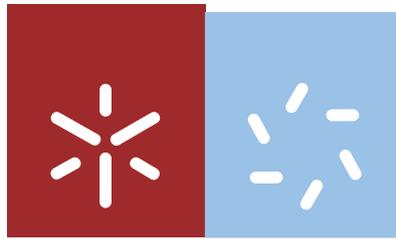


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Moisés Mendes Tavares

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



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Moisés Mendes Tavares

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

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Genética Molecular

Trabalho realizado sob a orientação da
Doutora Maria da Luz Martins
(IHMT/CREM, Lisboa)
Professora Doutora Paula Sampaio
(CBMA, Braga)

Outubro de 2012

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

Universidade do Minho, ___/___/_____

Assinatura: _____

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Resumo

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

Air Palavras-chave: ar; água; superfícies; fungos; pacientes imunocomprometido; infeção fúngica.

The role of air and water as fungal infection transmission vehicles in Agostinho Neto Hospital, City of Praia, Cabo Verde

Abstract

Fungi are a diverse group of microorganisms that are ubiquitous in nature. They can be found in the soil, air and water. Some microorganisms are considered pathogens for humans, these microorganisms are normally harmless for healthy individuals but, they become pathogenic when the immune defenses are unbalance. Infections caused by these agents have been reported, at hospitals with high mortality rates in patients with immunological diseases.

In this study, the presence of filamentous fungi was monitored in some critical units of the Hospital Agostinho Neto in the city of Praia in Cabo Verde, namely: in the operating theatre, surgical and burn hospitalization unit, neonatology hospitalization unit, infectiology hospitalization unit, and oncology, and hemodialysis services.

Thirty four samples from the air, water and hospital surfaces were collected and filamentous fungi colony forming units counted. Results showed 393 cfu/m² in the air, 685 cfu/m² in the water and 2696 cfu/m² in the hospital surfaces and 104 morphologically different fungi were isolated. From these 29 were isolated from the air, 21 from the water and 54 from the hospital surfaces. Microscopic analysis of these samples showed that the majority of the fungi belonged to the genus *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp. and *Aspergillus* sp.

Knowing that the contamination of the hospital environment by these agents can be considered a risk factor for nosocomial infections in patients with an impaired immunological system, in this work we suggest some guidelines in order to minimize these risk factors. We also propose future studies in order to correlate these risk factors with fungal infections episodes that may occur in the Hospital Agostinho Neto.

Key Words: air, water, surface, fungi, immunocompromised patients, fungal infection

ÍNDICE

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
ÍNDICE	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xii
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	1
1 - Características gerais dos fungos	2
1.1 - Morfologia dos fungos	3
1.2 - Reprodução	4
1.2.1 - Reprodução sexuada	4
1.2.2 - Reprodução assexuada	4
1.3 - Nutrição e metabolismo	5
1.4 - Crescimento	6
1.5 - Importância das Micoses Humanas	7
1.5.1 - As Micoses superficiais	8
1.5.2 - As micoses subcutâneas	8
1.5.3 - As micoses sistêmicas	8
1.6 - Infecções fúngicas nosocomiais	10
1.6.1- Epidemiologia das infecções nosocomiais.....	11
1.6.2 – Fatores de risco associados às infecções nosocomiais.....	14
1.7 - Ambiente hospitalar como foco de infecção fúngica.....	15
1.7.1– A prevenção e o tratamento das infecções fúngicas.....	16
1.8 - Caracterização do local de colheita: Hospital Agostinho Neto	18
1.9 - Objetivos e plano da dissertação	20
CAPÍTULO II: MATERIAL E MÉTODOS.....	23
2.1 Seleção dos locais de colheita de amostras	24
2.2 Colheita das amostras ambientais.....	24
2.2.1 Colheita de ar e água e superfície.....	24
2.3 Cultura e isolamento dos fungos	26
2.3.1 Meios de cultura	26

2.3.2 Incubação.....	26
2.3.3 Isolamento das colónias	27
2.4 Identificação convencional das espécies fúngicas isoladas	27
2.5 Caracterização molecular de algumas espécies com maior importância médica.	28
2.5.1 Extração do DNA.....	28
2.5.2 Amplificação da região ITS do rDNA	29
2.5.3 Purificação do produto amplificado.....	30
2.5.4 Sequenciação da região ITS do rDNA.	31
CAPÍTULO III: RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.1- Amostras obtidas no Hospital Agostinho Neto	34
3.2 Fungos encontrados nos diferentes locais da colheita da amostra	39
3.2.1 Fungos encontrados no Bloco Operatório.....	41
3.2.2 Fungos encontrados no serviço de internamento Cirúrgico e Queimadura	42
3.2.3 Fungos encontrados no serviço de internamento de Neonatologia	43
3.2.4 Fungos encontrados no serviço de internamento de Infeciologia.....	44
3.2.5 Fungos encontrados no serviço de Oncologia.....	45
3.2.6 Fungos encontrados no serviço de Hemodiálise.....	46
3.3 Espécies de maior importância médica e com maior prevalência.	46
CAPÍTULO IV: CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	51
Bibliografia.....	55
Anexos.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 - Colheita de amostras de ar ambiental no Hospital Agostinho Neto, da cidade da Praia,, em Cabo Verde.....	25
Figura 2.2 - Representação ilustrativa da colheita e sementeira de amostras de superfícies. (A) Colheita da amostra de superfície, com zaragatoa, numa área de 100 cm ² ; (B) sementeira da amostra na placa de petri com meio de cultura agar Sabouraud dextrose com cloranfenicol.....	25
Figura 2.3 - Organização da região ITS do rDNA (adaptado por White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990).	29
Figura 3.1 - Prevalência dos géneros dos fungos identificados com base nas características morfológicas das suas colónias.....	38
Figura 3.2 - Observação microscópica das diferentes espécies de <i>Aspergillus</i> identificadas neste estudo. (A) <i>A. versicolor</i> ; (B) <i>A. wentii</i> ; (C) <i>A. unguis</i> ; (D) <i>A. tubingensis</i> ; (E) <i>A. niger</i> ; (F) <i>A. westerdijkiae</i> ; (G) <i>A. nidulans</i> ; (H) <i>A. flavus</i> e (I) <i>A. tamarii</i>	47

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1	Espécies fúngicas oportunistas mais comuns como agentes etiológicos de infecções nosocomiais (adaptado por Richardson & Lass-Flörl, 2008).....	11
Tabela 1.2	Fármacos mais utilizados no tratamento das diferentes patologias fúngicas invasivas em pacientes imunocomprometidos (Low, Chian-Yong & Rotstein 2011).....	18
Tabela 2.1	As áreas de prestação de cuidados de saúde no Hospital Dr. Agostinho Neto em Cabo Verde	19
Tabela 3.1	Ocorrência de colónias fúngicas isoladas (UFC, Unidades Formadoras de Colónias) nos diferentes serviços do Hospital Agostinho Neto, cidade da Praia, Cabo Verde.....	34
Tabela 3.2	Morfotipos fúngicos identificados nas diferentes unidades do hospital Agostinho Neto, cidade da Praia, Cabo Verde.....	36
Tabela 3.3	Ocorrência das espécies fúngicas isoladas a partir das amostras de ar, água e superfícies do Bloco Operatório.....	39
Tabela 3.4	Distribuição dos fungos isolados a partir das amostras de ar, água e superfícies do serviço de internamento cirúrgico e queimadura.....	40
Tabela 3.5	Distribuição das diferentes espécies de fungos isolados a partir das amostras de ar, água e superfícies do serviço de internamento de Neonatologia.....	42
Tabela 3.6	Distribuição dos fungos isolados a partir das amostras de ar, água e superfícies do serviço de internamento de Infeciologia.....	42
Tabela 3.7	Distribuição dos fungos isolados a partir das amostras de ar, água e superfícies do serviço de internamento de Oncologia.....	43
Tabela 3.8	Distribuição dos fungos isolados a partir das amostras de ar, água e superfícies do serviço de Hemodiálise.....	44
Tabela 3.9	Identificação molecular espécies de <i>Aspergillus</i> isoladas nos diferentes serviços do hospital Agostinho Neto, da cidade da Praia, em Cabo Verde.....	46

ENQUADRAMENTO TEÓRICO

1 - Características gerais dos fungos

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

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

Atualmente os micologistas estimam que já foram descritas cerca de 70.000 espécies que corresponde a 5% num total de aproximadamente 1,5 milhões de espécies estimados sobre o planeta terra (Hawksworth, 2001). Esta grande discordância deve-se ao facto de haver grandes desconhecimento das áreas tropicais e subtropicais, assim como insuficiente amostragem em estudos micológicos (Alexopoulos, Mims, & Blackwell, 1996). Segundo Richardson & Warnock (2003), das espécies já descritas, cerca de 500 estão associados a doenças nos humanos e, de entre estas, mais de 100 espécies podem provocar infeções em indivíduos saudáveis.

De acordo Guarro, Gené, & Stchigel, (1999) não há um conceito universal para definir as espécies fúngicas. Os fungos são organismos que apresentam uma estrutura celular do tipo eucariótica cuja alimentação se processa por absorção (Santos, Venâncio, & Lima, 1998). São organismos heterotróficos, desprovido de clorofila, contendo parede celular rígida constituída na maioria por quitina e glucano, sendo que a reprodução se faz por meio de esporos assexuados ou sexuais (Murray, Rosenthal, & Pfäuer, 2007). Estas características fazem destes microrganismos seres vivos singulares no seio de outros eucariontes.

1.1 - Morfologia dos fungos

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

As leveduras são organismos unicelulares. As células possuem forma arredondada, ovoide ou alongada de tamanho variável (entre 3 a 5 μm) e a sua reprodução na maioria dos casos é assexuada, por meio de gemulação ou fissão. Nos meios de cultura, como o agar de Sabouraud, desenvolvem colónias em geral cremosas (Lacaz, Micologia Médica, 1977). Algumas leveduras reproduzem-se continuamente por gemulação sem que a gémula se separe da célula mãe dando origem a pseudohifas ou pseudofilamentos.

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

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

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

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

geral, quando são cultivados a 25°C em meios de cultura comuns, crescem sob a forma de fungos filamentosos. Nos tecidos parasitados ou a 37°C em determinados meios de cultura, desenvolvem-se sob a forma de células leveduriformes (Lacaz, *et al.* 2002).

1.2 - Reprodução

A reprodução é um mecanismo fundamental utilizado por todos seres vivos para perpetuar a sua existência. Normalmente os fungos possuem dois tipos de reprodução: reprodução sexuada ou estado teleomorfo (com a produção de esporos sexuados) e reprodução assexuada ou estado anamorfo (com a produção de esporos assexuados).

1.2.1 - Reprodução sexuada

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

Em Micologia clássica, os fungos com reprodução sexuada conhecida (estado perfeito ou teleomorfo) são classificados nas classes Zigomicota, Ascomicota e Basidiomicota, conforme as estruturas reprodutoras a que dão origem. Os fungos com apenas reprodução assexuada conhecida (estado imperfeito ou anamorfo) pertencem à classe Deuteromicota (Murray, Rosenthal, & Pfaüer, 2007). No entanto, nestes últimos anos, com a utilização de técnicas moleculares em estudos taxonómicos de fungos tem sido possível reclassificar muitas espécies imperfeitas em uma das três primeiras classes.

1.2.2 - Reprodução assexuada

A reprodução assexuada envolve apenas um progenitor e, no caso dos fungos, é uma forma muito eficaz de reprodução e propagação das espécies pela capacidade que estes organismos têm de se reproduzir continuamente desde que as condições do meio sejam favoráveis.

Este tipo de reprodução salvaguarda o património genético do progenitor devido ao processo de divisão nuclear por meio de mitoses.

A reprodução assexuada ocorre nas leveduras por gemulação ou por fissão e nos fungos filamentosos, por extensão apical (Murray, Rosenthal, & Pfäuer, 2007). A gemulação é forma mais comum nas leveduras e consiste num pequeno crescimento e alongamento da célula mãe a partir da invaginação de uma certa porção da parede celular. À medida que a gémula se desenvolve, o núcleo da célula mãe divide-se dando origem a um núcleo filho que migra para a gémula, originado assim uma nova célula filha, que pode ficar ou não ligada à célula-mãe (Richardson & Warnock, 2003).

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

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

1.3 - Nutrição e metabolismo

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

Sabe-se que, para o seu desenvolvimento, os fungos necessitam sempre de assimilar compostos de carbono e de azoto para a produzir a sua energia, os quais são retirados dos substratos orgânicos. Segundo Deacon (1984), as moléculas orgânicas mais simples como

monossacarídeos, aminoácidos e ácidos orgânicos são absorvidas através da membrana celular enquanto as moléculas mais complexas, como muitos dissacarídeos, têm de ser degradadas em monómeros no meio exterior às células fúngicas por enzimas libertadas através da parede celular, antes de serem absorvidas pelas células.

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

1.4 - Crescimento

Os fungos crescem, geralmente a partir de um esporo, pelo alongamento dos filamentos designados de hifas que, constituindo a sua estrutura somática, são importantes para a sua sobrevivência e disseminação. O alongamento dos filamentos dá-se a partir de um crescimento polar de procura constante de nutrientes (Santos, Venâncio, & Lima, 1998). Estes autores acrescentam ainda que, nas hifas mais velhas, a escassez de nutrientes produz alterações fisiológicas acentuadas. Porém, analisando uma hifa a partir do ápex, podem ser identificadas quatro diferentes zonas que correspondem a distintos estádios de desenvolvimento:

- Zona de crescimento apical – formada pela extremidade distal da hifa. É nesta zona que se verifica o aumento da parede e do comprimento da hifa.
- Zona de absorção – onde ocorre a absorção dos nutrientes e a produção de vesículas que migram para a extremidade das hifas.
- Zona de armazenamento – permite armazenar os nutrientes em excesso e manter o equilíbrio do crescimento.
- Zona de senescência – zona de lise dos constituintes da hifa.

No entanto, muitos autores defendem que o crescimento dos fungos está intimamente relacionado com as características ambientais e físicas nas quais os fungos são expostos.

Segundo Sidrim & Rocha (2004), os fungos necessitam de condições mínimas necessárias para o seu desenvolvimento tais como:

- Fatores nutricionais – elementos químicos como carbono, magnésio, potássio, fósforo e azoto em concentração elevada, e em pequena quantidade os elementos como ferro, cobre, zinco etc.
- Fatores físicos – em que se destaca o pH do meio em que crescem, a temperatura, o oxigênio, a humidade e a luminosidade.

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

1.5 - Importância das Micoses Humanas

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

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

Segundo Richardson & Warnock (2003), essas infeções sistémicas provocadas por fungos são classificadas de acordo com o grau da invasão no hospedeiro ou o local inicial da infeção. Classicamente são classificadas em micoses superficiais, micoses subcutâneas e micoses

sistêmicas (que podem ser oportunistas).

1.5.1 - As Micoses superficiais

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

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

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

1.5.2 - As micoses subcutâneas

São micoses que afetam principalmente tecidos subcutâneos, derme, músculos e por vezes os ossos. Geralmente estas infecções surgem como resultado de lesões traumáticas, onde os microrganismos que crescem no solo e na matéria em decomposição são implantados na camada subcutânea da pele. Essas infecções ocorrem com mais frequência nas populações do meio rural das regiões tropicais e subtropicais.

No entanto, a disseminação da infecção através da corrente sanguínea só acontece em hospedeiros com sistema imunitário muito debilitado.

1.5.3 - As micoses sistêmicas

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

através de cateteres, de agulhas ou de outros dispositivos médicos contaminados.

A infecção fúngica pode permanecer localizada nos tecidos profundos e órgãos (micose sistêmica) ou pode propagar-se por múltiplos órgãos (micose disseminada) através de vasos sanguíneos ou do sistema linfático. Neste último caso podem ocorrer manifestações secundárias nos tecidos cutâneos.

Os fungos responsáveis pelas infecções sistêmicas podem ser divididos em dois grupos distintos: os fungos verdadeiramente patogênicos e os fungos oportunistas.

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

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

Ao contrário dos verdadeiros fungos patogênicos, os fungos oportunistas podem ser organismos comensais do organismo humano ou então saprófitas, ubíquos na natureza, sendo encontrados no solo, no ar e em matéria orgânica em decomposição. Esses organismos habitualmente não são patogênicos, mas atuam como patogênicos oportunistas nos indivíduos com debilidades orgânicas acentuadas ou com o sistema imunitário debilitado.

As espécies fúngicas oportunistas são muito numerosas e podem pertencer a um número muito variado de gêneros. Os mais comuns pertencem aos gêneros *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma*, *Trichophyton*, *Trichothecium*, entre muitos outros Boas & Ruiz (2004). Por exemplo, as espécies dos gêneros *Rhizopus* e *Mucor* que geralmente afetam pacientes com diabetes *mellitus*, leucemia, ou sob tratamento com drogas

imunossupressoras, podem causar zigomicose ou mucormicose, respetivamente. As infeções oportunistas causadas por espécies de *Cryptococcus* e *Penicillium* podem ser fatais para doentes HIV+.

No entanto, as infeções por fungos oportunistas atingem principalmente indivíduos imunodeprimidos como resultado de uma doença subjacente ou de um processo de tratamento. Na maioria dos casos, a infeção resulta em doença significativa.

1.6 - Infeções fúngicas nosocomiais

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

Durante as últimas décadas, as infeções fúngicas nosocomiais têm sido apontadas como uma importante causa de morbilidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos (Ascioglu, et al., 2002). Uma das razões ligadas a este aumento do número de casos está diretamente relacionada com o crescimento da população de risco, devido às várias práticas médicas modernas (métodos cirúrgicos invasivos, transplantes, quimioterapia e uso excessivo de drogas imunossupressoras) e ao aparecimento de algumas doenças como neutropenia acentuada, infeção pelo VIH, leucemia, anemia, etc. (Low & Rotstein, 2011; Pfaller & Diekema, 2004; Marchetti *et al.* 2004). Estas populações incluem indivíduos submetidos a transplantes de órgãos sólidos, transplante de medula, terapias imunossupressoras, cirurgias complexas e muito invasivas, pacientes com SIDA, doenças tumorais, idade avançada e nascimento prematuro.

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

1.6.1- Epidemiologia das infeções nosocomiais

Alguns fungos, como espécies de *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* e fungos pertencentes à ordem *Mucorales*, são tradicionalmente comuns e frequentes causadores de micoses oportunistas em pacientes imunocomprometidos. Entretanto, cada vez mais, são relatados novas variedades de fungos oportunistas emergentes (Ver Tabela 1.1), que incluem espécies de *Candida não-albicans*, *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Geotrichum*, de fungos hialinos, tais como *Fusarium*, *Acremonium*, *Scedosporium*, *Paecilomyces* e espécies de *Saccharomyces*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma*, *Trichophyton*, *Trichothecium* bem como uma ampla variedade de fungos dematiáceos, como causa de infeções em doentes imunologicamente debilitados (Pfaller & Diekema, 2004).

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

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

Género	Espécies
<i>Candida</i> spp.	<i>C. albicans</i>
	<i>C. glabrata</i>
	<i>C. lusitanae</i>
	<i>C. lipolytica</i>

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

No entanto, nas unidades hospitalares, a candidose invasiva, a candidemia e a aspergilose invasiva estão entre as infeções oportunistas mais predominantes em pacientes imunocomprometidos.

A candidose invasiva e candidemia

A candidemia surge quando há invasão da corrente sanguínea por leveduras do género *Candida* durante uma infeção. Naturalmente, estas leveduras fazem parte da flora microbiana de indivíduos saudáveis, principalmente nas mucosas do trato digestivo e vaginal. No entanto, em casos de desequilíbrio dessa flora, podem invadir os tecidos do doente e causar infeção, denominada de candidose ou candidíase. Estas infeções podem ser benignas, agudas ou crónicas, superficiais ou profundas, e de aspetos clínicos variáveis (Barbedo & Sgarbi 2010).

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

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

Aspergiloses invasiva

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

A inalação desses conídios por indivíduos não atópicos e com sistema imune saudável não provoca infeções invasivas, uma vez que acabam por ser destruídos pelo sistema de defesa do organismo. No entanto, no caso dos indivíduos atópicos podem desencadear reacções alérgicas de ligeiras a graves e em indivíduos com o sistema imune comprometido, podem invadir o tecido pulmonar, passar para a corrente sanguínea, disseminar e invadir órgãos e levar à morte.

Até há poucos anos, a espécie considerada mais patogénica era *A. fumigatus* mas, nestas últimas décadas, com o aumento do número de casos de debilidade imunológica ou de outros fatores de risco, como neoplasias, neutropenia acentuada, corticoterapia, têm ocorrido cada vez

mais frequentemente infecções invasivas por outras espécies de *Aspergillus*, como por exemplo, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. versicolor*, etc. (Barnes & Marr, 2006).

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

Para além das espécies de *Aspergillus*, muitas outras espécies exógenas de fungos têm surgido atualmente como causadoras de infecções oportunistas, incluindo *Zigomicetas*, *Fusarium* spp., *Paecilomyces* spp., *Scedosporium* spp., e muitas espécies de fungos dematiáceos.

1.6.2 – Fatores de risco associados às infecções nosocomiais

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

Perante os estudos realizados sobre os fatores de risco destas infecções, vários autores comungam da ideia de que o uso das tecnologias avançadas em medicina (quimioterapia e transplantes por exemplo), com finalidade de melhorar o estado e sobrevivência do paciente, passaram a exigir tratamentos mais agressivos e invasivos que muitas vezes enfraquecem o sistema imune deixando o paciente mais suscetível a microrganismos oportunistas (Richardson & Lass-Flörl 2008; Low & Rotstein, 2011; Joseph 2006; Bahtti, shaukat, Almyroudis, & Segal, 2006). (Sabino)

Associados a estes, há que considerar ainda outros fatores de risco para a aquisição de infecções oportunistas, como por exemplo a exposição do paciente a grande quantidade de microrganismos ambientais suspensos no ar no interior hospital, ou no ar à sua volta e que entrem nas instalações vindo do exterior, a contaminação da água de uso hospitalar e contamine as diferentes superfícies hospitalares. De acordo com Sabino (2010) estas infecções também podem estar relacionadas com a pouca higienização no hospital, associado ao não cumprimento das recomendações básicas do controlo de infecção pelo pessoal do hospital, tais

como um simples hábito de não lavar as mãos antes e depois de entrar em contato com os pacientes.

1.7 - Ambiente hospitalar como foco de infecção fúngica

Segundo Sautour, *et al.* (2009), a epidemiologia interna do hospital depende de inúmeros fatores, desde os reservatórios fúngicos identificados no meio ambiente, no interior do hospital, como por exemplo, ar não filtrado, água da rede pública não controlada, sistema de ventilação, existência de plantas ornamentais à realização de obras no próprio hospital ou nas imediações, os quais são por sua vez regulados pela humidade e temperatura ambientais.

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

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

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

Normalmente, os esporos flutuantes são sedimentados sobre várias superfícies inanimadas associados a poeiras, que constituem um verdadeiro reservatório de fungos. Geralmente essas superfícies não estão associadas com a transmissão direta das infecções para os pacientes, mas sim, indiretamente através do contato destas superfícies com as mãos dos profissionais de saúde (Sehulster & Chinn, 2004). Daí a grande importância de uma lavagem frequente das mãos como forma de minimizar risco de infecções nosocomiais.

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

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

1.7.1– A prevenção e o tratamento das infecções fúngicas

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

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

É evidente que fungos como *Aspergillus* spp. e algumas espécies emergentes tais como *Zigomicetas*, *Fusarium* spp. e *Scedosporium* spp. têm sido detectados como sendo os principais agentes etiológicos de infecções fúngicas em pacientes com leucemia, neoplasias, SIDA e em pacientes transplantados (Maertens, et al., 2011). O aparecimento destes organismos é multifatorial e pode estar relacionado com uma intensa imunossupressão dos pacientes, a

sobrevivência prolongada de pacientes com uma patologia grave, ou com a pressão seletiva de um amplo espectro de agentes antifúngicos utilizados na profilaxia ou na terapêutica.

É claro que o início precoce do tratamento antifúngico é determinante para a sobrevivência e cura do doente. Portanto, o tratamento das infecções provocadas por fungos emergentes deve ser iniciado com esquemas terapêuticos adequados e específicos para cada caso. Atualmente, o voriconazol é mundialmente recomendado como a droga de escolha para o tratamento da primeira linha de aspergilose, fusariose e scedosporiose com exceção das zigomicoses (resistentes a este fármaco) que têm indicação para serem tratadas com posaconazol (tabela 1.2) (Maertens, *et al.*, 2011). Mas está igualmente demonstrado que estes antifúngicos têm efeitos tóxicos para os pacientes e podem causar algumas manifestações secundárias. Por exemplo o tratamento com a anfotericina B pode desencadear efeitos como febre, calafrios, dor de cabeça, náuseas, vômitos, comprometimento respiratório e em alguns casos de insuficiência renal aguda. No caso da Voriconazol pode causar diferentes reações adversas desde erupções cutâneas, alterações visuais transitórias, neuro-toxicidade e hepatite. Para além dos efeitos tóxicos dos fármacos antifúngicos, também podem ocorrer falhas terapêuticas com os fármacos, levando por sua vez ao agravamento do quadro clínico do paciente (Maertens, *et al.*, 2011).

Tabela 1.2 Fármacos mais utilizados no tratamento das diferentes patologias fúngicas invasivas em pacientes imunocomprometidos (Low, Chian-Yong & Rotstein 2011).

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

paranasais, pulmonar invasiva,
do sistema nervoso central,
óssea, ou scedosporiose
invasiva disseminada

Zigomicoses	Zigomicose invasiva	Anfotericina B lipossómica	Anfotericina B; posaconazol
--------------------	---------------------	----------------------------	-----------------------------

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

1.8 - Caracterização do local de colheita: Hospital Agostinho Neto

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

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

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

O Hospital Dr. Agostinho Neto na cidade da Praia, onde foi realizado o nosso estudo, é um centro hospitalar vocacionado para a prestação de serviços a nível secundário e terciário, ou

seja, mais orientado para serviços clínicos especializados que envolvem procedimentos médicos mais complexos e técnicas clínicas mais invasivas. Além disso, o Hospital Dr. Agostinho Neto desenvolve igualmente a sua atividade em articulação com todos os Centros de Saúde, Hospitais Regionais e Delegações de Saúde do país, funcionando como centro de referência para a prestação de cuidados diferenciados, facto que muitas vezes a leva à sua sobrelotação.

Este hospital encontra-se estruturado em vários blocos, organizado em diferentes áreas de prestação de serviços, desde os serviços de atendimento de referência aos serviços de atendimento de urgência/emergência (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 As áreas de prestação de cuidados de saúde no Hospital Dr. Agostinho Neto em Cabo Verde (adaptado)

Especialidades com serviço de internamento	Especialidades sem serviço de internamento	Serviços complementares de diagnóstico e terapêutica
<ul style="list-style-type: none"> • Medicina Interna • Infeciologia e Hemodiálise • Cirurgia (Geral, Córdio-Torácica, Maxilo-facial); • Oftalmologia e Otorrinolaringologia • Obstetrícia-Ginecologia • Orto-Traumatologia • Pediatria e Neonatologia • Psiquiatria 	<ul style="list-style-type: none"> • Estomatologia • Anestesia • Medicina Física e Reabilitação • Urologia • Neurologia • Oftalmologia • Otorrinolaringologia • Pneumologia • Dermatologia • Quimioterapia oncológica • Psicologia Clínica • Alergologia 	<ul style="list-style-type: none"> • Imagiologia • Análises Clínicas • Endoscopia • Bloco cirúrgico • Anatomia patológica • Hemoterapia • Farmácia • Dietética

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

Segundo o relatório estatístico do Ministério da Saúde de Cabo Verde (2010) o hospital em estudo tem como áreas de prestação de serviços mais críticas a Medicina, a Cirurgia e a

Neonatologia onde a taxa de mortalidade ainda é muito elevada (anexo 1). É nestas unidades onde são encontrados pacientes com maior grau de fragilidade do sistema imune, o que pode em algum momento justificar a elevada taxa de mortalidade. Por exemplo, nos serviços de Medicina na Unidade de Infeciologia são encontrados vários pacientes com VIH em estado crítico e na unidade de Neonatologia recém-nascidos de baixo peso com sistema imune prematuro, aumentando assim a suscetibilidade destes doentes para contrair infeções oportunistas quando expostos a fatores de risco.

1.9 - Objetivos e plano da dissertação

A contaminação do ambiente hospitalar por fungos constitui um grave problema de saúde pública sendo necessário traçar objetivos e estratégias acertadas de modo minimizar os riscos de poderem provocar infeções nos utentes da contaminação nos hospitais. Neste contexto traçamos como objetivo geral do nosso trabalho a compreensão do mecanismo de transmissão e contaminação do ambiente no Hospital da Praia em Cabo Verde que, conseqüentemente poderão ser responsáveis por um aumento de casos de infeção nosocomial.

O presente trabalho, diante da relevância de que se revestem as infeções nosocomiais para a saúde humana, procurou investigar alguns dos mecanismos de transmissão e fontes de contaminação do ambiente no Hospital da Praia em Cabo Verde que, conseqüentemente poderão ser responsáveis por um aumento de casos de infeção nosocomial. No entanto para a sua concretização, foram considerados os seguintes aspetos:

- Avaliação da ocorrência de diferentes espécies fúngicas em dependências do Hospital Agostinho Neto, na cidade da Praia em Cabo Verde, nomeadamente em salas de internamento e salas associadas ao bloco operatório.
- Conhecimento das mais importantes vias de transmissão de fungos dentro das instalações hospitalares, nomeadamente através do ar ambiental, água canalizada de consumo corrente e superfícies hospitalares.
- A influência da contaminação ambiental por fungos relacionando com a ocorrência de infeções fúngicas adquiridas em ambiente hospitalar.
- Identificação molecular das espécies mais prevalentes com maior importância médica através do estudo das sequências da região ITS do DNA ribossómico (rDNA) de cada isolado.

Esta dissertação está organizada em quatro capítulos diferentes:

- No primeiro capítulo, fizemos um enquadramento teórico sobre as características gerais dos fungos destacando aspetos como a morfologia, reprodução, nutrição, metabolismo e crescimento. Em seguida, descreve-se a sua importância médica como responsáveis por diversas infeções humanas. Faz-se uma abordagem geral sobre as infeções fúngicas nosocomiais, com ênfase na sua epidemiologia e fatores de risco associados. Foi feita a caracterização do ambiente hospitalar como foco de infeção fúngica, as estratégias de prevenção e o tratamento das infeções fúngicas. Por último, fizemos um enquadramento do local de colheita e do hospital em estudo, finalizando com a exposição dos objetivos gerais e específicos do estudo.

- No segundo capítulo descrevemos os materiais e método utilizado ao longo da investigação. É descrita a seleção dos locais de colheitas de amostras, a metodologia da cultura e isolamento dos fungos, da identificação convencional das espécies fúngicas isoladas e da identificação molecular de algumas espécies com maior importância médica.

- O terceiro capítulo é dedicado à análise dos resultados e discussão das amostras obtidas no Hospital Agostinho Neto. Em primeiro lugar foram feitas comparações entre os diferentes morfotipos encontrados, e a correlação entre os isolados encontrados nos diferentes serviços. Em seguida fizemos a correlação entre a espécie de maior importância médica e com maior prevalência.

- No quarto capítulo apresentamos as conclusões finais e recomendações para aperfeiçoar as condições ambientais da prestação dos serviços de saúde.

Capítulo II: Material e métodos

2.1 Seleção dos locais de colheita de amostras

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

2.2 Colheita das amostras ambientais

Todas as amostras foram colhidas durante o mês de Janeiro de 2012 no Hospital Agostinho Neto em Cabo Verde e transportadas para o Laboratório de Micologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical em Lisboa para a realização dos exames laboratoriais.

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

2.2.1 Colheita de ar e água e superfície

Para a colheita das amostras de água, foram retirados 200ml de água da torneira depois de se ter deixado sair a água estacionada na rede durante 5 minutos. É importante realçar que se tapou o copo Millipore para evitar a contaminação da água com microrganismos existentes no ar. Somente depois, foi feita a filtração da água através da membrana Millipore, criando vácuo

no kitasato. No final, o filtro foi retirado e colocado de imediato sobre o meio de cultura de uma placa de Petri.

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



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

A colheita das diferentes superfícies foi realizada passando uma zaragatoa embebida em água destilada esterilizada, cobrindo toda uma área de 100cm² na superfície selecionada para o estudo. Para delimitação da referida área foi utilizada uma folha de papel com um recorte de 10 x 10 cm e a zaragatoa humedecida foi passada em ziguezague sobre toda a superfície do quadrado. Em seguida foi realizada a sementeira desse inóculo em meio de cultura em placa de Petri por espalhamento na sua superfície (Figura 2.2).



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

2.3 Cultura e isolamento dos fungos

2.3.1 Meios de cultura

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

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

2.3.2 Incubação

As amostras colhidas a partir de fontes ambientais no Hospital Agostinho Neto foram mantidas à temperatura ambiente durante a estadia em Cabo Verde, uma vez que a temperatura ambiente média do país varia entre 25°C e 30°C que é a temperatura ideal para o crescimento dos

fungos. Todas as culturas foram desta forma incubadas cerca de 4 a 5 dias até se observar crescimento de colónias fúngicas, após o qual, foram isoladas para tubos de ensaio com meio inclinado de Sabouraud agar.

2.3.3 Isolamento das colónias

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

2.4 Identificação convencional das espécies fúngicas isoladas

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

A identificação microscópica foi feita a partir de preparações microscópicas entre lâmina e lamela de uma pequena porção da colónia corada com uma gota de azul lactofenol para a observação da morfologia das hifas, tipo de frutificação e dimensão e agrupamento dos esporos. Com alguns fungos menos pulverulentos realizaram-se preparações utilizando fita-cola. Esta técnica consiste em fazer aderir uma pequena porção de fita adesiva transparente na superfície da colónia e colocá-la numa lâmina de microscópio sobre uma gota de azul lactofenol, cobrir com uma lamela e observar ao microscópio.

Para a identificação final do género dos fungos e de algumas espécies foi feita a conjugação de todas as características observadas macroscópica e microscopicamente, comparando-as com as descrições apresentadas em livros de Micologia. Nos casos em que o crescimento em

Sabouraud não permitiu o desenvolvimento das estruturas fúngicas necessárias à identificação dos fungos, procedeu-se à subcultura dos mesmos em outros meios de cultura (mais pobres ou mais ricos em nutrientes), como o meio de Malte agar, para estimular a sua produção. Somente a observação dessas características permitiria a identificação convencional dos géneros, e eventualmente, das espécies fúngicas.

2.5 Caracterização molecular de algumas espécies com maior importância médica.

Os métodos moleculares são ferramentas analíticas indispensáveis para identificação e avaliação dos microrganismos. Esta técnica tem sido aplicada na análise de diferentes organismos tais como animais, vegetais, bactérias, fungos, etc. Por vezes, a sua aplicação exige a extração do material genético (DNA) da amostragem como importante procedimento da investigação (Płaza, Upchurch, Brigmon., Whitman, & Ulfig, 2004). No entanto, vários são os métodos conhecidos para a extração do DNA.

2.5.1 Extração do DNA

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

Extração do DNA a partir das culturas

As culturas selecionadas para o estudo molecular foram crescidas em meio de cultura de Sabouraud agar aproximadamente durante uma semana de incubação à temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) para produção abundante de conídios.

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

No dia seguinte a suspensão foi agitada num vortex à velocidade máxima durante 10 minutos seguida de centrifugação durante 5 minutos à velocidade de 11.000 g. O sobrenadante foi

transferido para um tubo eppendorf de 1,5 ml, foram adicionados 250 µl de LDT (*Lysis Buffer*) e novamente agitado no vortex durante 10 minutos. Adicionaram-se 3 µl de RNase 5µg/µl, agitou-se no vortex durante 3 minutos e incubou-se inicialmente durante 10 minutos a 70°C e depois 30 minutos a 95°C. Em seguida, para obter os lisados, foram adicionados 350 µl de etanol a 99% seguido de agitação no vortex à velocidade máxima.

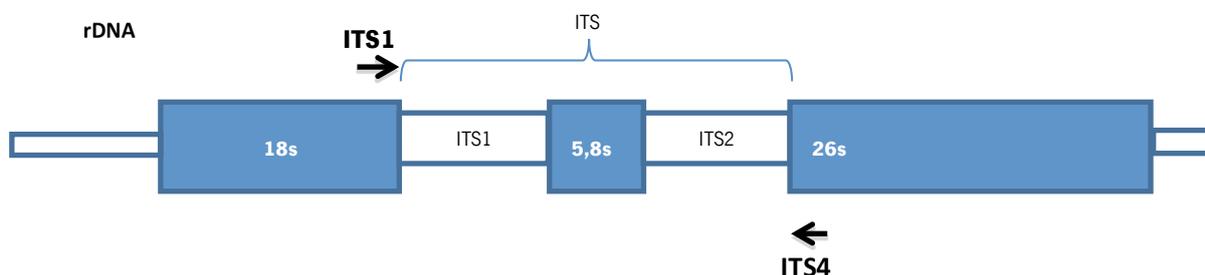
Os lisados foram então transferidos para os cartuchos do kit ou *cartridges* QuickGene® e fez-se a primeira pressurização. Adicionou-se em seguida 750 µl de solução WDT (*Wash Buffer*) e pressurizou-se novamente, repetindo este passo mais duas vezes. Em seguida os *cartridges* foram transferidos para as posições de eluição, adicionaram-se 100 µl de CDT (*Elution Buffer*), incubou-se à temperatura ambiente durante 5 minutos, fazendo depois uma última pressurização para obter o DNA genómico.

2.5.2 Amplificação da região ITS do rDNA

O DNA ribossómico tem sido largamente utilizado em estudos taxonómicos de fungos. Esta região do DNA (rDNA) tem sido muito utilizada devido à presença de regiões conservadas com baixa taxa de polimorfismos ao longo da sua evolução, alternando com regiões variáveis. Dentro do rDNA, as sequências das regiões ITS variam entre espécies diferentes de fungos, permitindo através do alinhamento das sequências nucleotídicas desta região, a identificação do género e espécie de muitos fungos (Anderson *et al.* 2001).

Para a amplificação desta região foi utilizado 4 µl de cada primer ITS1 e ITS4 (Figura 2.3), 5 µl de tampão (NH₄SO₄) 10x, 4 µl de cloreto de magnésio (MgCl₂), 1 µl de dNTPs e 0,6 µl de Taq polimerase, num tubo master mix ajustado com 29,4 µl de água ultra pura para obter um volume de 48 µl, ao qual foram adicionados mais 2µl de DNA.

A reação de PCR foi realizada num termociclador de marca BioRad, modelo Icycler, nas seguintes condições: 6 min a 95°C seguidos de 35 ciclos de 20 s a 95°C, 20 s a 55°C e 60s a



72°C, com uma extensão final de 5 min a 72°C. Em seguida os produtos foram mantidos a 4°C. Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% durante 45 minutos a 70 V num equipamento de marca Amersham Pharmacia Biotech EPS 301 Electrophoresis Power Supply fabricado no Reino Unido.

Figura 2.3 Organização da região ITS do rDNA (adaptado por White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990)

2.5.3 Purificação do produto amplificado

O DNA amplificado para ser sequenciado precisa estar purificado e livre das impurezas como proteínas, enzimas e alguns nucleótidos em excesso.

Para a purificação do nosso produto PCR utilizamos um kit de purificação da SIGMA GenElute PCR clean-up, seguindo o protocolo do kit.

Procedimento de purificação

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

É adicionado à coluna a solução de ligação (*binding solution*), em um volume cinco vezes superior ao do produto PCR, e é centrifugada à velocidade máxima durante um minuto. O líquido no tubo de coleta é novamente descartado e a coluna reposta no mesmo tubo. Em seguida são adicionados à coluna 500 µl de solução de lavagem diluída (*diluted wash solution*) e esta é

centrifugada à velocidade máxima durante um minuto. O fluido do tubo da recolha é novamente descartado e a coluna reposta para uma nova centrifugação à velocidade máxima durante 2 minutos sem a adição de qualquer solução de lavagem, para remover o excesso do etanol. O tubo da coleta e os fluidos residuais são descartados, e a coluna é transferida para um novo tubo de coleta de 2 ml. São adicionados, no centro da coluna, 50 µl de solução de eluição (*elution solution*) e a coluna é incubada à temperatura ambiente durante um minuto.

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

2.5.4 Sequenciação da região ITS do rDNA.

A determinação das sequências da região ITS do rDNA tem permitido obter vantagens significativas na organização taxonómica dos fungos. A avaliação direta dos polimorfismos da região ITS do rDNA fornece informação imprescindível em análises filogenéticas e na determinação de relações de proximidade filogenética entre espécies (Ribeiro, *et al.*, 2009; White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990; Baldwin, *et al.*, 1995). Esta técnica molecular baseia-se na análise direta das sequências transcritas entre os genes 18s e 26s do rDNA (figura 2.3).

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

Capítulo III: Resultados e Discussão

3.1- Amostras obtidas no Hospital Agostinho Neto

As unidades hospitalares podem fornecer amostras biológicas de qualidade com importante informação sobre o verdadeiro agente etiológico de infeções nosocomiais.

No entanto, é nas unidades do Hospital Agostinho Neto onde se realizam procedimentos mais invasivos nos doentes que se deve redobrar os cuidados com a qualidade do ar, água e outros elementos ambientais. Entre estas realçamos a cirurgia e os serviços com internamento prolongado de pacientes, com fragilidade do sistema imune. Consequentemente foram avaliadas as seguintes unidades do hospital em estudo tais como a Unidade de Neonatologia, a Unidade de Infeciologia, a Unidade de Oncologia, o Bloco Operatório, o Internamento de Cirurgia e de Hemodialise. Em todas estas unidades foi analisada a qualidade do ar, da água e das superfícies próximas dos pacientes.

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

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

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

destaque na recolha de amostras de água, ar e das superfícies do bloco operatório, da sala de internamento neonatologia e das salas de internamento dos pacientes submetidos a cirurgias.

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

As amostras do ar foram colhidas em maior número (cinco) no bloco operatório devido a estar subdividido em várias subunidades no seu interior, tais como: sala de preparação, sala de cirurgia, sala de recobro, sala de pós-operatório e corredor do bloco operatório. Na unidade de internamento cirúrgico foram feitas duas colheitas de ar, uma em cada subunidade: a de internamento cirúrgico e a de internamento de grandes queimados. Nas outras unidades foi realizada apenas uma colheita de ar em cada, por serem unidades sem subdivisões.

As amostras da água foram colhidas uma só vez por cada unidade, levando em consideração que a água encontrada na rede de cada unidade é a mesma em todas as torneiras.

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

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

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

Tabela 3.1 Ocorrência de colónias fúngicas isoladas (UFC, Unidades Formadoras de Colónias) nos diferentes serviços do Hospital Agostinho Neto, cidade da Praia, Cabo Verde.

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

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

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

Relativamente às amostras de água, foi no Bloco Operatório onde se isolou maior número de fungos (255ufc/m³), cerca do dobro dos que foram isolados da mesma fonte em outros serviços com internamento, como a Neonatologia (145/m³) e a Infeciologia (105ufc/m³).

Estas ocorrências podem estar relacionadas com os tubos de canalização da rede de distribuição de água nos serviços serem mais antigos nas instalações do Bloco Operatório, ondes os fungos

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

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

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

Relativamente às instalações do Hospital de Dia, verificou-se que foi na Unidade de Oncologia onde se isolou maior número de colónias fúngicas quer a partir do ar, da água, como também das superfícies, com valores muito variados. Na verdade, a utilização das duas unidades, Oncologia e Hematologia, é muito diferente o que pode estar na origem dessa discrepância. Na Unidade de Oncologia, a porta está permanentemente aberta, não há controlo do ar no seu interior e há muita movimentação de entradas e saídas. Contrariamente, a Unidade de Hemodiálise tem uma utilização mais restrita e controlada, as portas estão regularmente fechadas e o ar e água interiores são controlados. Adicionalmente é natural que também haja um maior cuidado de higiene e desinfeção regular das instalações nesta última unidade, daí os resultados terem sido mais apropriados.

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

Como foi referido nos materiais e métodos, à medida que eram realizadas as diferentes colheitas, as amostras foram sendo inoculadas nos meios de cultura em placas de petri.

Em cada placa de petri, relativa a cada um dos locais de colheita, foram observadas todas as colónias de fungos que se iam desenvolvendo durante a incubação e, com base no seu aspeto macroscópico (cor do verso e reverso, dimensão, relevo, textura e topografia da colónia), foram selecionadas e feitas subculturas de uma única colónia de cada tipo morfológico em tubos de ensaio distintos para o isolamento de culturas puras.

A partir das colheitas das superfícies foram isoladas em culturas puras 54 colónias macroscopicamente diferentes, 21 a partir das amostras de água e 29 a partir das amostras de ar (tabela 3.2), a fim de serem posteriormente identificadas até ao género ou à espécie pelos métodos indicados em Material e Métodos.

Tabela 3.2 Morfotipos fúngicos identificados nas diferentes unidades do hospital Agostinho Neto, cidade da Praia, Cabo Verde.

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

Relativamente às 104 colónias de fungos selecionadas para posterior identificação, a variação da sua ocorrência em cada unidade hospitalar foi muito distinta.

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

Perante o resultado apresentado na tabela 3.2 verifica-se que nos serviços com internamento foi encontrada uma maior diversidade de fungos: serviço de cirurgia (20) e de neonatologia (13), bem como no ar do bloco operatório (13).

Nas Unidades do Hospital de Dia não se observou uma diversidade tão acentuada de morfotipos fúngicos o que pode corresponder à existência de contaminações ambientais por um pequeno número de variedades de espécies fúngicas. Deste modo, na unidade de oncologia, onde se observou uma prevalência acentuada de unidades formadoras de colónias (tabela 3.1) mas uma diversidade muito baixa de morfotipos fúngicos (tabela 3.2), podemos estar na presença de uma grande concentração de propágulos fúngicos das mesmas espécies nas mesmas instalações hospitalares, pondo em risco a saúde dos pacientes que a frequentam, muito principalmente se forem imunocomprometidos.

3.2 Fungos encontrados nos diferentes locais da colheita da amostra

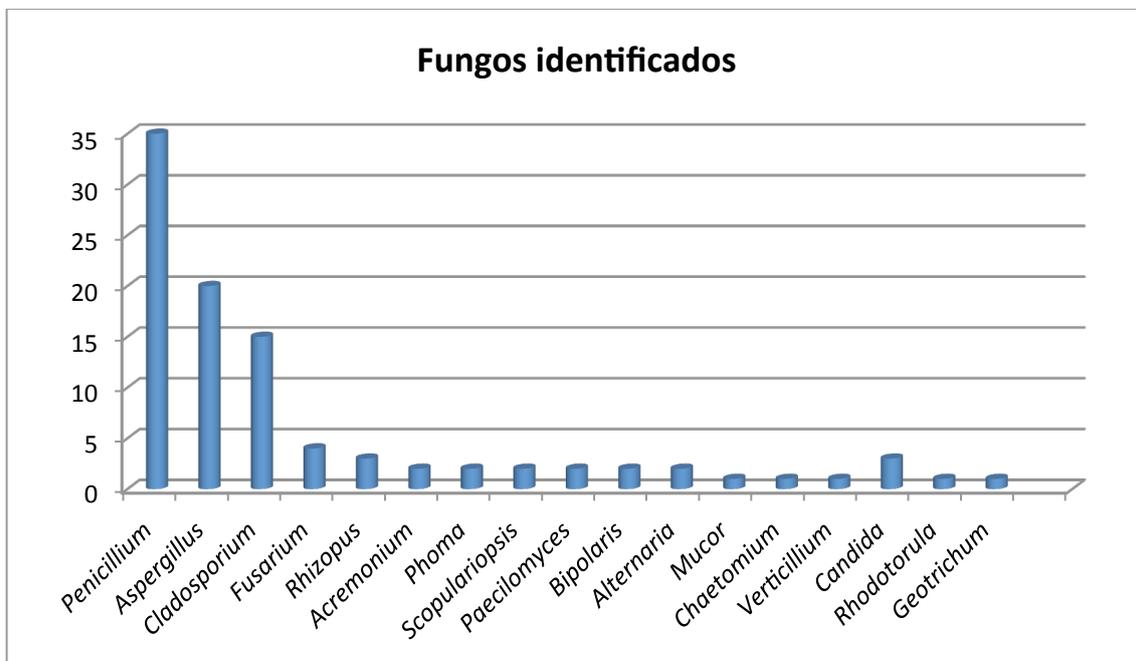
A identificação dos fungos filamentosos isolados neste estudo foi efetuada, numa primeira fase, até ao género, utilizando métodos macro e microscópicos convencionais, com o auxílio de atlas de identificação de Hoog *et al.* (2000) e Lacaz *et al.* (2002) e numa segunda fase pela análise das sequências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

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

Pela análise da figura 3.1 verifica-se que os fungos identificados com maior frequência pertenciam às espécies dos géneros *Penicillium* (35), *Aspergillus* (20), e *Cladosporium* (15), ao

contrário das espécies dos géneros *Rhodotorula* (1), *Verticillium* (1), *Geotrichum* (1), *Mucor* (1) e *Chaetomium* (1) que foram isoladas em menor frequência. Os trabalhos realizados por Kim & Kim (2007) e Faure *et al.* (2002) referem-nos resultados semelhantes em estudos realizados em hospitais durante obras de renovação. Estes autores encontraram igualmente maior prevalência do género *Penicillium*, *Aspergillus*, e *Cladosporium* seguido de outras espécies fúngicas menos frequentes. Segundo Gniadek & Macura (2007) as espécies dos géneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium*, bem como os fungos leveduriformes como *Rhodotorula rubra* e *Candida* sp., são frequentemente isolados a partir de amostras de ar e superfícies no interior de unidades hospitalares com internamento.

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



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

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

3.2.1 Fungos encontrados no Bloco Operatório

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

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

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

* Inclui estirpes identificadas por sequenciação

Pela observação da tabela 3.3 verificou-se existir uma grande ocorrência de fungos no ar pertencentes a quatro géneros diferentes.

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

Também foram identificados molecularmente quatro estirpes de *Aspergillus* sp. e uma estirpe de *Cladosporium* sp. As estirpes do *Aspergillus* sp., foram obtidos três a partir das amostras do ar e uma de uma superfície. As amostras do ar revelaram ter dois *A. versicolor* e um *A. nidulans* e a partir da superfície, *A. niger*.

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

3.2.2 Fungos encontrados no serviço de internamento Cirúrgico e Queimadura

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

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

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

* Inclui estirpes identificadas por sequenciação

Inclui estirpes identificadas por método bioquímico (API)

Alguns dos fungos que foram inicialmente isolados (n=5) não chegaram a ser identificados porque não se desenvolveram na subcultura.

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

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

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

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

3.2.3 Fungos encontrados no serviço de internamento de Neonatologia

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

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

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

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

* Inclui estirpes identificadas por sequenciação

3.2.4 Fungos encontrados no serviço de internamento de Infeciologia

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

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

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

* Inclui estirpes identificadas por sequenciação

Pela observação da tabela 3.6 verifica-se que houve pouca ocorrência de fungos neste serviço hospitalar. O género mais predominante foi *Penicillium* sp., que estava presente em todas as

amostras. Para além destas, outras espécies foram identificadas por este método, como um isolado de *Candida stellimalicola* obtida a partir de uma amostra de água.

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

3.2.5 Fungos encontrados no serviço de Oncologia

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

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

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

* Inclui estirpes identificadas por sequenciação

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

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

3.2.6 Fungos encontrados no serviço de Hemodiálise

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

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

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

* Inclui estirpes identificadas por sequenciação

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

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

3.3 Espécies de maior importância médica e com maior prevalência.

Segundo a análise dos resultados do ponto anterior (3.2) os géneros *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., e *Cladosporium* sp. foram encontrados em maior frequência e praticamente em todas as culturas obtidas a partir das amostras em estudo. No entanto, estes géneros podem ser, em algumas circunstâncias, patogénicas para um determinado grupo de pacientes hospitalizados.

O género *Cladosporium* sp., que é considerado como sendo uma espécie inofensiva, pode causar micoses subcutâneas em alguns pacientes debilitados quando inoculada diretamente no

organismo, através da introdução de uma sonda, de um cateter ou durante um corte cirúrgico. Outros fungos comuns, como as espécies de *Penicillium* sp., que são muito abundantes na natureza, também podem causar infecções oportunistas (penicilioses) em pacientes com doenças pulmonares como bronquite (Kwon-Chung & Bennett, 1992). Ainda, as espécies do gênero *Aspergillus*, que são ubíquas na natureza, têm sido apontadas por vários autores como sendo uma importante causa de morte por infecções oportunistas em diferentes grupos de pacientes imunocomprometidos.

Até há poucos anos, *A. fumigatus* era a espécie deste gênero considerada mais patogénica mas, nestas últimas décadas, com o aumento do número de casos de debilidade imunológica e de outros fatores de risco, como neoplasias, neutropenia acentuada, corticoterapia, têm ocorrido cada vez mais frequentemente infecções invasivas por outras espécies de *Aspergillus*, como por exemplo por *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. versicolor*, etc. (Barnes & Marr, 2006). No presente estudo também encontramos um leque variado destas espécies, presentes praticamente em todas as unidades do hospital em estudo (Tabela 3.9).

Observando a tabela 3.9 verificamos que as superfícies foram as fontes a partir das quais se isolou maior número de estirpes de *Aspergillus* sp., tendo sido as superfícies da Unidade de Cirurgia as que apresentaram o maior número de ocorrência destas espécies. Com alguns dos isolados não foi possível fazer a identificação até à espécie, uma vez que o resultado da sequenciação da região ITS do rDNA apresentou uma homologia de 99 ou 100% com mais do que uma espécie quando comparadas com as sequências depositadas na base de dados NCBI. No entanto, ainda foram identificados cerca de nove espécies diferentes do gênero *Aspergillus* a partir das colheitas realizadas neste hospital: *A. versicolor*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. tubingensis*, *A. wentii*, *A. westerdijkiae*, *A. unguis* e *A. tamaritii* (figura 3.2).

Segundo Denning (1998), algumas destas espécies de *Aspergillus* como *A. flavus*, *A. niger*, e *A. nidulans* podem ser responsáveis por infecções invasivas em pacientes imunocomprometidos, enquanto outras espécies como *A. versicolor*, *A. wentii*, *A. unguis*, *A. tubingensis*, *A. niger*, *A. westerdijkiae* e *A. tamaritii* raramente causam doenças.

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

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

(> seq)* sequências disponíveis no anexo III.

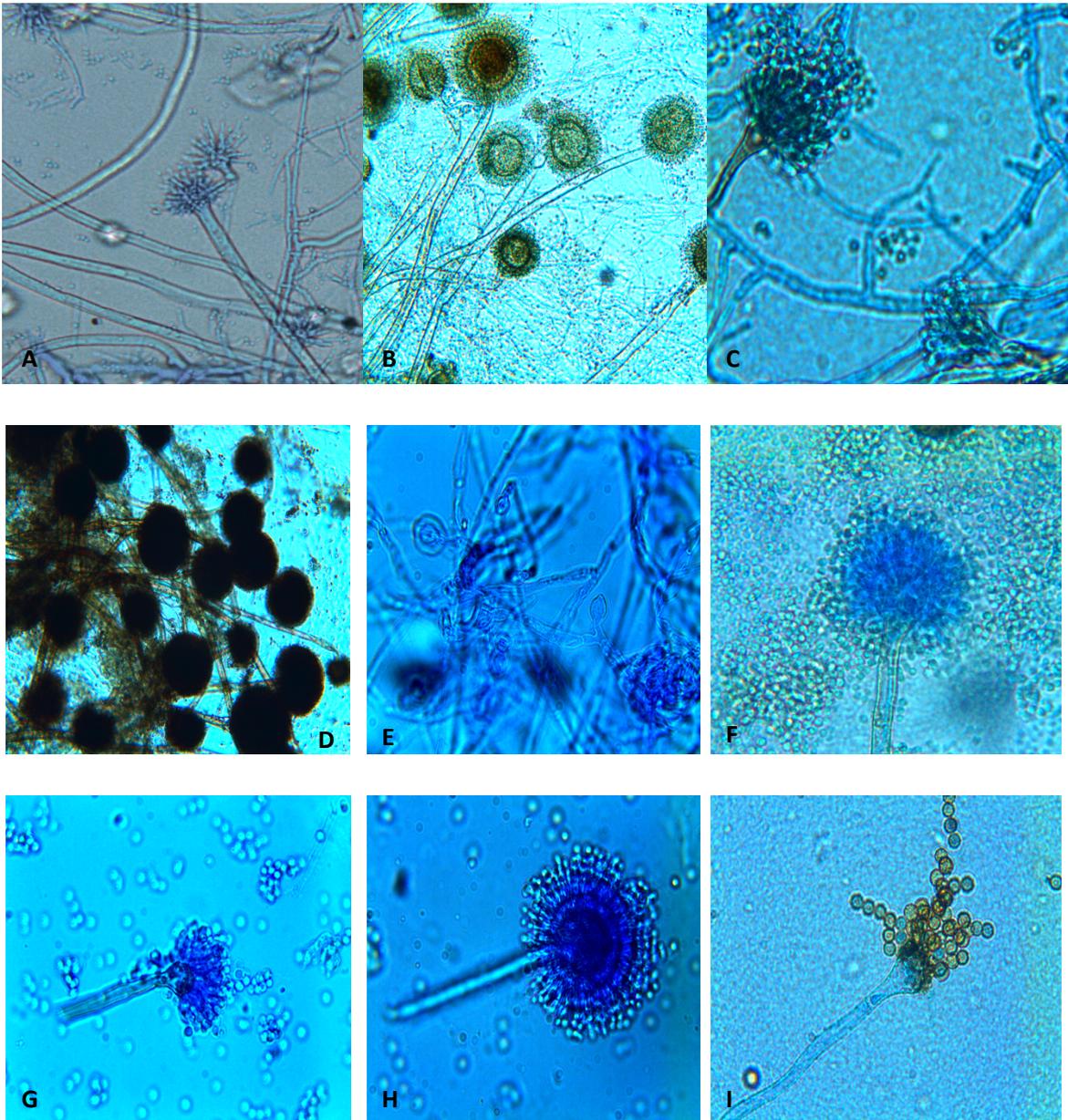


Figura 3.2 Observação microscópica das diferentes espécies de *Aspergillus* identificadas neste estudo. (A) *A. versicolor*; (B) *A. wentii*; (C) *A. unguis*; (D) *A. tubingensis*; (E) *A. niger*; (F) *A. westerdijkiae*; (G) *A. nidulans*; (H) *A. flavus* e (I) *A. tamarii*.

Capítulo IV: Conclusões e Recomendações

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

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

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

No presente estudo foi feita a avaliação epidemiológica dos fungos presentes no ar, água e superfícies no interior de alguns serviços do Hospital Agostinho Neto, na cidade da Praia, ilha de Santiago, Cabo Verde. Em todas as amostras recolhidas para o estudo verificou-se a existência de fungos, sendo que em algumas placas de petri não foi possível a sua identificação devido ao rápido crescimento das colónias dos fungos, com sobreposição das mesmas, impedindo o seu isolamento. As amostras de superfícies foram as que apresentaram maior número de colónias fúngicas (2696 ufc/m²), seguidas das provenientes da água (685 ufc/m³) e por fim, em menor quantidade, do ar (393 ufc/m³). No entanto perante esses resultados positivos podemos justificar a hipótese de que tanto a água, o ar como as superfícies inanimadas existentes no

interior do hospital Agostinho Neto, podem desempenhar um papel importante como fatores de risco para a transmissão de fungos responsáveis por infecções invasivas oportunistas.

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

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

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

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

Bibliografia

- Alberti, C., Bouakline, A., Ribaud, P., Lacroix, C., Rousselot, P., Leblanc, T., & Derouin, F. (2001). Relationship between environmental fungal contamination and the incidence of invasive aspergillosis in haematology patients. *Journal of Hospital Infection*, 48 (3): 198–206.
- Alexopoulos, C., Mims, C., & Blackwell, M. (1996). *Introductory Mycology* (4th Edition ed.). New York: John Wiley & Sons.
- Anaissie, E. J., Stratton, S. L., Dignani, M. C., Lee, C.-k., Summerbell, R. C., & Rex, J. H. (2003). Pathogenic molds (including *Aspergillus* species) in hospital water distribution systems: a 3-year prospective study and clinical implications for patients with hematologic malignancies. *Blood*, 101: 2542-2546.
- Ascioglu, S., Rex, J. H., Pauw, B. d., Bennett, J. E., Bille, J., Crokaert, F., Denning DW, Donnelly JP, Edwards JE, Erjavec Z, Fiere D, Lortholary O, Maertens J, Meis JF, Patterson TF, Ritter J, Selleslag D, Shah PM, Stevens DA, Walsh TJ; Invasive Fungal Infections Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer; Mycoses Study Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (2002). Defining Opportunistic Invasive Fungal Infections in Immunocompromised Patients with Cancer and Hematopoietic Stem Cell Transplants: An International Consensus. *Clinical Infectious Diseases*, 34: 7-14.
- Bahtti, Z., Shaukat, A., Almyroudīs, N. G., & Segal, B. H. (2006). Review of epidemiology, diagnosis, and treatment of invasive mould infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Mycopathologia*, 162(1): 1-15.
- Baldwin, B. G., Sanderson, M. J., Porter, J. M., Wojciechowski, M. F., Campbell, C. S., & Donoghue, M. J. (1995). The ITS region of Nuclear Ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 82(2): 247-277.
- Barbedo, L. S., & Sgarbi, D. B. (2010). Candidíase. *J bras Doenças Sex Transm*, 22(1): 22-38.
- Barnes, M. P., & Marr, M. D. (2006). Aspergillosis: Spectrum of Disease, Diagnosis, and Treatment. *Infect Dis Clin N Am*, 20(3): 545–561.
- Bôas, P. J., & Ruiz, T. (2004). Occurrence of hospital infection among inpatients in a university hospital. *Rev saude publica*, 38 (3) 372-378.
- Cornet, M., Levy, V., Fleury, L., Lortholary, J., Barquins, S., Coureul, M.-H., Deliere E, Zittoun R, Brûcker G, Bouvet A. (1999). Efficacy of prevention by high-efficiency particulate air filtration or laminar airflow against aspergillus airborne contamination during hospital renovation. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 20(7): 508-513.
- Deacon, J. (1984). *Introdução to Modern Mycology*. Boston: Blackwell Scientific Pub.
- Denning, D. W. (1998). Invasive Aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*, 26:781–805.
- Faure, O., Fricker-Hidalgo, H., Lebeau, B., Mallarety, M. R., Ambroise-Thomas, P., & Grillot, R. (2002). Eight-year surveillance of environmental fungal contamination in hospital operating rooms and haematological units. *Journal of Hospital Infection*, 50(2): 155-160.

- Gniadek, A., & Macura, A. (2007). Intensive care unit environment contamination with fungi. *Advances in Medical Sciences*, 52: 283-287.
- Guarro, J., Gené, J., & Stchigel, A. M. (1999). Developments in Fungal Taxonomy. *Clinical microbiology reviews*, 12: 454–500.
- Harbarth, S., Sax, H., & Gastmeier, P. (2003). The preventable proportion of nosocomial infections: an overview of published reports. *Journal of Hospital Infection*, 54, 258–266.
- Hawksworth, D. L. (2001). The magnitude of fungal diversity : the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105: 1422-1432.
- Hedayati, M., Mayahi, S., Movahedi, M., & Shokohi, T. (2011). Study on fungal flora of tap water as a potential reservoir of fungi in hospitals in Sari city, Iran. *Journal de Mycologie Médicale*, 21: 10–14.
- Hinrichsen, S. L., Falcão, É., Vilella, T. A., Colombo, A. L., Nucci, M., Moura, L., . . . Almeida, L. (2008). Candidemia em hospital terciário do nordeste do Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41(4): 394-398.
- Hoog, G. d., Guarro, J., Gené, J., & Figueras, M. (2000). *Atlas of Clinical Fungi 2 ed.* Netherlands/Universitat Rovira Virgili : Contralbureau voor Schimmelcultures. Neetherlands
- INE, C. 2. (2010). *IV Recenseamento geral da população e da habitação -2010*. Praia - Cabo Verde: Instituto Nacional de Estatística (INE).
- Jorge, I. N. (2002, Maio). *Prevenção de infecções Adquiridas no hospital*. Retrieved Maio 20, 2011, from World Health Organization 2002: http://www.opas.org.br/gentequefazsaude/bvsde/bvsacd/cd49/man_oms.pdf
- Joseph, A. (2006, julho 1). *The Impact of the Environment on Infections in Healthcare Facilities*. Retrieved from The Center for Health Design: www.healthdesign.org
- KIM, K., & KIM, C. (2007). Airborne microbiological characteristics in public buildings of Korea. *Building and Environment, Elsevier.*, 42: 2189-2196 .
- Kwon-Chung, K. J., & Bennett, J. E. (1992). *Mecical Mycology*. Philadeiphia: Lea & Febiger.
- Lacaz, C. S. (1977). *Micologia Médica*. Ed. Sarvier, São Paulo.
- Lacaz, C. S., Porto, E., Martins, J., Heins-Vaccari, E., & Melo, N. (2002). *Tratado de micologia médica* (9º ed.). São Paulo, Sarvier.
- Latge, J. P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical microbiology reviews*, 12: 310–350.
- Low, C.-Y., & Rotstein, C. (2011). Emerging fungal infections in immunocompromised patients. *F1000 Medicine Reports*, 3: 1-8.
- Maertens, J., Groll, A. H., Cordonnier, C., Cámara, R. d., Roilides, E., & Marchetti, O. (2011). Treatment and timing in invasive mould disease. *J Antimicrob Chemother*, 66: 37–43.
- Marchetti, O., Bille, J., Fluckiger, U., Eggimann, P., Ruef, C., Garbino, J., Calandra T, Glauser

- MP, Täuber MG, Pittet, D. (2004). Epidemiology of Candidemia in Swiss Tertiary Care Hospitals: Secular Trends, 1991–2000. *Clinical Infectious Diseases*, 38(3): 311–320.
- McFee, R. B. (2009). Nosocomial or hospital-acquired infections: an overview. *Disease-a-Month*, 5(7): 422-438.
- Moura, M. E., Ramos, M. N., Sousa, C. M., Silva, A. O., & Alves, M. D. (2008). Hospital infections in the eyes of Portuguese nurses: social representations. *Red Revistas Científicas da América Latina*, 17: 743-749.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaüer, M. (2007). *Microbiología Médica*. Madrid, España: Elsevier España, S.A.
- Norton, S. A. (1994). Deep fungal skin diseases. In: James WD, ed. *Military dermatology. Textbook of military medicine—Part 3, disease and the environment* Washington D.C. *Department of the army*, 18: 453-492.
- Oliveira, J. C. (1999). *Tópicos de Micologia Médica*. Ed. Control lab. Rio de Janeiro
- Panagopoulou, P., Filioti, J., Petrikosy, G., Giakouppiy, P., Anatoliotakiz, M., Farmaki, E., . . . Roilides, E. (2002). Environmental surveillance of filamentous fungi in three tertiary care hospitals in Greece. *Journal of Hospital Infection*, 52(3): 185-191.
- Perdelli, F., Cristina, M. L., Sartini, M., Spagnolo, A. M., Dallera, M., Ottria, G., . . . Orlando, P. (2006). Fungal Contamination in Hospital Environments. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 44-47.
- Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2004). Rare and Emerging Opportunistic Fungal Pathogens: Concern for Resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (10): 4419-4431.
- Płaza, G. A., Upchurch, R., Brigmon, R. L., Whitman, W. B., & Ulfig, K. (2004). Rapid DNA Extraction for Screening Soil Filamentous Fungi Using PCR Amplification. *Polish Journal of Environmental Studies*, 13 (3): 315-318.
- Rementeria, A., López-Molina, N., Ludwig, A., Vivanco, A., Bikandi, J., Pontón, J., & Garaizar, J. (2005). Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Revista Iberoamericana de Micología*, 22(1): 1-23.
- Ribeiro, D. C., Bogo, A., Dantas, A. C., Gomes, E. A., Coelho, C. M., & Guidolin, A. F. (2009). Comparison of the PCR-RFLP and ITS-rDNA sequencing technique for phylogenetic analyze of. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 8: 43-52.
- Richardson, M. D., & Warnock, D. W. (2003). *Fungal infection: Diagnosis and Managent*. (3^o ed.). Blackwell Publishing Ltd.
- Richardson, M., & Lass-Flörl, C. (2008). Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clin Microbiol Infect*, 14: 5–24.
- Ruiz, B. &. (2004). occurrence of hospital infection among interned elderly in a university hospital. *Rev Saude Publica*, 3: 371-8.
- Sabino, R. (2010). Molecular epidemiology studies of candidiasis in oncological patients and development of new polymorphic microsatellite markers to distinguish candida

parapsilosis. Tese de Doutoramento em Ciências (área de conhecimento de Biologia). Universidade do Minho. Portugal

- Santos, I. M., Venâncio, A., & Lima, N. (1998). *Fungos contaminantes na indústria alimentar*. EDITORA de Abel António Bezerra, Braga.
- Saúde, M. d. (2000, junho 25). *Curso básico de controlo de infecção hospitalar*. Retrieved from Agência nacional de vigilância sanitária: <http://www.ccih.med.br/caderno%20a.pdf>
- Sautour, M., Dalle, F., Olivieri, C., L'ollivier, C., Enderlin, E., Salome, E., Chovelon I, Vagner O, Sixt N, Fricker-Pap V, Aho S, Fontaneau O, Cachia C, Bonnin, A. (2009). Sautour M, Dalle F, Olivieri C. et al. (2009). A prospective survey of air and surface fungal contamination in a medical mycology laboratory at a tertiary care university hospital. *Am J Infect Control*, 37(3): 189-194.
- Sautour, M., Sixt, N., Dalle, F., L'Ollivier, C., Calinon, C., Fourquenet, V., Thibaut C, Jury H, Lafon I, Aho S, Couillault G, Vagner O, Cuisenier B, Besancenot JP, Caillot D, Bonnin, A. (2007). Prospective survey of indoor fungal contamination in hospital during a period of building construction. *Journal of Hospital Infection*, 67(4): 367-373.
- Schübler, A., Schwarzott, D., & Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.*, 105: 1413-1421.
- Sehulster, L. M., Chinn, R. Y., Arduino, M., Carpenter, J., Donlan, R., Ashford, D., Cleveland, J. (2004). Guidelines for Environmental Infection Control in Health-Care Facilities. *American Society for Healthcare Engineering*, 52: 1- 231.
- Sidrim, J. J., & Rocha, M. F. (2004). *Micologia Médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro : Guanabara koogan S.A.
- Sixt, N., Dalle, F., Lafon, I., Aho, S., Couillault, G., Valot, S., C. Calinon V., Danaire O. Vagner, B. Cuisenier, M. Sautour, J.P. Besancenot, C. L'Ollivier, D. Caillot, Bonnin, A. (2007). Reduced fungal contamination of the indoor environment with the Plasmair™ system (Airinspace). *Journal of Hospital Infection*, 65: 156-162.
- Verde, M. d. (2010). *Relatório estatístico do hospital Agostinho Neto Praia - Cabo Verde*. Praia - Cabo Verde: Ministerio da Saúde de Cabo Verde.
- Weinstein, R. A. (1998). Nosocomial infection update. *Emerging Infectious Diseases*, 4(3): 416-420.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. INNIS, *PCR protocols: a guide to methods and applications* (pp. 315-322). Academic Press. San Diego, Califórnia.

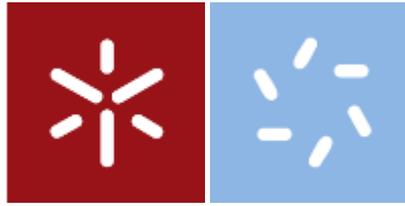
Anexo I

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

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

BUA - Banco de Urgência para Adulto

BUP - Banco de Urgência da Pediatria



Universidade do Minho

Escola de Ciências - Departamento de Biologia

METODOLOGIA DAS COLHEITAS

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

Bloco operatório (B):

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

Sala de Internamento (I) de:

- Unidade de Hemodialise (UH).
- Unidade de Neonatologia (UN)
- Unidade de oncologia (U.O)
- Internamento de Infeciologia (I I)
- Internamento de cirurgia (I.C)

Ar exterior envolvente do hospital (AE) - controle.

(no exterior das janelas do hospital)

2 - Amostras a colher em cada sala

- Superfícies – mesas do trabalho, mesas-de-cabeceira, bandejas de ar condicionado e de

objectos e equipamentos existentes;

- Ar atmosférico de cada local;

- Água corrente usada em cada local;

B.O. – Bloco Operatório

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

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

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

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

I.N. - Internamento de Neonatologia

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

I.N. C- Internamento de Neonatologia Controlo

U.O. - Unidade de Oncologia

I.I. - Internamento de Infeciologia

I.C.- Internamento Cirúrgico

U.H.- Unidade de Hemodialise

A.A. - Agua autotanque

LOCAL DA COLHEITA**Bloco Operatório****DATA** ___/___/___

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

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

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

LOCAL DA COLHEITA

Internamento de Neonatologia

DATA ____/____/____

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

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

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

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

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

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

LOCAL DA COLHEITA**Internamento de Infeciologia****DATA** ___/___/___

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

LOCAL DA COLHEITA**Intenamento Cirúrgico****DATA** ___/___/___

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

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

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

LOCAL DA COLHEITA

Unidade de Hemodialise

DATA ___/___/___

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

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

Controlo da água do hospital

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

<< Seq 1

TGATCCGAGGTCACCTGAAAAAATGGTTGGAGACGTCGGCTGGCGCCCGGCCGCTAATCGAGCG
GGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACACGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCC
GGGGGGGACGACGACCCAACACACAAGCCGGGCTTGATGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGC
CCCCCGAATGCCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACA
TACTTATCGCAGTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTGAC
TGATTTTATATTCAGACTCAGACTGCATCACTCTCAGGCATGAAGTTCAGTAGTCCCCGGCGGCT>>

<< Seq 2

CCAACCTCCCACCCTTGAATACTGAACACTGTTGCTTCGGCGGGGCGTCCCCCTGGAACCTCCGGGA
GGGGCAAGCCCGCCGAGACCACCGAACTTCATGCCTGAGAGTGATGCAGTCTGAGCCTGAAATATAAA
TCAGTCAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAACTGCGATAA
GTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCG
GGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTCCCC
CCCGGGGACGGACCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCGTGTCCGGTCCCGAGCGTATGGGGCTTTGTC
ACCCGCTCGATTAGGACCGGCCGGGCGCCCGCCGGCGTCAAACCCCAATCTTTCTAAGGTTGACCTC
GGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAA>>

<< Seq 3

GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGTCTTTGGGCCAACCTCCCATCCGTGTCT
ATTGTACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGCTTGTGCGCCGCCGGGGGGCGCCTCTGCCCCCG
GGCCCGTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAACACTGTCTGAAAGCGTGACAGTCTGAGTTGATTGAATG
CAATCAGTTAAAACCTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT
AACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCC
GGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCC
CCTCTCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGC
TTTGTACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACGTTTTCCAACCATTCTTCCAGGTTGACC
TCGGATCA>>

<< Seq 4

CTACCTGATCCGAGGTCAACCTGAAAAAATGGTTGGAAAACGTCGGCAGGCGCCGGCCAATCCTACA
GAGCATGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCGT
CCCCCGGAGAGGGGGACGGCGACCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGA
CAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCT
GCAATTCACATTAGTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGA
AAGTTTTAACTGATTGCATTCAATCAACTCAGACTGCACGCTTTCAGACAGTGTTCTGTTGGGGTCTCC
GGCGGGCACGGCCCCGGGGGCAAAGGCGCCCCCGGCGGCCGACAAGCGGGCGGCCCGCCGAA
GCAACAGGGTATAATAGACACGGATGGGAGGTTGGGCC>>

<< Seq 5

TCAACCTGAAAAAATGGTTGGAAAACGTCGGCAGGCGCCGGCCAATCCTACAGAGCATGTGACAAAG
CCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCCCGGAGAGGG
GGACGGCGACCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCG
GAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAGTTA
TCGCATTTGCTGCGTTCTTCATTGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGC
ATTCAATCAACTCAGACTGCACGCTTTCAGACAGTGTTCTGTTGGGGTCTCCGGCGGGCACGGGCC
GGGGGGCAAAGGCGCCCCCGGCGGCCGACAAGCGGGCGGCCCGCCGAAGCAACAGGGTATAATA
GACACGGATGGGAGGTTG>>

<< Seq 6

GATCCGAGGTCACCTGGTTAAAAAAGGTTGGTGGTCCGGCAGGCGCCGGCCGGCCTACAGAGCGGG
TGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCCCGG
GAAGGGGACGGCGACCCAACACACAAGCCGTGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCC
CCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACAT
TAATTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACG
ATTAATAAATCGACTCAGACTGCAACCTTCAGACAGTGTTCGTGTTGGTGTCTCCGGCGGGCGCGGGC
CCGGGGGCGAGATGCCCCCGGGCGGCCACGAATGGCGGGCCCGCCGAAGCA>>

<< Seq 7

CTGATCCGAGGTCAACCTGAGAAAAATAAGGTTGGAGACGCCGGCTGGCGCCCGGGCCGGCCCTAATCG
AGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACACGCGTCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCGTC
CCCCGGGGGGGACGACGACCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCA
TGCCCCCGGAATGCCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTC
ACATTACTTATCGCAGTTCGCTGCCTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTT
GA>>

<< Seq 8

TGAAAAAGATTGATTTGCGTTCGGCAAGCGCCGGCCGGCCTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATAC
GCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCCCGGAGAGGGGACGACG
ACCCAACACACAAGCCGTGCTTGATGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCA
GGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTACGGAATTCTGCAATTCACACTAGTTATCGCATT
TCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCGATACAA
TCAACTCAGACTTCACTAGATCAGACAGAGTTCGTGGTGTCTCCGGCGGGCGCGGGCCCGGGGCTGAG
AGCCCCCGGGCGCCATGAATGGCGGGCCCGCCGAAGCAACTAAGGTACAGTAAA>>

<< Seq 9

AACCTCCCACCCGTGACTACCTAACACTGTTGCTTCGGCGGGGAGCCCCCTAGGGGCGAGCCGCCGG
GGACCACTGAATTCATGCCTGAGAGTGATGCAGTCTGAGCCTGAATACAAATCAGTCAAACCTTCAA
CAATGGATCTCTTGGTTCGGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAACTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA
ATTGAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTCC
GAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTGCTCGTCCCCCGGGGGACGGGCC
GAAAGGCAGCGGCGGCACCGTGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCGATTAGGG
CCGGCCGGGGCGCCAGCCGGCGTCTCCAACCT>>

<< Seq 10

CCAACCTCCCACCCGTGATACCGTACCTTGTGCTTCGGCGAGCCCGCCCCCTTCTTAGGGGTGG
CACAGCGCTCGCCGAGACACCAACGTGAACACTGTCTGAAGTTTTGTCGTCTGAGTCGATTGTATCGC
AATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCGGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA
ATTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCACCCCTGGTATTCCG
GGGGTATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTGCTCGTCCCC
CCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTC
ACCCGCTCTTGTAGGCCCGGCCGGCTGCTGGCCGACGCTGAAAAGCAACCAATTTATTTCTCCAGTT
GACCTCGGATC>>

<< Seq 11

GTCAACCTGGAAAAAGATTGATTTGCGTTCGGCAAGCGCCGGCCGGCCTACAGAGCGGGTGACAAAG
CCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCCCGGAGAGG
GGACGACGACCCAACACACAAGCCGTGCTTGATGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCC
GGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTACGGAATTCTGCAATTCACACTAGT

TATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATT
GCGATAACAATCAACTCAGACTTCACTAGATCAGACAGAGTTCGTGGTGTCTCCGGCGGGCGCGGGCCC
GGGGCTGAGAGCCCCCGGCGGCCATGAATGGCGGGCCCGCCGAAGCAACTAAGGTACAGTAAACACG
GGTGGGAG>>

<< Seq 12

AGTGGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGGAAAGAATGGTTGTTTTGCGTTCCGGCAAGCGCC
GGCCGGGCTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGC
CTTTGGGGCCCGTCCCCCCCCGAAGAGGGGACGACGCCAACACACAAGCCGTGCTTGATGGGCAGC
AATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGA
TTCACGGAATTCTGCAATTCACACTAGTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGA
GATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCGATAACAATCAACTCAGACTTCACTAGATCAGACAGAGTTC
GTGGTGTCTCCGGCGGGCGCGGGCCCCGGGGGCTGATGCCCCCGGCGGCCCTAAAGGCGGGCCCCG
CGAAGCAACTAAGGTTACAGTAAACACGGGTGGGAGGTTG>>

<< Seq 13

TCAACCTGAAGAAAAATGGTTGGAGACGTCCGGCTGGCGCCCCGGCCGGCCCTAGTCGAGCGGGTGACA
AAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACACGGTGCCGCCGCTGCCTTTGGGGCCCGTCCCCCGGGGGG
GACGACGCCAACACACAAGCCGGGCTTGATGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCG
GAATGCCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTA
TCGCAGTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTGACTGATTTT
ATATTCAGACTCAGACTGCATCACTCTCAGGCATGAAGTTCAGTAGTCCCCGGCGGCTCGCCCCGAG
GGGTTCCCCCGCCGAAGCAACAGTGTTAGGTATTCACGGGTGGGAGGTTGGGCGC>>

<< Seq 14

GAGGTCAACCTGGAAAAAGATTGATTTGCGTTCCGGCAAGCGCCGGCCGGGCCTACAGAGCGGGTGACA
AAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTGGGGCCCGTCCCCCGGGAGA
GGGGACGACGACCCAACACACAAGCCGTGCTTGATGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCC
CCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTACGGAATTCTGCAATTCACACTA
GTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGA
TTGCGATAACAATCAACTCAGACTTCACTAGATCAGACAGAGTTCGTGGTGTCTCCGGCGGGCGCGGGC
CCGGGGCTGAGAGCCCCCGGCGGCCATGAATGGCGGGCCCGCCGAAGCAACTAAGGTACAGTAAACA
CGGGTGGG>>

<< Seq 15

TGAGAAAAATAAGGTTGGAGACGCCGGCTGGCGCCCCGGCCGGCCCTAATCGAGCGGGTGACAAAGCC
CCATACGCTCGAGGACCGGACACGGTGCCGCCGCTGCCTTTGGGGCCCGTCCCCCGGGGGGACGA
CGACCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATGC
CAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCA
GTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTGACTGATTTGTATTC
AGGCTCAGACTGCATCACTCTCAGGCATGAAGTTCAGTGGTCCCCGGCGGCTCGCCCCCTGGGGGGCT
CCCCCGCCGAAGCAACAGTGTTAGGTAGTCACGGGTGGGAGGT>>