	<i>Aspergillus flavus</i>
26P	4	128	0,5	2	0,25	>128	128	<i>Aspergillus terreus</i>
27P	2	8	2	4	1	>128	16	<i>Aspergillus flavus</i>
29P	4	>128	1	1	0,25	128	>128	<i>Aspergillus terreus</i>
33P	1	1	1	0,5	0,25	32	0,12 5	<i>Paecilomyces variotti</i>
35P	4	8	8	4	>128	>128	>128	<i>Fusarium sp</i>
36P	2	8	8	8	32	>128	>128	<i>Fusarium sp</i>
37P	4	8	1	1	0,25	128	64	<i>Aspergillus versicolor</i>
38P	2	8	16	8	>128	>128	>128	<i>Fusarium sp</i>
39P	2	16	4	1	0,25	>128	1	<i>Fusarium sp</i>
44P	4	8	2	4	0,25	>128	64	<i>Aspergillus flavus</i>
51P	2	8	0,5	2	0,25	128	128	<i>Aspergillus fumigatus</i>
54P	1	4	0,5	1	0,5	>128	0,12 5	<i>Paecilomyces variotti</i>
57P	8	128	8	8	128	128	128	<i>Fusarium sp</i>
64P	0,25	1	16	1	0,25	64	4	<i>Paecilomyces variotti</i>
67P	4	16	4	8	>128	>128	>128	<i>Fusarium solani</i>
69P	4	16	4	8	2	>128	8	<i>Aspergillus niger</i>
71P	4	8	4	16	1	>128	16	<i>Aspergillus niger</i>
75P	4	128	16	16	>128	128	>128	<i>Fusarium sp</i>
76P	4	8	1	4	0,5	128	64	<i>Aspergillus fumigatus</i>
78P	16	>128	2	0,5	1	32	>128	<i>Aspergillus sp</i>
79P	2	16	1	2	0,25	128	128	<i>Aspergillus fumigatus</i>
83P	0,25	4	0,125	0,5	0,25	32	128	<i>Chaetomium globosum</i>
84P	2	2	0,25	1	0,5	32	128	<i>Chaetomium globosum</i>

\*AnB= anfotericina B, Nist= nistatina, Mcz= miconazol, Ceto= cetoconazol, Itra= itraconazol, Fluco= Fluconazol, 5-Fc= 5-flucitosina

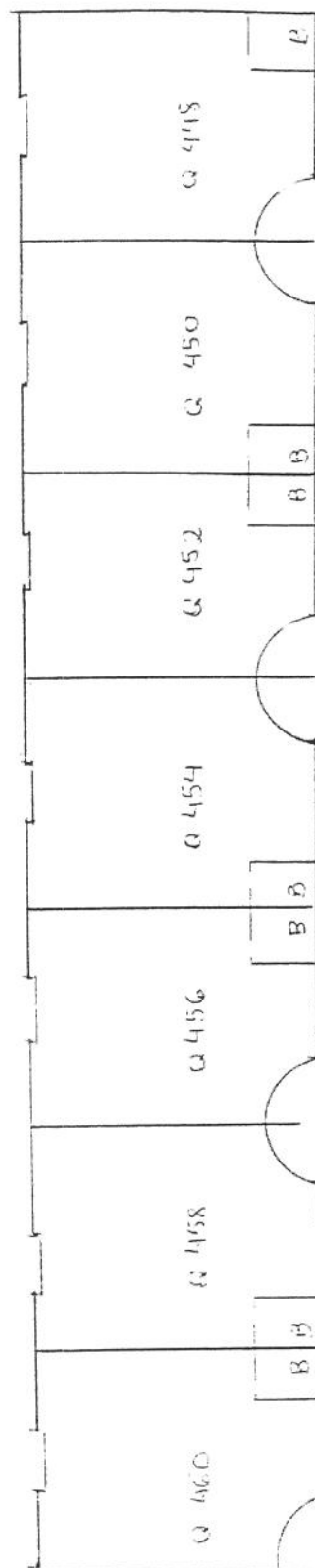


# Anexo 8

## Resultado dos testes de suscetibilidade aos antifúngicos das cepas ambientais

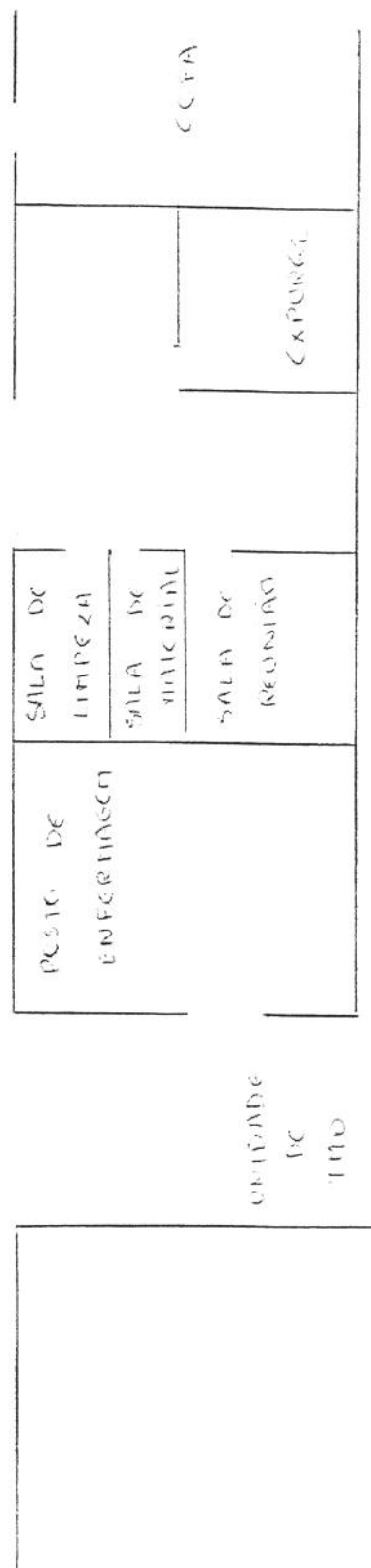
AMOSTRA	CIM DOS ANTIFÚNGICOS*							MICROORGANISMO
	(em ug/mL)							
	AnB	Nist	McZ	Ceto	Itra	Fluco	5-Fc	
007A	4	16	16	16	128	>128	>128	<i>Fusarium sp</i>
010A	1	4	0,5	0,5	0,5	64	>128	<i>Chaetomium globosum</i>
021A	2	4	4	4	2	>128	32	<i>Aspergillus niger</i>
032A	4	32	16	1	2	64	128	<i>Aspergillus flavus</i>
033A	2	128	16	2	1	128	64	<i>Aspergillus sp</i>
039A	4	128	4	8	0,5	>128	>128	<i>Aspergillus fumigatus</i>
040A	4	>128	4	2	0,25	>128	>128	<i>Aspergillus sp</i>
044A	2	16	16	0,5	0,5	128	32	<i>Aspergillus sp</i>
045A	4	32	4	0,5	0,25	64	16	<i>Aspergillus sp</i>
048A	4	32	16	1	2	>128	16	<i>Aspergillus versicolor</i>
049A	2	4	4	8	1	>128	2	<i>Aspergillus fumigatus</i>
058A	2	4	0,125	1	1	16	>128	<i>Fusarium moniliforme</i>
064A	4	16	16	2	0,5	>128	0,25	<i>Paecilomyces variotti</i>
065A	4	4	1	2	4	32	>128	<i>Fusarium moniliforme</i>
066A	2	4	4	2	2	32	>128	<i>Fusarium moniliforme</i>
104A	2	8	16	0,5	0,5	32	32	<i>Aspergillus sp</i>
122A	4	64	16	8	2	128	32	<i>Aspergillus flavus</i>
124A	1	>128	2	4	1	128	2	<i>Aspergillus niger</i>
134A	2	4	4	1	0,125	>128	64	<i>Paecilomyces variotti</i>
139A	2	32	4	8	2	>128	4	<i>Aspergillus niger</i>
141A	4	128	4	1	2	>128	32	<i>Aspergillus sp</i>
143A	2	4	1	4	1	128	16	<i>Aspergillus niger</i>
144A	4	4	8	2	2	32	>128	<i>Fusarium moniliforme</i>
151A	2	4	4	1	8	64	>128	<i>Aspergillus versicolor</i>
158A	4	64	4	0,5	2	128	16	<i>Aspergillus sp</i>
162A	4	64	16	1	1	64	32	<i>Aspergillus sp</i>

AnB = anfotericina B; Nist = nistatina; Mcz = miconazol; Ceto = cetoconazol; Itra = itraconazol; Fluco = fluconazol; 5-Fc = 5-fluconazol.



CORREDOR

CORREDOR



Anexo 9: Esquema de distribuição dos diferentes ambientes da unidade de TMO HC-UNICAMP

## Anexo 10

### ***Phaeohyphomycosis caused by *Chaetomium globosum* in an allogeneic bone marrow transplant recipient***

Teixeira ABA<sup>1</sup>, Trabasso P<sup>2</sup>, Moretti-Branchini ML<sup>2</sup>, Aoki, FH<sup>2</sup>, Vigorito AC<sup>3</sup>, Miyaji M<sup>4</sup>, Mikami Y<sup>4</sup>, Takada M<sup>4</sup>, Schreiber AZ<sup>1</sup>.

From the <sup>1</sup>Clinical Pathology Department and the <sup>2</sup>Infectious Diseases Division, <sup>3</sup>Hematology Division, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, Brazil and the <sup>4</sup>Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicosis, Chiba University, Japan.

#### **Abstract**

Bone marrow transplant recipients are highly susceptible to opportunistic fungal infections. We report the first case of a *Chaetomium* systemic infection described in Brazil. A 34 years-old patient with chronic myeloid leukemia underwent to an allogeneic sibling matched bone marrow transplant. Seven months later, he developed systemic infection with enlargement of the axillaries and cervicals lymph nodes. The culture of the aspirates from both lymph nodes yielded *Chaetomium globosum*. The infection was successfully treated with amphotericin B. The increasing population of immunosuppressed patients requires a careful microbiologic investigation for uncommon fungal infections.

**Keywords:** *Chaetomium globosum*, phaeohyphomycosis, bone marrow transplant, Amphotericin B.

Corresponding author: Dr. Angelica Zaninelli Schreiber  
Departamento de Patologia Clínica; Faculdade de Ciências Médicas;  
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.  
Cidade Universitária Zeferino Vaz, Cx. Postal 6142, CEP 13083-970  
Campinas, São Paulo, Brazil. Phone: 55-19-3289-3273; Fax: 55-19-3788-9434.  
E-mail: [zaninele@fcm.unicamp.br](mailto:zaninele@fcm.unicamp.br)

## Anexo 10

Infection is the major cause of morbidity and mortality in bone marrow transplant recipients and in patients with hematological malignancies submitted to intensive chemotherapy. The common source of the infecting organism is the endogenous flora or the hospital environment [1]. The extensive use of prophylactic broad-spectrum antibiotics, intensive exposure to cytotoxic drugs and the increasing use of indwelling intravascular catheters are important risk factors for opportunistic fungal infections. Hospital-acquired infections and systemic infection due to opportunistic molds are specially, devastating in immunocompromised patients [1,2].

The fungi of the genus *Chaetomium* are commonly found in air soil and products of cellulose degradation [3,4]. Such airborne fungi may act as agents of asthma and allergic rhinitis [5]. *Chaetomium* species are rarely identified in clinical specimens and they are the causative agents of phaeohyphomycosis [6]. These fungi are now emerging as new fungal pathogens representing a challenge for clinical diagnosis and treatment [2].

Several species of the genus *Chaetomium* have been implicated in human phaeohyphomycosis. *Chaetomium funiculum* was reported as causing subcutaneous abscess [7] and *C. cochliodes* was isolated from pleural fluid in a patient with acute lymphocyte leukemia [8]. *C. globosum* has been reported as causing cerebral phaeohyphomycosis [9], pneumonia [10], nail and cutaneous infections [6,11,12,13]. *C. perpulcrum* (now *C. brasiliense*) was isolated from infected nails [14] and cerebral infections were reported by *C. atrobrunneum* [15,16,17] and *C. strumarum* [18].

## Anexo 10

We describe a case of lymph node infection due to *C. globosum* in an allogeneic bone marrow transplanted patient.

### Case report

A 34 years-old man affected by chronic myeloid leukemia (CML) received allogeneic sibling matched bone marrow transplantation in November 1999. Engraftment was achieved on day +17 and the patient went to the outpatient setting on day +25. During the pre-engraftment phase, no clinical or microbiologic infections were diagnosed. Acute graft versus host disease was not observed. Seven months later, the patient was admitted to the hospital with fever (39.9°C) and bilateral enlargement of cervical and axillar lymph nodes. On admission, the patient had swab cultures from oral cavity, nose, urethra and rectum. These specimens were cultured for fungal organisms, aerobic and facultative bacteria and resulted negative. Blood cultures for bacteria and fungi were sterile. The biopsy of the cervical lymph nodes showed chronic unspecific lymphadenitis with diffuse pattern. Aspirates of cervical and axillar lymph nodes were performed and no fungal structures were observed in the direct microscopic examination. The aspirates were separately inoculated in tubes containing Sabouraud Dextrose Agar with chloramphenicol and incubated simultaneously, at room temperature and at 37°C. After two weeks of incubation, circular colonies with irregular margin were observed. The colonies were fluffy, brown to olive green in color with dark brown perihelia in center. Colonies on cellulose agar produced dark brown colored ascomata with long

## Anexo 10

undulate ascomatal hairs. Numerous asci and ascospores were produced in the ascoma within 10 days. Asci were clavate with 8 ascospores. Ascospores were limoniform and  $9-11,5 \times 8-9 \times 7-7,5 \mu\text{m}$  with an apical germ pore. The microorganism was identified as *C. globosum* ( Figure 1). Of note, during the patient first admission, for bone marrow transplant, in November 1999, the culture of the environmental air sample from the patient's room, (GASP method), also yielded *C. globosum*.

*In vitro* susceptibility testing to antifungal drugs, such as; Amphotericin B, Itraconazole, Myconazole, Ketoconazole, Fluconazole, 5-Fluorocytosine and Nystatin were performed by the micro dilution method in RPMI medium (NCCLS) [19]. The inoculums contained  $1 \times 10^3 \text{ cfu/mL}^{-1}$ . Fungistatic activity and minimal inhibitory concentrations (MIC) of the drugs were recorded after 72h of incubation at  $35^{\circ}\text{C}$ . MIC was defined as the lowest concentration of the drug allowing no growth in duplicate determination (Table 1).

The patient received Amphotericin B desoxicolate and was cured after a 3,0 mg total dose. He was discharged completely recovered. However, the patient developed grade 3, chronic graft versus host disease and he died of septicemia caused by *Enterobacter cloacae*, one year after the transplant.

## Discussion

Apart from the well-known opportunistic fungi, such as *Candida* spp, *Aspergillus* spp., *Cryptococcus neoformans*, and *Fusarium* spp., some lesser known fungi have recently been documented to cause infection [20] Other opportunistic fungi, such as *Alternaria* sp, *Curvularia* sp, have caused serious

## Anexo 10

infections in immunocompromised patients. *Chaetomium* spp. are known to produce toxic metabolites on dead organic substrates. Their isolation from clinical specimens is generally considered to reflect contamination by airborne fungi [9]. Several species of the genus *Chaetomium* have been reported as etiologic agents of opportunistic infections in humans [2,8,9,10,15,16,17]. Mortality is high for *Chaetomium* spp. invasive infections. This fact is particularly important for these uncommon pathogens in the immunocompromised patients [2]. In the case herein described of phaeohyphomycosis, *Chaetomium* was suspected as the causative agent once no other microorganism was recovered from cultures and *Chaetomium globosum* was isolated from cervical and axillar lymph nodes aspirates.

This case is the first report of a disseminated phaeohyphomycosis due to *C. globosum* in immunocompromised patient, in Brazil. According to the reviewed literature, from Medline database from 1940 to 2001, only superficial infections caused by *Chaetomium* were previously reported and the first case was referred in 1944, by De Almeida et al. [21]. Two other cases were further described [6,18].

The antifungal susceptibility of *Chaetomium* species is also poorly investigated, and the treatment of these infections is not well established [22]. Few and conflicting data are reported on the susceptibility of *Chaetomium* to the antifungal agents. All strains have shown resistance to 5-fluorocytosine and low MICs for azoles were reported. Our results of antifungal susceptibility of the two strains of *C. globosum* are outlined in Table 1. High MICs values for 5-fluorocytosine, fluconazole and nystatin were observed and lower MICs were



## Anexo 10

obtained for itraconazole, ketoconazole, myconazole and amphotericin B. The correlation of *in vitro* and *in vivo* data has not been reported and the results of the antifungal therapy of *Chaetomium* infections are equivocal [10,22]. In the present case the patient was considered clinically cured with amphotericin B and no relapse of the fungal infection was diagnosed during his follow-up.

Few cases caused by molds, other than *Aspergillus* spp., have been reported. The mechanism of acquisition of these fungi is less well studied, but it is presumed to be similar to that described for *Aspergillus* spp. Aspergillosis is acquired via inhalation of spores, and in some cases, nasal colonization prior to the development of invasive disease has been demonstrated [1]. In this case, *C. globosum* was also isolated from environmental samples obtained by the GASP method [23] collected in the patient's room. However, the colonization of other body sites of this patient was not identified and all swabs cultures were negative. The application of molecular techniques should be applied to confirm the genetic relationship between the environmental and clinical strains.

### Acknowledgements

We thank Japan International Cooperative Agency (JICA) and the Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicosis, Chiba University, Japan. Ana Beatriz Alkmim Teixeira is a master degree student and is supported by grants from CAPES Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil.

## Anexo 10

### References

1. Woods GL, Davis JC, Vaughan WP. Failure of the sterile airflow component of a protected environment detected by demonstration of *Chaetomium* species colonization of four consecutive immunosuppressed occupants. *Infect Control Hops Epidemiol* 1988; 9(10): 451-6.
2. Lesire V, Hazouard E, F.Dequim P, et al. A. Possible role of *Chaetomium globosum* in infection after autologous bone marrow transplantation. *Intensive Care Med* 1999; 25(1): 124-5.
3. Oliveira Lima A, Seabra O, França AT, et al. Incidência de fungos da atmosfera de algumas cidades brasileiras. *Hospital*. 1963; 53: 1045-54.
4. Passarelli N, Miranda MP, Castro C. A study of the incidence of air-borne fungi in the city of Rio de Janeiro. *Ann Allergy* 1949; 7: 334-8.
5. Lacaz Cs, Porto E, Martins JEC. Fungos e alergia. Fungos contaminantes. In: Lacaz Cs, Porto E, Martins JEC, eds. *Micologia Médica. Fungos, Actinomicetos e Algas de interesse médico*. São Paulo: Sarvier; 1984: 337-49.
6. Costa AR, Porto E, Lacaz, CS, et al. Cutaneous and ungual phaeohyphomycosis caused by species of *Chaetomium* Kunze (1817) ex Fresenius, 1829. *J Med Vet Mycol* 1988; 26: 261-8.
7. Koch FA, Haneke H. *Chaetomium funiculum* Cooke als möglicher Erreger einer tiefen Mykose. *Mykosen* 1965; 9: 23-28.
8. Hoppin EC, McCoy EL, Rinaldi MG. Opportunistic mycotic infection Caused by *Chaetomium* in a patient with acute leukemia. *Cancer* 1983; 1(52)(S3): 555-6.

## Anexo 10

9. Anandi V, John, TJ, Walter A, et al. Cerebral phaeohyphomycosis caused by *Chaetomium globosum* in a renal transplant recipient. 1989; 27(10): 2226-9.
10. Yeghen T, Fenelon L, Campbell Ck, et al. *Chaetomium* pneumonia in patient with acute myeloid leukemia. J Clin Pathol 1996; 49: 184-6.
11. Hattori N, Adachi M, Kaneko, T, et al. Case report. Onychomycosis due to *Chaetomium globosum* successfully treated with itraconazole. Mycoses 2000;43: 89-92.
12. Stiller MJ, Rosenthal S, Summerbell RC. Onychomycosis of the toenails caused by *Chaetomium globosum*. J Am Acad Dermatol 1992; 26(5)(S1):775-6.
13. Naidu J, Pouranik M. Onychomycosis caused by *Chaetomium globosum* Kunze. Mycopathologia 1991; 113: 31-34.
14. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Phaeohyphomycosis. In: Kwon-Chung KJ, Bennett JE, eds. Medical Mycology. Philadelphia: Lea & Febiger; 1992: 620-77.
15. Thomas C, Mileusnic D, Carey RB, et al. Fatal *Chaetomium* cerebritis in a bone marrow transplant patient, Hum Pathol 1999; 30: 874-9.
16. Guppy KH, Thomas C, Thomas K, et al. Cerebral fungal infections in the immunocompromised host: a literature review and a new pathogen-*Chaetomium atrobrunneum*: case report. Neurosurgery 1998;43(6):1463-9.

## Anexo 10

17. Segal R, Kusne S. Cerebral fungal infections in the immunocompromised host: a literature review and a new pathogen - *Chaetomium atrobronneum*: case report. *Neurosurgery* 1999; 45(1): 200.
18. Abbot SP, Sigler L, McAlfer R, et al. Fatal cerebral mycoses caused by ascomycete *Chaetomium strumarum*. *J Clin Microbiol* 1995; 33(10): 2692-8.
19. National Committee for clinical Laboratory Standards (NCCLS). Reference method for broth dilution and antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; proposed standard. Villanova, NCCLS, 1998, M-38P.
20. Vartivarian SE, Anaissie FJ, Bodey GP. Emerging fungal pathogens in immunocompromised patients: classification, diagnosis, and management. *Clin Infect Dis* 1993; 17(S2): 487-91.
21. Almeida F de, Gomes, JM, Salles C. Considerações sobre uma amostra de "Chaetomium" isolada de uma lesão epidérmica. *An Fac Med Univer São Paulo*; 1944; 20: 145-54.
22. Guarro J, Soler L, Rinaldi MG. Pathogenicity and antifungal susceptibility of *Chaetomium* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14: 613-18.
23. Iwen PC, Davis, JC, Reed EC, et al. Airborne fungal spore monitoring in a protective environment during hospital construction, and correlation with an outbreak of invasive Aspergillosis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1994; 15(5): 303-6.

## Anexo 10

**Table 1:** Antifungal susceptibility *Chaetomium globosum* strains.

Antifungal drugs	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )* (n=2)
Amphotericin B	0,25 – 2,0
Itraconazole	0,25 – 0,5
Myconazole	0,125 – 0,25
Ketoconazole	0,5 – 1,0
Fluconazole	32
5-Fluorocytosine	>128
Nystatin	2,0 – 4,0

\* Minimal Inibitory Concentration in  $\mu\text{g/mL}$  for two strains; tests realized in duplicate.

