

**SABRINA MESQUITA ROCHA**

**OCORRÊNCIA DE FUNGOS EM SISTEMA DE  
DISTRIBUIÇÃO DE ÁGUA E SUA CORRELAÇÃO COM  
ISOLADOS DO AR EM UMA UNIDADE PEDIÁTRICA DE  
TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO  
HEMATOPOIÉTICAS**

Tese apresentada à Universidade Federal  
de São Paulo – Escola Paulista de  
Medicina, Departamento de Medicina-  
Disciplina de Infectologia, para obtenção  
do Título de Mestre em Ciências.

**SÃO PAULO  
2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**SABRINA MESQUITA ROCHA**

**OCORRÊNCIA DE FUNGOS EM SISTEMA DE  
DISTRIBUIÇÃO DE ÁGUA E SUA CORRELAÇÃO COM  
ISOLADOS DO AR EM UMA UNIDADE PEDIÁTRICA DE  
TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO  
HEMATOPOIÉTICAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, Departamento de Medicina - Disciplina de Infectologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

**Orientador:** Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo

**Co-orientador:** Dr. Patrício Christian Godoy  
Martinez

São Paulo  
**2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

Chefe do Departamento: Prof. Dr. Ângelo Amato Vincenzo de Paola

Vice-Chefe do Departamento: Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório Especial de Micologia, da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, aprovado pelo Comitê de Ética (0541/07), contando com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

# **Sabrina Mesquita Rocha**

## **OCORRÊNCIA DE FUNGOS EM SISTEMA DE DISTRIBUIÇÃO DE ÁGUA E SUA CORRELAÇÃO COM ISOLADOS DO AR EM UMA UNIDADE PEDIÁTRICA DE TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS**

### **Presidente da banca:**

Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo

---

### **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Eduardo Alexandrino Servolo de Medeiros

---

Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda

---

Prof. Dr. Alessandro Comarú Pasqualotto

---

### **SUPLENTE**

Prof. Dr. Robert Fabian Crespo

---

## Dedicatória

*À minha família:*

*Maria de Lourdes S. Rocha*

*José Lorentz Filho*

*Manoel Rocha*

*Dalva Mellilo (in memoriam)*

*Jimmy Jones*

*Carlos Ladislau*

*Bob Moon*

*Por tudo de bom que sou, pelo apoio incondicional, especialmente de minha mama e do meu “paidrastico”, pelas conversas intermináveis sobre a vida, o universo e tudo mais, pelas brigas que no final das contas trazem aprendizagem, pelas “noitadas” com meus irmãos Canis familiares, por todo amor e por compartilharem mesmo contra a vontade, muitas vezes, das minhas idéias e decisões. Amo vocês!!!*

## **Agradecimentos Especiais**

*Agradeço a Deus e a todos os santos pela graça alcançada!*

*Agradeço a minha família materna, por todo o apoio de sempre (mesmo com a distância): tia **Tê**, tia **Frã**, tio **Basa**, tia **Leide**, **Duda**, **André**, **Fabi**, **Beca**, e a minha avó **Dalila**.*

*Aos meus antigos amigos, que mesmo longe, estamos perto a cada encontro! A **Sandra Ri**, **Mateus**, **Renata**, **Sarah** & família, aos irmãos **Greg Junior** e **Danilo**, a **Mari**. Obrigada pelos momentos inesquecíveis, que sempre estão presentes quando lembro de coisas boas.*

### *A gangue*

***Gisela** (**Gi**), **Fernanda** (**Fer**), **Sarah** (**Sá**), **Ricardo** (**Richard**) e mais recentemente **Daniel da Matta** (**Dan**)*

*Por toda amizade e companheirismo. Sem nossas conversas vespertinas tudo ficaria mais difícil! Obrigada meninas por oferecerem suas casas (e às vezes um pouco mais, diria a **Fer**) nos momentos em que não conseguiria chegar a “Taboão das Trevas – ZR”. Obrigada por toda troca de conhecimento, pelas conspirações e teorias, pela iniciativa, que às vezes me faltou (esta é para você **Sá!**), pelo abraço matutino (**Richy**) por todas as conversas e cervejas*

*intermináveis. Obrigada a minha querida amiga, companheira de almoço e cigarros e, além disso, confidente Gi, tão sábia e centrada, e que por isso acaba escutando a todos, sempre! Dan obrigada por tudo, ainda bem que tivemos tempo suficiente para nos conhecer melhor! Você é demais... Amo muito vocês, tenho muito orgulho de vocês, e os levarei para sempre no meu coração.*

### *Ao Patrício Godoy*

*Eu te agradeço muito por tudo que representou para mim, por tudo que me ensinou ou deixou de ensinar. Você criou um monstro que adora fungos! Meu trabalho ficava mais leve quando estavas ao meu lado, e devo quase todo o conhecimento que adquiri nestes 2 anos a você. Obrigada por tudo Pato!*



## Agradecimentos

Estes dois anos passaram rápido, e neles encontrei muitas pessoas maravilhosas, que me ajudaram a atingir meu objetivo, ou agregaram conhecimento. Este espaço é dedicado a vocês.

Ao **Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo**, pela confiança, credibilidade comprometimento. Tenho um imenso respeito pelo senhor e pelo seu trabalho. Foi uma honra tê-lo como orientador. Obrigada por me abrir as portas do seu laboratório, por acreditar no meu trabalho e na minha capacidade, pela confiança que depositou em mim.

À querida **Jô (Josiane)**, maravilhosa, mega eficiente, que lembra de coisas que nem eu lembrava de ter pedido! Você é brilhante uma pessoa doce, engraçada, inteligente e ótima escritora! Te adoro muito, e te agradeço por tudo!

À **Fernanda Dias (Fer loira)** uma pessoa adorável que aprendi a admirar e gostar muito. Você é louca, ahaha.

Ao **Jorge Menezes**, querido. Espero que tenhas um futuro brilhante! Já gosto de você mesmo o conhecendo pouco.

Ao **Fernando (Fer)**, meu companheiro de tantas coisas, de tantas conversas. Obrigada por tudo, espero que mantenha tudo de bom que me fez te admirar e gostar tanto de você.

Ao **Wagner (ou Bágner para os íntimos)** muito obrigada pela hospitalidade, pela confiança e pela amizade. Gosto e admiro muito você!

À **Bianca Carareto (Bia)**, por toda a amizade e ajuda. Espero que tenhas um futuro brilhante e que possamos aprofundar nossa amizade.

Ao **Bruno (in memorian)**, meu querido amigo, obrigada pelos momentos alegres, pelos momentos “musicais”, pelo carinho e amizade.

À querida **Patrícia (Patita)** do querido Rio Grande do Sul, estado produtor de pessoas muito legais. Você é muito querida, companheira, linda e inteligente. Te adoro muito!

À **Maria (Mary)**, a **Maria Romilda**, à **Fátima** e à **Camila Uchoa**, por toda amizade, e auxílios. Obrigada pelo carinho e atenção, sem vocês tudo seria mais difícil.

À **Edmea Helena (Ed)**, nossa supervisora, por toda ajuda e conselhos preciosos dados do fundo da sua sabedoria de vida! Desejo-te tudo de bom!

À **Débora Geiger (Dé)**, minha querida companheira da micologia, por toda sua amizade e confiança.

Ao **Alessandro (Alê)**, por toda ajuda com artigos e idéias, pelas loucas conversas sobre musicas e lugares. Você é brilhante e gostaria de ser como você quando eu crescer.

A todos os amigos e colegas do LEMI que compartilharam comigo toda trajetória da minha tese e que, de alguma forma, me ajudaram a realizar este sonho: **Marcos, Mara, Guilherme, Analy, Letícia, Tiago, André, Daniel Wagner, Viviane, Robert, Thaís, Thomas e Vinicius.**

Às irmãs **Marques Portugal (Edna e Edilma)**, e as minhas crianças **Puppy e Tricia** por todo carinho de sempre!

Aos meus amigos de pós aos sábados: **Aline, Jack Joe, Demis e Paulo.** Obrigada pela companhia, por toda ajuda nos trabalhos e nas aulas, e pelas conversas super produtivas após as aulas. Foi muito bom conhece-los.

Aos colegas e amigos de Prefeitura da Cidade de São Paulo: **Marina, Fátima, Lúcia, Neide, Rosana, Leonor, Marlene Elizabeth, Marta, Ciro, Dora, Gilson, Ana, Clara, Rafael e Eduardo e Janaína.** Obrigada por facilitarem minha vida em alguns momentos, pelos conselhos de sempre (**Ciro, Bete, Marta, Fá e Lulu**) e pela boa convivência.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para esse trabalho.

**Muito Obrigada....**

*"Às vezes tenho idéias, felizes,  
Idéias subitamente felizes, em idéias  
E nas palavras em que naturalmente se despegam...*

*Depois de escrever, leio...  
Por que escrevi isto?  
Onde fui buscar isto?  
De onde me veio isto? Isto é melhor do que eu...  
Seremos nós neste mundo apenas canetas com tinta  
Com que alguém escreve a valer o que nós aqui traçamos?*

*Álvaro de Campos  
(heterônimo de Fernando Pessoa)*

## Sumário

Dedicatória .....	v
Agradecimentos Especiais .....	vi
Agradecimentos .....	viii
Lista de figuras.....	xiv
Lista de tabelas.....	xx
Lista de abreviaturas e símbolos .....	xxi
Resumo .....	xxii
Abstract .....	xxiii
<u>1.0 INTRODUÇÃO</u> .....	01
1.1 Epidemiologia das infecções fúngicas invasivas em unidade de transplante de células tronco hematopoiéticas.....	02
1.2 Fungos filamentosos em ambientes nosocomiais.....	06
1.3 Fungos isolados em sistemas de distribuição de água municipal.....	14
1.4 Fungos isolados em sistema de distribuição de água de hospitais.....	17
1.5 Técnicas moleculares aplicadas a estudos epidemiológicos com <i>Aspergillus</i> e <i>Fusarium</i> .....	19
<u>2. OBJETIVOS</u> .....	23
<u>3. MATERIAL E MÉTODOS</u> .....	25
3.1. Caracterização da unidade.....	26
3.2 Coletas de água e processamento de amostras.....	26
3.3 Coletas de ar.....	28
3.4 Identificação fenotípica dos fungos filamentosos isolados.....	29
3.5 Identificação fenotípica dos fungos leveduriformes isolados.....	29

3.6 Análise estatística dos dados provenientes das coletas de ar e água.....	30
3.7 Caracterização genotípica.....	31
3.7.1 Formação de protoplastos e extração do DNA (Kit Prepman Ultra Sample Preparation Reagent , Applied Biosystem).....	31
3.7.2 Quantificação do DNA.....	32
3.8 Reações de PCR Fingerprint por minissatélite e microssatélite.....	32
3.8.1 Eletroforese em gel de agarose.....	33
3.8.2 Avaliação da similaridade dos padrões de bandas.....	34
<b><u>4. RESULTADOS</u></b> .....	36
4.1 Análise da água na unidade pediátrica de transplante de células tronco hematopoiéticas.....	37
4.1.2 Análise estatística e correlação com parâmetros físico-químicos.....	44
4.2 Análise do ar realizada na unidade pediátrica de transplante de medula óssea	48
4.2.2 Correlação dos resultados descritivos com condições ambientais.....	54
4.3 Comparação entre valores e espécies isoladas do ar e da água ao longo do estudo.....	58
4.4 Avaliação genotípica das amostras de <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> e <i>Fusarium solani</i> .....	63
4.4.1 Genotipagem por minissatélite e microssatélite.....	63
4.4.2 Genotipagem das cepas de <i>Fusarium solani</i> isoladas do ar e da água na unidade pediátrica de transplante de células tronco hematopoiéticas.....	64
4.4.3 Genotipagem das cepas de <i>Aspergillus fumigatus</i> isoladas do ar e da água na unidade pediátrica de transplante de células tronco hematopoiéticas.....	68
4.4.4 Genotipagem de cepas de <i>Aspergillus flavus</i> isoladas do ar e da água na unidade pediátrica de transplante de células tronco hematopoiéticas.....	73
<b><u>5.0. DISCUSSÃO</u></b> .....	79

<u>6.0 CONCLUSÕES</u> .....	94
<u>7.0 ANEXOS</u> .....	96
<u>8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u> .....	103

Bibliografia consultada

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Pontos de coleta e volumes de água coletados ao longo do estudo envolvendo a unidade pediátrica de TCTH e sistema hidráulico.....	27
<b>Figura 2.</b> Gráfico descritivo dos principais gêneros e grupos de fungos isolados durante todo o monitoramento das áreas interna (torneiras dos quartos, banheiros e corredor) e externa (reservatórios) da unidade.....	38
<b>Figura 3.</b> Gráfico descritivo dos principais grupos de fungos isolados durante todo o monitoramento da área interna da unidade (torneiras dos quartos, banheiros e corredor).....	39
<b>Figura 4.</b> Gráfico descritivo dos principais grupos de fungos isolados durante todo o monitoramento da área externa da unidade (reservatórios).....	40
<b>Figura 5.</b> Gráfico descritivo dos principais grupos de fungos isolados durante todo o monitoramento da porta de entrada da água no hospital, proveniente do sistema de distribuição municipal (cavalete).....	41
<b>Figura 6.</b> Frequência de <i>Aspergillus</i> spp, <i>Fusarium</i> spp e Zigomicetos isolados dos reservatórios do hospital pediátrico no período de março de 2007 a fevereiro de 2008.....	42
<b>Figura 7.</b> Frequência de <i>Aspergillus</i> spp, <i>Fusarium</i> spp e Zigomicetos isolados da água da unidade interna de TCTH (torneiras dos quartos, banheiro e corredor) do hospital pediátrico no período de março de 2007 a fevereiro de 2008.....	43

**Figura 8.** Correlação entre valores mensais de cloro livre residual da água e valores mensais de unidades formadoras de colônias (UFC) de fungos filamentosos obtidos em todas as coletas de água ao longo de 12 meses de estudo..... 46

**Figura 9.** Correlação entre valores mensais da temperatura da água e valores mensais de unidades formadoras de colônias (UFC) de fungos filamentosos obtidos em todas as coletas de água ao longo de 12 meses de estudo..... 46

**Figura 10.** Correlação entre valores potencial hidrogeniônico (pH) da água e valores mensais de unidades formadoras de colônias (UFC) de fungos filamentosos obtidos em todas as coletas de água ao longo de 12 meses de estudo..... 47

**Figura 11.** Correlação entre valores mensais de turbidez da água e valores mensais de unidades formadoras de colônias (UFC) de fungos filamentosos obtidos em todas as coletas de água ao longo de 12 meses de estudo..... 48

**Figura 12.** Frequencia (UFC/m<sup>3</sup>) de todos os propágulos fúngicos isolados do ar na unidade interna (quartos e banheiros) que utilizam filtros HEPA no período de março de 2007 a fevereiro de 2008..... 49

**Figura 13.** Frequencia (UFC/m<sup>3</sup>) de todos propágulos fúngicos isolados do ar na unidade externa (corredor, hall do elevador e coleta externa) da unidade no período de março de 2007 a fevereiro de 2008..... 50

**Figura 14.** Frequencia (UFC/m<sup>3</sup>) de propágulos fúngicos de isolados do ar apenas de *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e Zigomicetos na unidade interna (quartos e banheiros) da unidade de transplante de células tronco hematopoiéticas no período de março de 2007 a fevereiro de 2008..... 51



**Figura 15.** Frequencia (UFC/m<sup>3</sup>) de propágulos fúngicos de apenas *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e Zigomicetos, isolados do ar na unidade externa (corredor, hall do elevador e área externa do hospital) no período de março de 2007 a fevereiro de 2008..... 52

**Figura 16.** Correlação entre valores mensais de temperatura ambiente e unidades formadoras de colônias por metro cúbico (UFC/m<sup>3</sup>) obtidas em 12 meses de estudos na unidade interna (quartos e banheiros) de TCTH..... 55

**Figura 17.** Correlação entre valores mensais de umidade relativa do ar e unidades formadoras de colônias por metro cúbico (UFC/m<sup>3</sup>) obtidas em 12 meses de estudos na unidade interna (quartos e banheiros) de TCTH..... 56

**Figura 18.** Correlação entre valores mensais de temperatura ambiente e unidades formadoras de colônias por metro cúbico (UFC/m<sup>3</sup>) obtidas em 12 meses de estudos na unidade externa (corredor, hall do elevador e área externa do hospital de pediatria oncológica)..... 57

**Figura 19.** Correlação entre valores mensais de umidade relativa do ar e unidades formadoras de colônias por metro cúbico (UFC/m<sup>3</sup>) obtidas em 12 meses de estudos na unidade externa (corredor, hall do elevador e área externa do hospital de pediatria oncológica)..... 58

**Figura 20.** Comparação entre propágulos fúngicos (UFC) isolados da água dos 4 reservatórios e da unidade interna (quartos e banheiros) e do ar da unidade interna de TCTH (quartos e banheiro) ao longo de 12 meses de estudo..... 59

**Figura 21.** Comparação entre propágulos fúngicos (UFC) do gênero *Fusarium* isolados da água e do ar da unidade interna (quartos e banheiros) de TCTH ao longo de 12 meses de estudo..... 60

**Figura 22.** Comparação entre propágulos fúngicos (UFC) do gênero *Aspergillus* isolados da água e do ar da unidade interna (quartos e banheiros) de TCTH ao longo de 12 meses de estudo..... 61

**Figura 23.** Comparação entre propágulos fúngicos (UFC) de Zigomicetos isolados da água e do ar da unidade interna (quartos e banheiros) de TCTH ao longo de 12 meses de estudo..... 62

**Figura 24.** Gel de agarose exibindo padrões genotípicos de isolados de *F. solani* amplificados pela técnica microsatélite, com o iniciador GTG)<sub>5</sub>. Nas canaletas temos: PM (marcador molecular); cepas 1, 10, 15, 16, 38, 57, 79, 144 FS (ATCC *F. solani* 62877) e PM (marcador molecular)..... 65

**Figura 25.** Dendrograma gerado pelo programa GelCompar II pelo método UPGMA referente aos padrões de bandas gerados por amplificação de cepas de *Fusarium solani* utilizando o “primer” (GACA)<sub>4</sub> de microsatélite..... 66

**Figura 26.** Dendrograma gerado pelo programa GelCompar II pelo método UPGMA referente aos padrões de bandas gerados por amplificação de cepas de *Fusarium solani*, utilizando o “primer” (GTG)<sub>5</sub> de microsatélite..... 67

**Figura 27.** Dendrograma gerado pelo programa GelCompar II pelo método UPGMA referente aos padrões de bandas gerados por amplificação de cepas de *Fusarium solani* utilizando o “primer” (GAC)<sub>5</sub> de microsatélite..... 67

**Figura 28.** Dendrograma gerado pelo programa GelCompar II pelo método UPGMA referente aos padrões de bandas gerados por amplificação de cepas de *Fusarium solani* utilizando o “primer” M13 de minissatélite..... 68

**Figura 29.** Gel de agarose exibindo padrões genotípicos de isolados de *Aspergillus fumigatus* amplificados pela técnica microsatélite, com o iniciador (GACA)<sub>4</sub>. Nas canaletas temos: PM (marcador molecular); cepas 88, 89, 90, FS 70 (ATCC *F. solani* 62877) e PM (marcador molecular).....

**Figura 30.** Dendrograma gerado pelo programa GelCompar II pelo método UPGMA referente aos padrões de bandas gerados por amplificação de cepas de *Aspergillus fumigatus*, utilizando o “primer” (GACA)<sub>4</sub> de microsssatélite..... 71

**Figura 31.** Dendrograma gerado pelo programa GelCompar II pelo método UPGMA referente aos padrões de bandas gerados por amplificação de cepas de *Aspergillus fumigatus* utilizando o “primer” (GTG)<sub>5</sub> de microsssatélite..... 71

**Figura 32.** Dendrograma gerado pelo programa GelCompar II pelo método UPGMA referente aos padrões de bandas gerados por amplificação de cepas de *Aspergillus fumigatus* utilizando o “primer” (GAC)<sub>5</sub> de microsssatélite..... 72

**Figura 33.** Dendrograma gerado pelo programa GelCompar II pelo método UPGMA referente aos padrões de bandas gerados por amplificação de cepas de *Aspergillus fumigatus* utilizando o “primer” M13 de minissatélite..... 72

**Figura 34.** Gel de agarose exibindo padrões genotípicos de isolados de *Aspergillus flavus* amplificados pela técnica microssatélite, com o iniciador (GTG)<sub>5</sub>. Nas canaletas temos: PM (marcador molecular); cepas 130, 132 134 135 136 137 138 142 149 150 152 207, AF (ATCC *A. flavus* IMI 190443) e PM (marcador molecular)..... 74

**Figura 35.** Dendrograma gerado pelo programa GelCompar II pelo método UPGMA referente aos padrões de bandas gerados por amplificação de cepas de *Aspergillus flavus* utilizando o “primer” (GACA)<sub>4</sub> de microsssatélite..... 75

**Figura 36.** Dendrograma gerado pelo programa GelCompar II pelo método UPGMA referente aos padrões de bandas gerados por amplificação de *Aspergillus flavus* utilizando o “primer” (GTG)<sub>5</sub> de microsssatélite..... 76

**Figura 37.** Dendrograma gerado pelo programa GelCompar II pelo método UPGMA referente aos padrões de bandas gerados por amplificação de cepas de *Aspergillus flavus* utilizando-se o “primer” (GAC)<sub>5</sub> de microsssatélite..... 77

**Figura 38.** Dendrograma gerado pelo programa GelCompar II pelo método UPGMA referente aos padrões de bandas gerados por amplificação de cepas de *Aspergillus flavus* utilizando o “primer” M13 de minissatélite..... 78

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Descrição dos pontos e volumes de coletas de água realizadas ao longo de 12 meses de estudo.....	37
<b>Tabela 2.</b> Valor total, médio e número de amostras positivas para cada espécie de fungo isolada ao longo de 12 meses de monitoramento da água de uma unidade pediátrica de transplante de células tronco hematopoiéticas.....	44
<b>Tabela 3.</b> Medidas de tendência central de todos os dados coletados na unidade interna e externa da unidade oncológica pediátrica ao longo de 12 meses de estudo. ....	45
<b>Tabela 4.</b> Valor total, médio e número de amostras positivas para cada espécie de fungo isolada ao longo de 12 meses de monitoramento do ar de uma unidade pediátrica de transplante de células tronco hematopoiéticas.....	53
<b>Tabela 5.</b> Medidas de tendência central UFC/m <sup>3</sup> , temperatura e umidade coletados na unidade interna de transplante de células tronco hematopoiéticas em 12 meses de estudo.....	54
<b>Tabela 6.</b> Medidas de tendência central: UFC/m <sup>3</sup> , temperatura e umidade coletados na área externa da unidade de transplante de células tronco hematopoiéticas.....	56
<b>Tabela 7.</b> Comparação de fungos (apenas <i>Aspergillus</i> spp. <i>Fusarium</i> spp. e Zigomicetos) isolados nas coletas de água e ar na unidade de TCTH (quartos e banheiros) e água dos reservatórios no monitoramento de 12 meses.....	63
<b>Tabela 8.</b> Isolados de <i>Fusarium solani</i> utilizados na análise genotípica.....	64
<b>Tabela 9.</b> Isolados de <i>Aspergillus fumigatus</i> utilizados na análise genotípica.....	69
<b>Tabela 10.</b> Isolados de <i>Aspergillus flavus</i> utilizados na análise genotípica.....	73

## Lista de abreviaturas e símbolo

A.: <i>Aspergillus</i>	µL: Microlitro
C.: <i>Candida</i>	mL: Mililitro
Ca <sup>2+</sup> : ions cálcio	Nº: Número
CL: cloro	NaCl: Cloreto de sódio
cm: centímetro	NaOH: Hidróxido de sódio
DNA: Ácido desoxirribonucléico	ng: Nanograma
dATP: desoxiadenosina trifosfato	ng/µL: Nanograma por microlitro
dCTP: desoxicitosina trifosfato	nm : Nanômetro
dGTP: desoxiguanosina trifosfato	nmol: Nanomol
dTTP: desoxitimidina trifosfato	NTU: unidade de turbidez
dNTP: Desoxinucleosídeo	P: Probabilidade de um evento ocorrer ao acaso
DO: Densidade óptica	pH: Potencial hidrogeniônico
EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético	pmol: Picomol
<i>et al</i> : Colaboradores	ppm: partes por milhão
F.: <i>Fusarium</i>	q.s.p: Quantidade suficiente para
g: Gramas	®: marca registrada.
GPYA: Glucose peptone yeast extract agar	RNA: Ácido ribonucleico
HCl: Ácido clorídrico	RNAse: Ribonuclease
HEPA: High efficiency particulate air	rpm: rotações por minuto
L: litro	spp.: espécie
L/min: litro por minuto	TAE: Tris acetato EDTA
M: Molar	™: <i>Trade mark</i>
mA: mili Amperagem	UFC: unidade formadora de colônia
mm: milímetro	UFC/m <sup>3</sup> : unidade formadora de colônia por metro cúbico
mM: Milimolar	UV: Ultra violeta
µg/mL: micrograma por mililitro.	Volts: unidade de corrente elétrica
Mg <sup>2+</sup> : ions magnésio	YEPD: <i>Yeast extract peptone dextrose</i> .
MgCl <sub>2</sub> : Cloreto de magnésio	%: Por cento
mg: Miligrama	°C: Graus <i>Celsius</i>
mg/mL: Miligrama por mililitro	
mg/L: Miligrama por litro	

## RESUMO

**Introdução:** Nas duas últimas décadas houve aumento do número de pacientes imunocomprometidos, e como consequência o número de infecções fúngicas, sobretudo por fungos filamentosos. Além de fontes externas de contaminação do ar de unidades de risco, recentemente investigações demonstraram que os sistemas de distribuição de água e reservatórios dos hospitais podem ser colonizados por fungos patogênicos constituindo uma importante fonte de infecção. **Objetivos:** Quantificar e identificar os fungos isolados da água e do ar de uma unidade de TCTH, e avaliar com o uso de técnicas moleculares a relação genética entre amostras de *A. fumigatus*, *A. flavus* e *F. solani*, isoladas do ar e água. **Metodologia:** O estudo foi realizado em uma unidade de TCTH, com coletas mensais em diferentes pontos ao longo de 12 meses. As coletas de ar das áreas internas e externas da unidade, foram realizadas com bioamostrador de ar, com placas de petri contendo agar Sabouraud dextrose. Nas coletas de água, amostras provenientes do sistema hidráulico da unidade, coletadas em frascos esterelizados, foram analisadas quanto aos parâmetros físico-químicos e filtradas em membrana de 0,45 µ, que posteriormente foram incubadas em agar Sabouraud dextrose para a análise microbiológica. A identificação fenotípica foi realizada utilizando chaves de identificação De Hoog *et al* (2000). Na análise genotípica, os isolados de *A. fumigatus*, *A. flavus* e *F. solani* foram tipados utilizando primers de minissatélite e microssatélite. **Resultados:** Foram realizadas 164 coletas de água, onde observamos maior quantidade de propágulos nos meses correspondentes ao outono e verão. A média de propágulos foi de 6,07 UFC/L. Os gêneros mais prevalentes foram *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Cladosporium*, sendo que dos fungos com potencial patogênico, *Fusarium* foi mais frequente na água da unidade. A temperatura da água foi o único parâmetro correlacionado com o aumento de propágulos isolados. Na análise microbiológica do ar da unidade, um total de 264 coletas foram realizadas, com maior quantidade de propágulos nos meses de outono. A média de propágulos isolados foi de 11,09 UFC/m<sup>3</sup> por ponto de coleta. Os gêneros prevalentes foram *Cladosporium* e *Penicillium*. Dentre os fungos com potencial patogênico, *Aspergillus* foi o gênero mais isolado no ar da unidade. Na análise molecular de *F. solani* não identificamos similaridade entre cepas do ar e da água, contudo, documentamos que o mesmo isolado permaneceu um período superior a 30 dias no sistema hidráulico da unidade. Duas amostras do ar, de ambientes distintos de *A. fumigatus* apresentaram alta similaridade na análise molecular. Na análise das amostras de *A. flavus*, perfis conflitantes foram obtidos com os diferentes primers, não sendo possível estabelecer relação direta entre os isolados do ar e da água. **Conclusão:** o monitoramento ambiental em unidades de risco é de grande importância não só aplicado em ocasiões de surtos, como também na avaliação de potenciais fontes de infecção nosocomial. Fungos patogênicos ao homem podem ser isolados, na água e persistir meses no sistema hidráulico constituindo um reservatório de infecção. Não identificamos relação genotípica, entre amostras provenientes do ar e da água, na análise de propágulos de *A. fumigatus*, *A. flavus* e *F. solani*.

## ABSTRACT

**Introduction:** The expansion of the immunocompromised patient population in the last two decades has led to an increased incidence of invasive fungal infections, especially by filamentous fungi. Although external sources of contamination are well known related to air-conditioning in units of risk, recent investigations have shown that water distribution systems or linked to tanks of hospitals have been also identified as an important source of infection when it is colonized by pathogenic fungi. **Objectives:** Quantify and identify samples of fungi isolated from water and air of a unit of HSCT, and evaluate them by using molecular techniques looking for their genetic relationship among strains of *A. fumigatus*, *A. flavus* and *F. solani*. **Material and Methods:** The current study was performed in a unit of HSCT, collecting samples monthly over 12-month period. Air samples were recovered from outdoor air, bathrooms, and rooms in hospital unit, the air sample was collected with six-faced Andersen collector, with Petri dishes containing Sabouraud-dextrose agar. All water samples were collected in sterile polystyrene bottles and passed through sterile 0.45µm filters using a filtration apparatus. Using sterile forceps, the filters were placed directly on Sabouraud-dextrose agar plates. The phenotypic identification was made using keys for identification of Hoog (2000). In the genotypic analysis, the isolates of *A. fumigatus*, *A. flavus* and *F. solani* were typed using oligonucleotide and microsatellite minisatellite. **Results:** A total of 164 samples of water were collected. We observed higher amount of conidia in the months corresponding to the autumn and summer. The average conidia were 6.07 CFU / l. The most prevalent genera were *Paecilomyces*, *Penicillium* and *Cladosporium*. *Fusarium* was more frequent in the water of the unit. The unique parameter correlated to the increasing isolation of fungi was the water temperature. In the microbiological analysis of air from the hospital unit, a total of 264 samples were collected recovering larger quantities of conidia during the fall. The individual average of conidia was 11.09 CFU/m<sup>3</sup>. The most prevalent genera were *Cladosporium* and *Penicillium*. The genus *Aspergillus* was isolated in the air mostly indoor. In the molecular analysis, it was observed poor similarity among *F. solani* strains from air and water, however, we reported that two isolates remained in the hydraulic system of the unit for a period over 30 days. Two samples of air, showed 2 distinct environment strains of *A. fumigatus* showing high similarity through molecular analysis. In our molecular analysis, conflicting profiles of *A. flavus* strains were obtained with different oligonucleotide, it was not possible to establish any direct relationship between samples of air and water. **Conclusions:** environmental surveillance in the units of risk is the highest importance not only applying to outbreaks, as well as to evaluate potential sources of nosocomial infection. Pathogenic fungi to humans can be often isolated, and persist in the water for months in the hydraulic system as a reservoir of infection. We did not identify genetic relationship among samples from air and water, propagules of *A. fumigatus*, *A. flavus* and *F. solani*.



Rocha, Sabrina Mesquita

**Ocorrência de fungos em sistema de distribuição de água e sua correlação com isolados do ar em uma unidade pediátrica de transplante de células tronco hematopoiéticas.** / Sabrina Mesquita Rocha - São Paulo, 2009.

xx 122f.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Infectologia.

Título em inglês: Occurrence of fungi in distribution water system and correlation with waterborne isolate in a pediatric hematopoietic stem cell unit.

1. Fungos no ar de ambiente hospitalar. 2. fungos na água de sistema hidráulico hospitalar 3. Genotipagem . 4. *Aspergillus* 5. *Fusarium*

## **1.0 INTRODUÇÃO**

---

## 1.1 Epidemiologia das doenças fúngicas invasivas em unidade de transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH)

Nas duas últimas décadas houve aumento do número de pacientes imunocomprometidos, e como consequência o número de infecções por fungos, sobretudo por fungos filamentosos. Os avanços na medicina nas duas últimas décadas levaram ao surgimento de drogas eficazes na indução de imunossupressão em pacientes transplantados, fato que está associado a um aumento no número de doenças fúngicas. Vários trabalhos têm sido publicados relatando casos de infecções por fungos oportunistas em pacientes transplantados, portadores de leucemia, linfoma e outras condições tratadas com quimioterapia. Da mesma forma, pacientes internados em unidades de queimados, unidades de terapia intensiva, bem como aqueles em pós-operatório de grandes cirurgias também estão susceptíveis a desenvolver infecções por fungos oportunistas (Gerson *et al.*, 1984; Rotstein *et al.*, 1985; Mousa *et al.*, 1999 Tavora, 2003, Richardson *et al.*, 2008).

Os principais fatores de risco para desenvolvimento de infecção invasiva por fungo filamentoso é a prolongada e profunda neutropenia e exposição ao patógeno. Uma das portas de entrada de fungos filamentosos é a inalação de propágulos, uma vez que os principais agentes são dispersos pelo ar, contudo a inoculação do fungo através de um trauma, ou prévia infecção, como por exemplo, a existência de onicomicose ocasionada por espécies não-dermatófitos, ou mesmo ceratites podem constituir importantes fatores de risco (Nucci & Anaissie, 2007).

Fungos anemófilos em geral são fungos do solo ou de vegetais que são veiculados através do ar. São exemplos de fungos anemófilos os seguintes gêneros: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Curvularia*, *Phoma* entre outros (Lacaz *et al.*, 1998, Gambale, 1998).

Mudanças na epidemiologia das doenças fúngicas em unidades de transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) tem ocorrido nas últimas duas décadas. Ao contrário das infecções ocasionadas pelo gênero *Candida*, o principal agente de doenças fúngicas nosocomiais, nas unidades de transplantes de células tronco hematopoiéticas (TCTH) destacam-se espécies do gênero *Aspergillus*, seguido de outros agentes oportunistas como *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. e Zigomicetos. Estes patógenos causam infecções invasivas em pacientes com severa e prolongada imunossupressão. O diagnóstico destes agentes é geralmente difícil e decorrente disso, em muitos casos apresentam falhas no tratamento (Periroth *et al.*, 2007).

O gênero *Aspergillus* é um importante agente de doenças fúngicas nosocomiais. Compreende cerca de 180 espécies, sendo que *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus nidulans* são os principais agentes de infecções invasivas em TCTH. Atualmente estas espécies são descritas como “complexas de espécies”, (complexo *A. fumigatus*, complexo *A. flavus* e complexo *A. niger*), pois a identificação fenotípica não diferencia espécies correlacionadas geneticamente, como por exemplo, *A. fumigatus* e *A. lentulus* que apesar da morfologia indiferenciável apresentam perfis de susceptibilidade frente aos antifúngicos totalmente distintos (Fridkin *et al.*, 1996; Pagano *et al.*, 2006, Richardson *et al.*, 2008).

A epidemiologia da aspergilose invasiva tem sido estudada em pacientes com doenças hematológicas e transplantados de células tronco hematopoiéticas por diferentes autores. Porém, existem controvérsias sobre a origem comunitária ou hospitalar nos casos de aspergilose invasiva documentados em hospitais terciários. A resolução desta polêmica não é simples, visto que há pouco consenso sobre questões relevantes para elucidação deste tema. Neste contexto, não sabemos qual é o período de incubação desta micose, aspecto este que dificulta o estabelecimento de uma definição operacional consistente que possa ser utilizada na caracterização da origem hospitalar ou comunitária de uma ocorrência de aspergilose em pacientes internados. Este fato é ainda agravado pela baixa sensibilidade dos métodos diagnósticos, limitação que

frequentemente leva ao reconhecimento tardio desta micose na maioria dos pacientes. Há ainda muita controvérsia sobre a acurácia dos diferentes métodos moleculares utilizados na tipagem molecular de *Aspergillus*. Finalizando, é preciso lembrar que a grande variabilidade de genótipos de uma mesma espécie de *Aspergillus* encontrada no ambiente, muitas vezes também no órgão de um paciente infectado, é fenômeno que torna complexa a tentativa de estabelecer-se a origem clonal de isolados clínicos e ambientais quando utilizamos métodos de tipagem nesta comparação (Yeo & Wong, 2002, Sing & Paterson, 2005).

Há inumeros estudos sobre a incidência e prevalência de aspergilose em TCTH. Infecções fúngicas invasivas por *Aspergillus* spp. podem acometer cerca de 3 a 11% dos pacientes submetidos a transplantes de medula óssea. Aspergilose invasiva (AI) tem sido relatada em 0,08 a 2,6 % dos indivíduos submetidos a transplantes de medula óssea autólogo e 3,6 a 10,3% dos indivíduos submetidos a transplantes alogênicos (Singh & Paterson, 2005). Transplantes alogênicos de medula óssea apresentam o maior risco para o desenvolvimento de AI, sendo que em alguns centros esta infecção fúngica é considerada a principal causa de mortalidade (Singh & Paterson, 2005). Nos Estados Unidos estima-se que que a incidência seja de 5 em 100.000 pacientes, com mortalidade que varia de 45 a 80% (Barnes & Marr, 2007, Periroth *et al.*, 2007). Na Europa, Alonso *et al* (2006) num estudo prospectivo, ao longo de 5 anos numa unidade de TCTH de um hospital terciário na Espanha, observaram a incidência de AI em TCTH, que em 1999 foi de 1,4% e em 2003 de 17,5%, evidenciando assim o aumento.

*Fusarium* é um importante fitopatógeno, amplamente distribuído na natureza. Na última década o gênero tem emergido como um importante patógeno em humanos, agente de oncomicoses e ceratites. Em transplantados de células tronco hematopoiéticas é causa de infecções locais, invasivas ou disseminadas. A mortalidade em pacientes com fusariose disseminada varia de 50-75%, grande parte devido ao tempo de diagnóstico e ao difícil tratamento. *Fusarium* spp. apresenta resistência a maioria dos antifúngicos disponíveis. A principal espécie isolada em infecções invasivas é *Fusarium*

*solani*, seguida de *Fusarium oxysporum* (Nucci *et al.*, 2004, Jeansen *et al.*, 2004, Nucci & Anaissie, 2007, Periroth *et al.*, 2007, Richardson & Lass-Flör, 2008).

Em relação a incidência de fusariose em TCTH, Nucci *et al.* (2004) conduziram um estudo retrospectivo em 7 hospitais no Brasil e 2 nos E.U.A., onde a incidência de fusariose entre TCTH alogênico variou de 4,2 - 5,0 casos por 1000 pacientes. O tempo médio entre o transplante e o diagnóstico de fusariose foi de 48 dias. O estudo demonstrou ainda por análise multivariada, que a neutropenia persistente foi o único fator de prognóstico para a morte dos pacientes com fusariose.

Os Zigomicetos, principalmente pertencentes à ordem Mucorales são fungos oportunistas capazes de causar uma rápida e aguda infecção em pacientes imunocomprometidos. Outro grupo de risco são os pacientes diabéticos, onde o principal fator de risco é a cetoacidose. Os principais agentes isolados pertencem aos gêneros *Rhizopus* e *Mucor* responsáveis por cerca de 50 e 18% dos casos de zigomicose respectivamente. Surtos em ambientes hospitalares não são comuns, todavia em imunocomprometidos a incidência tem aumentado, assim como a incidência de outros fungos filamentosos potencialmente patógenos pra pacientes de risco. Além disso, *Rhizopus* e *Mucor* apresentam um perfil de resistência frente a grande maioria dos antifúngicos apresentando susceptibilidade à anfotericina B (Marr *et al.*, 2002, Jeansen *et al.*, 2004, Alonso *et al.*, 2006).

A ocorrência de zigomicose em TCTH tem aumentado em alguns centros nos E.U.A., onde estima-se que ocorra 500 casos por ano, com prevalência de 2-3% em transplantes alogênicos. A mortalidade de pacientes com zigomicose chega a 64%, devido ao difícil diagnóstico do agente etiológico (Marr *et al.*, 2002, Alonso *et al.*, 2006, Barnes & Marr, 2007, Periroth *et al.*, 2007). No Brasil não temos estudos que decorem a incidência de zigomicose em TCTH.

## 1.2 Fungos filamentosos em ambientes nosocomiais

Os fungos filamentosos podem entrar nos recintos hospitalares pelo ar externo utilizando os sistemas de ventilação, sistemas de ar condicionado ou podem proliferar no interior dos recintos em vasos de flores, plantas e arbustos colocados em áreas inapropriadas, materiais como madeira, sintéticos e carpetes podem atuar como reservatório de fungos filamentosos e colocar em risco pacientes imunodeprimidos (Girardin *et al.*, 1994; Denning, 1998).

A prevenção das infecções nosocomiais nas unidades TCTH depende principalmente de sistemas que filtrem o ar externo, com filtros absolutos (HEPA), e/ou sistemas de fluxo laminar (SFL). Estes sistemas reduzem o número de propágulos fúngicos suspensos no ar (Anaissie *et al.*, 2003; Warris *et al.*, 2003). Outras medidas de prevenção incluem o uso de máscaras, e as relacionadas ao paciente, como o aumento da resposta imune natural utilizando fatores de crescimento recombinantes e quimioprolaxia utilizando drogas antifúngicas (Nemunaitis *et al.*, 1993; Behre *et al.*, 1995; Oren *et al.*, 2001).

O monitoramento do ar em unidades com e sem filtros HEPA tem grande relevância na prevenção de infecções em hospitais. Pardelli *et al.* (2006) monitoraram o ar utilizando o bioamostrador portátil Surface Air System, em várias unidades de 10 hospitais na Itália. Durante as coletas de ar foram mantidas as atividades rotineiras de cada unidade. A média de propágulos fúngicos foi de 19 UFC/m<sup>3</sup>. em unidades equipada com filtros HEPA a média foi de 17 UFC/m<sup>3</sup>. O agente mais frequente foi *Penicillium*, neste estudo o isolamento de *Aspergillus* foi de 35%. Como conclusão, os autores relatam que a presença de filtros HEPA não é suficiente para a prevenção total de infecções fúngicas invasivas, uma vez que o isolamento de propágulos fúngicos permanece frequente.

Em um hospital universitário na cidade de Minneapolis USA, durante 10 anos foi monitorado mensalmente o ar em unidades com filtros HEPA e em áreas externas para comparação. Um total de 1523 amostra de ar foram coletas entre janeiro de 1995 e dezembro de 2005. A média de UFC/m<sup>3</sup> em unidades de TCTH foi de 18, considerada baixa em comparação com a média de propágulos isolados externamente ao hospital: 848 UFC/m<sup>3</sup>. O estudo sugere que a área externa atua como fonte de propágulos fúngicos, uma vez que há fluxo constante de pessoas. Assim o monitoramento é considerado uma importante medida de controle de infecções fúngicas, contudo não deve ser utilizada isoladamente ( Falvey & Streifel, 2007).

Em Portugal, Araujo *et al* (2008a), avaliaram a eficiência dos filtros HEPA em diversas unidades de um hospital universitário, através do monitoramento do ar utilizando aparelho Andersen de um estágio, capaz de filtrar 28 L/min. Apesar da média de propágulo isolados (10 UFC/m<sup>3</sup>) ser menor em relação a outras unidades sem HEPA (100 UFC/m<sup>3</sup>) , a combinação de filtros com pressão positiva não elimina propágulos infectantes do ar .

A origem hospitalar de infecções fúngicas por fungos filamentosos tem sido postulada, na maioria das vezes, sem base em investigações moleculares das amostras de fungos envolvidas no processo. Um argumento forte utilizado para defender a origem hospitalar de casos de aspergilose é representado pelos inúmeros relatos de ocorrência de surtos, muitos deles associados a reformas ou construções realizadas em ambiente hospitalar. Estes estudos, em sua maioria, não realizaram tipagem molecular das amostras, sendo a associação estabelecida entre aumento de casos e reformas estabelecidas apenas com base na simultaneidade das ocorrências.

Não há dúvida que reformas e construções aumentam a concentração de propágulos fúngicos no ar. Diferentes autores monitoraram propágulos fúngicos no ar antes e após a ocorrência de reformas ou construções. Streifel *et al* (1983) monitoraram o



ar externo e interno de um hospital universitário, na cidade de Minneapolis (USA), avaliaram amostras colhidas antes, durante e após a demolição de uma unidade do hospital. Eles verificaram o aumento de propágulos fúngicos de *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* e outros fungos filamentosos na área externa no período pós-demolição. Na área interna do hospital também identificaram aumento de propágulos fúngicos, mas não foram valores significativos, isso devido às medidas de intervenção adotadas no período de reformas.

Kennedy *et al* (1995) analisaram a concentração de conídios de *Aspergillus fumigatus* durante uma reforma realizada em hospital pediátrico na cidade de Glasgow. O nível basal dos conídios antes da construção era de 10 UFC/m<sup>3</sup>, variando de 47 UFC/m<sup>3</sup> a 94 UFC/m<sup>3</sup> após as reformas. Baseados nestes achados os autores sugerem que medidas de vigilância devem ser implantadas para prevenir aspergilose invasiva em pacientes imunocomprometidos, quando realizadas reformas no hospital.

Um estudo conduzido em Paris num período de 2 anos monitoraram o ar de uma unidade hematológica com 4 unidades. Durante o monitoramento, houve reforma por 6 meses. Os resultados mostraram que durante o período de reforma houve aumento de propágulos fúngicos no ar, contudo a combinação de filtros HEPA e fluxo laminar no período sem reforma foram efetivos no controle de propágulos fúngicos. O estudo ressalta ainda que os filtros HEPA sozinhos não são eficazes para o controle de propágulos principalmente no período de reforma (Cornet *et al.*, 1999).

Bouza *et al* (2002), analisaram a qualidade do ar de um hospital terciário na Espanha antes e depois da demolição da sua unidade de maternidade. As coletas foram realizadas no ar externo, interno e ar das unidades que utilizam filtros HEPA. O estudo demonstrou um elevado número de propágulos fúngicos após a demolição no ar externo e interno do hospital, quando comparados com os níveis basais obtidos antes do evento. Os níveis elevados mantiveram-se até 4 dias após a demolição.

Sabendo que reformas e construção levam ao aumento na concentração de propágulos fúngicos, alguns autores tentaram investigar a relevância clínica deste achado, documentando a ocorrência de aspergilose invasiva antes e depois da ocorrência de reformas. Perraud *et al* (1987) analisaram 22 casos de aspergilose invasiva documentados no Departamento de Hematologia de um hospital terciário da cidade de Lyon (França). Os casos foram diagnosticados ao longo de um período de 29 meses, sendo que 17 deles ocorreram simultaneamente a reformas realizadas no hospital e apenas 5 novos casos foram observados no período sem reformas.

Loo *et al* (1996) determinaram a incidência de aspergilose em pacientes com leucemia e transplantados de células tronco hematopoiéticas durante um surto associado à reforma realizada em hospital terciário em Montreal (Canadá) entre os anos de 1988 a 1993. Trinta e seis casos de aspergilose foram diagnosticados no período, 4 casos no período pré-reforma, 28 casos durante a reforma e 4 casos durante o período de implantação das medidas de vigilância.

Oren *et al* (2001), analisaram 31 casos de aspergilose invasiva pulmonar em pacientes com leucemia aguda em hospital terciário de Israel entre setembro de 1993 e julho de 1998. Neste período ocorreu um surto de aspergilose de origem nosocomial, com aumento de cerca de 50% na ocorrência dos casos. Os pesquisadores concluíram que o dramático incremento de aspergilose invasiva foi diretamente atribuído à reforma realizada e a principal medida instituída para diminuir a incidência de aspergilose foi a instalação de filtros HEPA na unidade.

Cooper *et al* (2003) monitoraram o ar em 18 áreas de um hospital na Austrália num período de construção. Durante o período de construção medidas profiláticas foram adotadas: os pacientes da unidade hematológicas receberam tratamento com anfotericina B e itraconazol, medidas de barreira na unidade com a utilização de filtros HEPA, e em paralelo as coletas de ar foram realizadas utilizando o bioamostrador

Reuter centrifugal air sampler. A média de foi de 5 UFC/m<sup>3</sup>, durante e após o período de construção. A prevalência foi de gênero *Aspergillus* dentre os propágulos isolados. Nenhum caso confirmado de aspergilose invasiva foi diagnosticado durante o período do estudo.

Numa unidade hematológica na cidade de Florência, Itália, o monitoramento do ar foi realizado, devido a realização de reforma da unidade. A concentração de fungos no ar do corredor da unidade foi maior (2,9 UFC/m<sup>3</sup>) em relação aos quartos dos pacientes (1,4 UFC/ m<sup>3</sup>). No período houve 3 prováveis e 2 possíveis casos de aspergilose invasiva em pacientes com leucemia aguda. Os casos coincidiram com o período de reforma e maior número de propágulos no ar, sugerindo a possível relação entre concentração de propágulos e aspergilose (Pini *et al.*, 2007).

Recentemente, alguns estudos utilizaram técnicas de biologia molecular para comparar cepas de fungos filamentosos isolados do meio ambiente hospitalar e de pacientes para confirmar a origem da infecção. Girardin *et al* (1994) realizaram um estudo utilizando a técnica de sequências repetidas moderadas (MRSs), para tipar cepas de *Aspergillus fumigatus* isoladas de ambiente e pacientes na cidade de Paris (França). Neste estudo foram analisadas 19 cepas de *Aspergillus fumigatus* isoladas de 5 pacientes, que foram comparadas a 30 cepas ambientais. Os isolados seqüenciais dos pacientes apresentaram o mesmo perfil genotípico, exceto por um paciente. A origem nosocomial da infecção foi confirmada em 2 pacientes, onde houve completa identidade genética entre as cepas ambientais e clínicas.

Chazalet *et al* (1998) realizaram o primeiro estudo molecular sobre *Aspergillus fumigatus* e aspergilose utilizando sondas marcadas como ferramenta de tipagem. O estudo foi realizado com 700 amostras (ambientais/pacientes) obtidas de 4 hospitais terciários da cidade de Paris (França) durante um período de 2 anos. Os pesquisadores demonstraram que 85% das cepas apresentaram um único genótipo o que

demonstrou baixa diversidade genotípica da espécie. Eles comprovaram também que dos 73 pacientes com aspergilose invasiva 30 eram de origem nosocomial.

Bart-Delabesse *et al* (1999) analisaram cepas de *Aspergillus fumigatus* isoladas de ambiente e pacientes utilizando a técnica de microsátélites na cidade de Créteil (França), com 89 isolados (62 ambientais – 27 de pacientes) obtidos durante um período de 1 ano. O estudo demonstrou ampla diversidade genética das amostras, sendo identificados 43 genótipos diferentes entre as 62 amostras ambientais. Da mesma forma observaram cepas geneticamente diferentes em amostras clínicas, concluindo que um mesmo paciente pode ser colonizado ou infectado por várias cepas, isso devido ao alto poder discriminatório da técnica utilizada. Os pesquisadores foram capazes de confirmar a origem nosocomial da infecção em 42% dos pacientes.

Blum *et al* (2008) monitoraram durante um ano, as características microbiológicas do ar de uma unidade hematológica na cidade de Innsbruck, Áustria com intuito de isolar *Aspergillus terreus*, um agente emergente em infecções invasivas. Além das coletas de ar com o aparelho Surface Air System Sample, amostras de swab nasal foram colhidas periodicamente dos pacientes da unidade. Ao final, 49 cepas de *A. terreus* foram isoladas durante o estudo, incluindo amostras de colonização e infecção de pacientes. A tipagem molecular pela técnica de RAPD utilizou 3 primers e não detectou nenhuma similaridade entre os isolados de pacientes e do ambiente. Obteve-se 46 distintos genótipos, indicando a grande diversidade genômica de *A. terreus*.

No Brasil existem escassos trabalhos na área hospitalar relacionando a concentração de propágulos fúngicos com infecção hospitalar. Os trabalhos em geral estão limitados à avaliação da síndrome do edifício doente (SED), investigando a prevalência de agentes fúngicos na área ambiental e no setor de construção civil.

Gambale *et al* (1993) realizaram um estudo para avaliar a prevalência de fungos no ar e livros de 28 bibliotecas da cidade de São Paulo (Brasil) e sua possível relação com sintomas respiratórios. Os principais fungos isolados do ar foram *Cladosporium*, *Penicillium* e *Fusarium* e dos livros utilizados na análise os agentes foram *Cladosporium*, *Penicillium* e *Trichoderma*. Dos 314 bibliotecários interrogados, 49% referiram sintomas de rinites ou asma, sendo estes sintomas relacionados ao ambiente de trabalho.

Mezzari *et al* (2002) na cidade de Porto Alegre e Menezes *et al* (2004) na cidade de Fortaleza (Brasil) analisaram a prevalência de fungos anemófilos como agentes etiológicos de alergias em várias regiões das respectivas cidades. Em ambas cidades os principais agentes isolados foram os pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium*.

Graudenz *et al* (2002 e 2004) realizaram estudos relacionados à SED em edifício que utilizava dois sistemas de ar condicionado (antigo e novo) na cidade de São Paulo (Brasil). O estudo concluiu que os funcionários que estavam expostos ao sistema de ar condicionado antigo (20 anos aproximadamente) apresentaram uma alta prevalência de sintomas respiratórios, mais estes sintomas não foram relacionados aos fungos isolados no interior do prédio se não a outros contaminantes presentes no ar.

No ambiente hospitalar, Cucé *et al* (1993) analisaram a microbiota fúngica anemófila do Hospital das Clínicas na cidade de São Paulo (Brasil). As coletas foram realizadas utilizando placas de Petri com ágar Sabouraud nas áreas do pronto socorro e UTI dos serviços de gastroenterologia e pneumologia. Tanto no pronto socorro como nas enfermarias das UTI prevaleceu o isolamento de fungos filamentosos na proporção de 68,5% contra 10% de leveduras. Dos fungos filamentosos isolados os mais frequentes foram *Mycelia sterilia*, *Cladosporium* spp. e *Penicillium* spp.

Távora (2002) analisaram a qualidade do ar do Hospital das Clínicas da cidade de São Paulo, Brasil e sua relação com a SED, durante o período de outubro de 1999 e abril de 2000. Os gêneros fúngicos mais prevalentes foram *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp e *Cladosporium* spp com níveis elevados de propágulos fúngicos por m<sup>3</sup>. O estudo conclui que apesar de mais 80% dos entrevistados relatarem sinais e sintomas de SED, não foi identificada uma relação com os fungos isolados.

Martins-Diniz *et al* (2005) monitoraram o ar em diferentes períodos em Unidades de terapia intensiva (UTIs) pediátrica e adulta e no centro cirúrgico num hospital universitário na cidade de Araraquara, São Paulo. Foram obtidas 196 amostras utilizando o bioamostrador Andersen 1 estágio, amostras de superfícies e de profissionais também foram coletas para o isolamento de leveduras. Os gêneros mais prevalentes foram: *Cladophialophora* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Chrysosporium* spp., e *Aspergillus* spp. Dentre as leveduras isoladas *Candida albicans*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* e *C. lusitaniae* foram as mais freqüentes. Um número relativamente alto de UFC/m<sup>3</sup> foi isolado de ambientes internos: nas UTIs a média foi de 317,1 e no centro cirúrgico 332,2. Nenhuma das unidades possuíam filtros HEPA.

Num hospital terciário na cidade de Campinas, São Paulo, Teixeira *et al* (2005), avaliaram pacientes hematológicos com colonização e infecção por fungos filamentosos, e paralelamente avaliou a qualidade do ar da unidade, utilizando placas de petri contendo Agar Sabouraud dextrose, no período de 1 ano. *Fusarium* foi o agente mais frequente no ar durante o outono e *Cladosporium* na primavera. Dentre as amostras clínicas os agentes mais freqüentes foram: *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani* e *Penicillium citrinum*. O perfil de susceptibilidade foi realizado entre os isolados clínicos e ambientais, sendo que os isolados clínicos demonstraram maior resistência frente aos azólicos fluconazol, itraconazol e cetoconazol.

Recentemente investigações realizadas por diversos pesquisadores demonstraram que os sistemas de distribuição de água e reservatórios dos hospitais podem ser colonizados por fungos patogênicos como *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp e concluíram também que os sistemas de água podem ser considerados como a fonte de contaminação do ar por fungos filamentosos, ampliando a possibilidade de ocorrência de surtos (Arvanitidou *et al.*, 1999; Anaissie *et al.*, 2003; Warris *et al.*, 2002).

### 1.3 Fungos isolados em sistemas de distribuição de água municipal

Historicamente, pouca atenção tem sido dada aos fungos filamentosos nos sistemas de distribuição de água. Recentemente tem sido descrito que os fungos filamentosos podem atravessar os filtros de areia, utilizados nas plantas de água potável e que os mesmos conseguem sobreviver aos procedimentos convencionais de desinfecção com adição de cloro (Doggett, 2000).

Nos sistemas de distribuição de água, os fungos filamentosos podem crescer nos espaços da tubulação onde o fluxo é mais lento. Além disso, o material que constitui os reservatórios e tubulações pode ajudar na formação do biofilme composto, necessário para a sobrevivência dos fungos (Arvanitidou *et al.*, 1999). Da mesma forma os fatores físicos e químicos nos sistemas de distribuição de água podem ser considerados fatores importantes para o depósito e crescimento dos fungos filamentosos, também como a temperatura da água que deve ser considerada um fator relevante para a fisiologia e viabilidade dos propágulos fúngicos (Garraway & Evans, 1984).

Fungos filamentosos nos sistemas de distribuição de água podem afetar diretamente a saúde das populações, contribuindo para a ocorrência de

intoxicações, reações alérgicas e na ocorrência de infecções nosocomiais em indivíduos imunocomprometidos. Podem contaminar os alimentos durante o processamento ou preparação e interferem diretamente com a distribuição de água potável, através da deterioração dos reservatórios e tubulações (Rosenzweig *et al.*, 1983; Warris *et al.*, 2001; Anaissie *et al.*, 2002).

Nagy & Olson (1982) coletaram 66 amostras de água no sistema de distribuição de água (32 em sistema clorado e 36 no sistema não clorado) da cidade de Orange no Canadá, durante um período de 9 meses foram isoladas 18 colônias fúngicas por 100 ml de água no sistema não clorado e 34 no sistema clorado. Os principais agentes identificados foram *Penicillium* spp., *Acremonium* spp., *Paecilomyces* spp. e *Fusarium* spp. em ambos sistemas. A concentração de cloro livre residual no sistema clorado era de 0,63 ppm.

Doggett (2000) analisou o sistema de distribuição de água municipal da cidade de Springfield (USA) que abastece uma população de 100.000 pessoas aproximadamente, durante janeiro a julho de 1997. Foram identificados 39 espécies fúngicas diferentes obtidas de 8 amostras da superfície dos reservatórios. Os principais agentes isolados no biofilme fúngico foram espécies dos gêneros *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. A concentração de cloro livre residual no sistema era de 0,88 mg/l. Este é o único trabalho na literatura que analisou o biofilme fúngico nos sistemas de distribuição de água, a investigação conclui utilizando microscopia eletrônica de varredura que os propágulos constituem o maior componente do biofilme.

Zacheus *et al.*, (2001), coletaram amostras de água e sedimento de 16 sistemas de distribuição de água de 8 cidades na Finlândia, durante um período 2 anos. Os principais fungos identificados no sedimento analisado foram *Penicillium* spp., *Phialophora* spp., *Cladosporium* spp. e *Acremonium* spp. O estudo conclui que os sedimentos depositados nas tubulações dos sistemas de distribuição de água, podem ser



considerados reservatórios de bactérias heterotróficas, bactérias entéricas, actinomicetos e fungos.

Um estudo conduzido na Alemanha monitorou ao longo de 12 meses a água do sistema público de distribuição. Observou-se pouca diversidade de espécies, sugerindo assim que os fungos sobrevivem no sistema de distribuição por longos períodos. Além do monitoramento de fungos o estudo realizou contagem de coliformes totais e fecais. Não houve correlação entre UFC e quantidade de coliformes. Os gêneros fúngicos mais freqüentes foram *Acremonium*, *Phialophora*, *Exophiala* e *Penicillium* (Göttlich *et al.*, 2002).

Na Noruega 273 amostras de água de 14 pontos diferentes que incluíram o sistema público de distribuição, residências e hospitais, foram realizadas para determinar a ocorrência e distribuição de espécies de fungos. As mais freqüentes foram: *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp. e *Aspergillus* spp. Não foi observada significância sazonal no número de propágulos fúngicos isolados (Hageskal *et al.*, 2006).

Kanzler *et al.*, (2007) avaliaram a ocorrência e relevância de fungos no sistema de distribuição de água na cidade de Graz, Áustria. Das 38 amostras coletadas, 32 diferentes gêneros foram isolados, sendo os mais freqüentes *Cladosporium* e *Penicillium*. O estudo demonstrou que a água pode ser um reservatório de fungos oportunistas.

Estes estudos concluíram que os sistemas de distribuição de água podem ser colonizados por biofilmes mistos compostos de bactérias, fungos e algas. É que graças aos fungos estes biofilmes conseguem resistir aos tratamentos convencionais de cloração da água.

#### 1.4 Fungos isolados em sistemas de distribuição de água de hospitais

Os reservatórios dos fungos filamentosos no ambiente hospitalar não são completamente conhecidos. A identificação de tais reservatórios é fundamental para implantar medidas de controle de infecção hospitalar mais efetivas (Anaissie *et al.*, 2001).

Arvanitidou *et al.* (1999) na Grécia avaliaram 126 amostras de água potável obtidas da comunidade (42) e de hospitais (84). Os fungos foram isolados em 95,2% das amostras da comunidade e 76,2% das amostras obtidas de hospitais. Os principais agentes isolados foram *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e *Candida* spp. No trabalho não foram determinadas as concentrações de cloro livre residual dos respectivos sistemas hídricos.

Anaissie *et al.* (2001), realizaram uma investigação durante um período de 10 anos no sistema de distribuição de água de um hospital terciário da cidade de Houston (USA). No estudo, os fungos isolados foram identificados como *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum*. Este estudo demonstrou que as espécies do gênero *Fusarium* podem colonizar sistemas de distribuição de água de hospitais em concentrações de cloro livre residual de 0,3 ppm e confirmou utilizando técnicas moleculares que as espécies de *Fusarium* podem permanecer no sistema durante anos.

Warris *et al.* (2001), analisaram 168 amostras de água coletadas da unidade de TCTH (pediátrica) de um hospital terciário da cidade de Oslo na Noruega, durante um período de 6 meses. Fungos filamentosos foram isolados em 94% das amostras coletadas, sendo os principais agentes isolados: *Aspergillus fumigatus*, *Trichoderma* spp., *Paecilomyces* spp. e *Cladosporium* spp. As concentrações de cloro livre residual variaram entre 0,3 ppm a 0,5 ppm nos diferentes sítios analisados.

Anaissie *et al.* (2003) coletaram 416 amostras de água provenientes do sistema de distribuição de água municipal, reservatórios de água (fria e quente), chuveiro e torneiras dos quartos de um hospital terciário da cidade de Little Rock, AR (USA). Fungos filamentosos foram isolados em 67% das amostras de água municipal e 82% das amostras obtidas dos reservatórios do hospital. Os principais agentes isolados foram *Penicillium* spp, *Aspergillus* spp, *Paecilomyces* spp. e *Fusarium* spp. As concentrações de cloro livre residual variaram entre 0,05 ppm a 0,2 ppm nos diferentes sítios analisados.

No Brasil 2 estudos avaliaram o potencial da água como fonte de infecção. Nucci *et al.* (2002) no período de dezembro de 1996 a setembro de 1997 realizaram uma investigação para determinar a origem de um surto ocasionado por *Exophiala jeanselmei*. Esta espécie foi isolada na água do reservatório do hospital e na água deionizada utilizada na farmácia para preparo de solução anti-séptica. A tipagem molecular por RAPD mostrou que o isolado de um paciente e do isolado da água deionizada eram altamente relacionados. Outro estudo no estado de São Paulo avaliou a água do sistema de abastecimento e a água utilizada numa unidade de hemodiálise. Houve prevalência de *Trichoderma* spp., *Aspergillus* spp., e *Cladosporium* spp. Apesar de não haver relatos de infecções por estes agentes o estudo sugere monitoramento contínuo na unidade e medidas profiláticas (Varo *et al.*, 2007).

Estes dados sugerem que fungos filamentosos são frequentemente isolados de sistemas de distribuição de água de hospitais, ainda na presença de concentrações elevadas de cloro livre residual. Rosenzweig *et al* (1983) realizaram um estudo com o objetivo de determinar a sensibilidade dos propágulos fúngicos a concentrações crescentes de cloro residual. Eles concluíram que fungos filamentosos sobrevivem aos tratamentos convencionais de tratamento de água graças à capacidade que possuem os propágulos de diminuir a concentração de cloro residual nos sistemas. Este fato é importante já que ao diminuir a concentração de cloro livre residual estimulam a proliferação de bactérias heterotróficas aumentando o biofilme.

## 1.5 Técnicas moleculares aplicadas a estudos epidemiológicos com *Aspergillus* e *Fusarium*

As técnicas de biologia molecular vêm sendo cada vez mais utilizadas, com a finalidade de caracterizar a epidemiologia de fungos filamentosos isolados do meio ambiente, animais, reservatórios de água de hospitais e pacientes. As principais técnicas utilizadas para caracterizar a epidemiologia dos fungos filamentosos são métodos baseados em PCR (polimerase chain reaction): Amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD), análise das variações de tamanho de fragmentos de DNA gerados por digestão com enzimas de restrição “endonucleases” (RFLP), análise do DNA genômico por seqüências intergênicas repetidas de enterobactérias (ERIC-PCR) e a análise comparativa de seqüências de nucleotídeos de genes homólogos principalmente (Sharples & Lloyd, 1990; Swaminathan & Matar, 1994; Power, 1996; Taylor *et al*, 1999, Soll, 2000).

Bart-Delabesse *et al* (2001) analisaram 67 cepas de *Aspergillus fumigatus* isoladas de pacientes, ambiente hospitalar e banco de microorganismos, utilizando três técnicas moleculares RAPD, RFLP e polimorfismo de microsátélites (MLP). A técnica de RFLP apresentou o maior poder discriminatório gerando 49 genótipos diferentes, em segundo lugar a técnica de MLP gerou 43 genótipos e por último a técnica de RAPD com 31 genótipos diferentes.

Leenders *et al* (1999) utilizaram a técnica de RAPD utilizando os “primers” ERIC1 e ERIC2 para tipagem molecular de cepas de *Aspergillus fumigatus*, isoladas de ambiente hospitalar e de pacientes com aspergilose invasiva. O estudo conclui que cepas de *Aspergillus fumigatus* podem permanecer no ambiente hospitalar até períodos de 1 ano e que as cepas isoladas dos pacientes apresentaram um perfil genotípico diferente das ambientais.

Cimon *et al* (2001) analisaram um total de 109 cepas de *Aspergillus fumigatus* isoladas de 7 pacientes com fibrose cística na cidade de Nantes na França. Foram utilizadas 2 técnicas moleculares para determinar a diversidade genética das cepas de *Aspergillus fumigatus*, a técnica de RAPD utilizando o “primer” NS3 e a técnica que utiliza os “primers” de DNA seqüência específico (SSDP). Foram identificados 10 genótipos utilizando a técnica de RAPD e 9 genótipos utilizando a técnica de SSDP. O estudo confirmou a diversidade genotípica da espécie e revelou que cepas de *Aspergillus fumigatus* podem permanecer durante anos colonizando as vias aéreas de pacientes com fibrose cística.

Anaissie e Costa (2001) relataram o isolamento de *Aspergillus fumigatus* de um paciente internado numa unidade de um hospital terciário da cidade de Houston (USA) e a compararam com uma cepa de *Aspergillus fumigatus* isolada da parede do Box do chuveiro utilizado pelo paciente. Utilizando técnicas moleculares (RAPD) comprovaram que as cepas eram idênticas geneticamente.

Bertout *et al* (2001) compararam 52 isolados de *Aspergillus fumigatus* provenientes de 12 pacientes de diferentes hospitais na Europa, através das técnicas de RAPD, microssatélite, polimorfismo de seqüência específica de DNA (SSDP), e enzima multilocus em eletroforese (MLEE). A combinação dos resultados mostrou que 3 pacientes foram infectados com o mesmo genótipo. O estudo demonstrou que a combinação de métodos moleculares é uma importante ferramenta para entender a epidemiologia da aspergilose.

Saracli *et al* (2007) realizaram genotipagem pela técnica de RAPD, 8 isolados de *Aspergillus ustus* provenientes de casos de endoftalmite. 3 diferentes isolados de um mesmo paciente apresentaram o mesmo perfil pela técnica, sugerindo uma única fonte de infecção. Não foram isolados *A. ustus* no ambiente da unidade de Oftalmologia do hospital.

Com o intuito de caracterizar os genótipos de 22 isolados de *A. fumigatus* provenientes de 5 pacientes, Alvarez-Perez *et al* (2008) compararam as técnicas de RAPD , microssatélite e determinação de mating type. Vários genótipos foram encontrados na análise em conjunto das técnicas utilizadas, aumentando assim o poder discriminatório. O estudo concluiu que a determinação do mating type é de grande utilidade na diferenciação de diferentes isolados.

Utilizando a técnica de RAPD e os “primers” (GACA)<sub>4</sub> e (GTG)<sub>5</sub> de microssatélites, Batista *et al* (2008) analisaram 25 isolados identificados fenotipicamente como *Aspergillus flavus*, importante patógeno e produtor de aflatoxinas. As análises demonstraram que alguns isolados estavam erroneamente classificados como *A. flavus*. A análise genotípica encontrou 1 isolado de *Aspergillus oryzae*, 2 *Aspergillus tamari* e 1 *Aspergillus parasiticus*. Todas as espécies foram geneticamente relacionadas. O estudo mostrou que a identificação molecular é de suma importância na identificação de espécies fenotipicamente similares.

Hering e Nirenberg (1995) analisaram 41 isolados de *Fusarium sambucinum* utilizando a técnica de PCR-fingerprinting com os “primers” M13 de minisatélites e (GACA)<sub>4</sub> de microssatélites. Os pesquisadores concluíram que os “primers” demonstraram ter um poder discriminatório superior a outros “primers” testados, conseguindo diferenciar três grupos dentro da espécie analisada *F. sambucinum*.

Castellá *et al* (1999) utilizaram a técnica de RAPD para analisar um total de 7 cepas de *Fusarium solani* isoladas de ambiente, tartaruga marinha e cepas padrão (ATCC), a análise molecular foi realizada utilizando 5 “primers” (ABA-02, ABA-10, ABA-11, ABA-18 e ABA-20). O estudo demonstrou um elevado poder discriminatório da técnica onde se comprovou que as cepas de *F. solani* isoladas da areia do tanque e das lesões da tartaruga eram similares geneticamente.

Godoy *et al* (2004) analisaram 44 cepas de *F. solani* isoladas de episódios de ceratites utilizando duas técnicas moleculares ERIC-PCR e PCR-RFLP. A técnica de ERIC-PCR apresentou um maior poder discriminatório, sendo identificados 39 genótipos diferentes que confirmou a diversidade genética da espécie tipo *Fusarium solani*.

Estes estudos mostram que as técnicas de DNA *fingerprinting* são fáceis e rápidas, não requerem a informação prévia e exata de uma sequência do DNA, e assim podem ser aplicadas a uma espécie de interesse. No caso de minissatélites e microssatélites, que são pequenas sequências de oligonucleotídeos repetidas, a grande vantagem é que a tipagem pode ser realizada por uma reação de PCR e visualizada em gel de agarose. Estas sequências são abundantes no DNA de eucariotos, e se mostram polimórficos dentro das espécies, inerentes em um padrão co-dominante. Além disso, o método é altamente reprodutível entre laboratórios, e sua sensibilidade é maior quando a análise é realizada por programas específicos. Outra vantagem é que o método pode ser aplicado na solução de problemas epidemiológicos e discriminatórios entre espécies em micologia médica (Weising *et al.*, 1995, Soll, 2000, Galagan *et al.*, 2005).

A partir destes trabalhos analisados podemos afirmar que técnicas moleculares apropriadas podem ser utilizadas como ferramentas que ajudem a conhecer a história natural das infecções fúngicas, correlacionando os fungos isolados de pacientes com os fungos identificados no ambiente.

Não há registro na literatura de nenhum estudo brasileiro realizado com técnicas microbiológicas de aceitação internacional que tenha investigado a presença de fungos filamentosos e leveduriformes em sistemas de distribuição e reservatórios de água de hospitais, comparando com isolamento do ar por técnicas moleculares.

## **2.0 OBJETIVOS**

---



A presente investigação tem por objetivos:

I - Quantificar e identificar fenotipicamente todos os fungos isolados da água dos reservatórios e torneiras de uma unidade pediátrica de transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH), localizado no quinto andar de um hospital terciário de oncologia pediátrica na cidade de São Paulo;

II - Determinar os parâmetros físico químicos da água: cloro livre residual, pH, turbidez e temperatura dos reservatórios e torneiras da unidade;

III - Quantificar e identificar fenotipicamente todos os fungos isolados do ar da unidade de TCTH;

IV - Avaliar utilizando técnicas moleculares a relação dos fungos potencialmente patogênicos isolados da água e fungos isolados do ar no ambiente hospitalar.

## **3.0 MATERIAL E MÉTODOS**

---

### 3.1. Caracterização da unidade

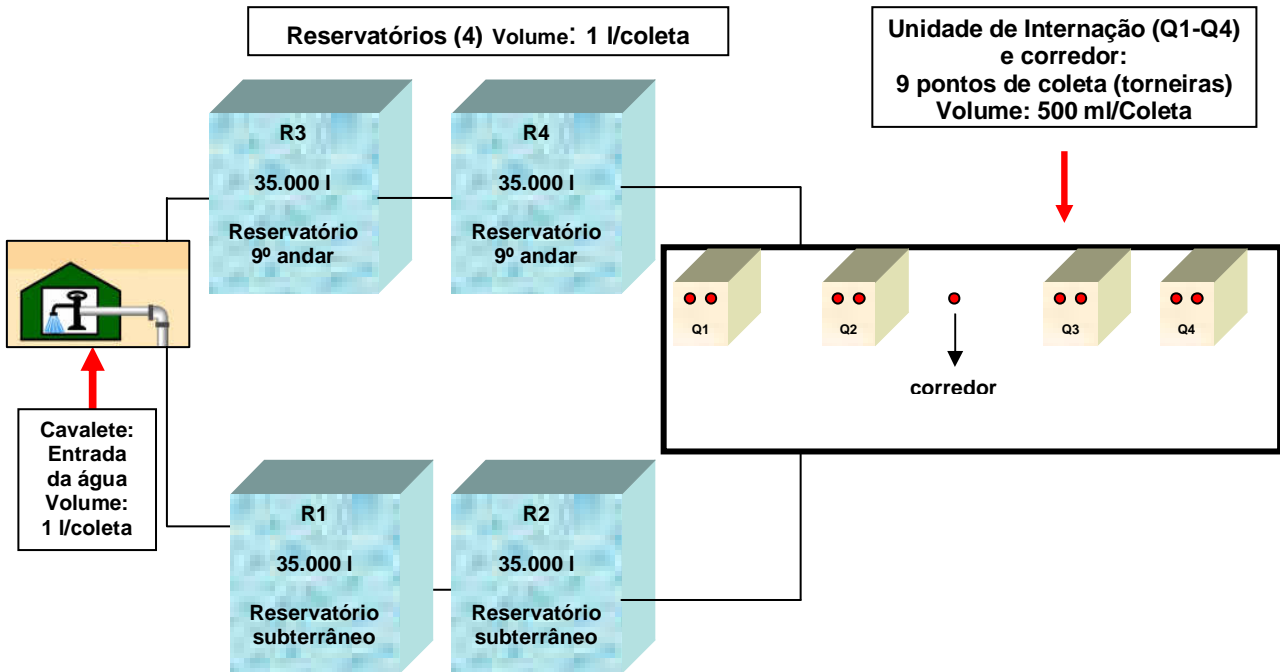
O estudo foi conduzido numa unidade pediátrica de transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) na cidade de São Paulo, que atende pacientes submetidos a transplantes autólogos e alogênicos.

A unidade possui 4 quartos com banheiros, com um total de 6 leitos, todos equipados com filtros HEPA e pressão positiva, além de um corredor onde estão localizados uma sala de prescrição médica e outra da enfermagem. Localizada à direita do quinto andar do hospital pediátrico, na entrada do andar está localizado o hall do elevador que é a entrada também do centro cirúrgico localizada à esquerda.

### 3.2 Coletas de água e processamento de amostras

Os 14 sítios escolhidos para as coletas foram: tubulação de entrada do reservatório de água do hospital, 4 reservatórios de água (2 superiores e 2 subterrâneos), 4 torneiras dos quartos, e 4 torneiras dos banheiros, e 1 torneira do corredor da unidade. As coletas foram realizadas mensalmente durante o período de março de 2007 a fevereiro de 2008 (**Figura 1**).

As coletas para os reservatórios foram realizadas utilizando um coletor de água automático de abertura controlada (Policontrol, Brasil). Após as coletas, as amostras foram armazenadas em frascos com tampa rosca esterilizadas. O volume coletado de cada reservatório foi de 1 l. As amostras das torneiras foram obtidas diretamente, com frascos de tampa rosca esterilizados com volume de 500 ml.



**Figura 1.** Pontos de coleta e volumes de água coletados ao longo do estudo envolvendo a unidade pediátrica de TCTH e sistema hidráulico.

Nas amostras de água foram realizadas análise físico-química, onde foi determinado a concentração do cloro livre residual e cloro total utilizando fotocolorímetro microprocessado portátil (Policontrol, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante, a temperatura e o pH da amostras utilizando pHgâmetro digital portátil (Policontrol, Brasil), e a turbidez utilizando um turbidímetro portátil microprocessado (Policontrol, Brasi), de acordo com a metodologia do fabricante. Todas as análises foram realizadas em cabine de fluxo laminar para evitar contaminação.

Após a análise físico-química, as amostras dos diferentes sítios foram filtradas utilizando um sistema Manifold de filtração a vácuo (Millipore). Este sistema possui um suporte para processamento de 3 amostras e utiliza filtros de celulose de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore) esterilizados. A filtragem das amostras também foi realizada em cabine de fluxo laminar para evitar contaminação.

Após a filtração, os filtros de celulose foram depositados na superfície de placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose (Oxoid) e incubados a 26°C durante um período de 20 dias. As placas que apresentaram crescimento foram analisadas quantitativamente e as colônias isoladas identificação fenotipicamente e armazenadas no banco do estudo pela técnica de congelamento descrita anteriormente.

### 3.3 Coletas de ar

Os sítios escolhidos para as coletas foram: área externa do hospital, hall do elevador, corredor da unidade, quartos e banheiros da unidade de TCTH. As coletas dos banheiros foram realizadas na modalidade seca e úmida. A coleta da área externa ao hospital teve o intuito de comparar as concentrações de propágulos fúngicos do ambiente externo com as das áreas críticas. as coletas serão realizadas 1 vez por mês durante um período de Março de 2007 a Fevereiro de 2008.

As coletas de ar foram realizadas nos períodos da manhã e tarde, com o aparelho coletor de Bioaerossol (Energética, Brasil) de 6 estágios que tem a capacidade de filtrar 28 litros de ar por minuto. Para cada coleta de ar foram utilizadas seis placas de Petri de vidro contendo ágar Sabouraud dextrose (Oxoid), com duração de 30 minutos. A coleta realizada com ar úmido foi realizada ligando a torneira do banheiro durante 5 minutos antes da medição. No momento de cada coleta, foram medidas a temperatura do ambiente e a umidade relativa do ar utilizando um termohigrômetro portátil (Policontrol, Brasil). A determinação de UFC/m<sup>3</sup> foi realizada de acordo com a instrução do fabricante do amostrador de aerossol (Energética, Brasil).

As placas contendo ágar Sabouraud foram mantidas a 26°C e observadas diariamente até um período máximo de 20 dias. As placas que apresentaram crescimento foram analisadas quantitativamente e as colônias identificadas. Todas as colônias identificadas foram armazenadas pela técnica de

congelamento em glicerol 60 %. Nesta metodologia as colônias foram subcultivadas em ágar GPYA durante 07 dias. Após o crescimento, as colônias foram transferidas com o ágar GPYA para criotubos de 2 ml com 700 µl de glicerol 60%, e armazenadas a -20 °C no banco deste estudo, para posterior análise genotípica.

### **3.4 Identificação fenotípica dos fungos filamentosos isolados**

Foi realizada a análise descritiva das colônias identificadas de todos os fungos filamentosos isolados tendo em vista os seguintes aspectos: textura, topografia, superfície, cor da colônia, pigmento, cor do pigmento, tempo de crescimento e diâmetro da colônia.

Cada colônia foi semeada, com o auxílio de agulha de níquel-cromo ou alça de platina, em três pontos sobre a superfície da placa de Petri contendo ágar batata, ágar aveia (Difco) ou ágar Czapeck. Os meios de cultura foram escolhidos de acordo com as características da análise descritiva e exame direto, ambos realizados na análise preliminar a identificação de gênero e espécie. Os pontos feitos sobre o ágar foram cobertos com lamínula esterilizada em ângulo de 45° e incubados a 25°C durante 7 a 15 dias, as características das estruturas do micélio reprodutivo, como macroconídios, microconídios, ascocarpos, picnídios e conidióforos foram indispensáveis para classificar a espécie fúngica, visualizada em microscópio óptico (Olimpus®) e utilizando as chaves de classificação de De Hoog *et al* (2000).

### **3.5 Identificação fenotípica dos fungos leveduriformes isolados**

Todas as colônias leveduriformes foram identificadas pela análise micromorfológica, perfil bioquímico. A análise micromorfológica foi realizada com o auxílio de agulha de níquel-cromo, amostras de leveduras foram semeadas em três estrias paralelas sobre a superfície de meio contendo ágar fubá com Tween-20

(Sigma<sup>®</sup>), preparado previamente em placa de Petri (90x15 mm). As estrias eram cobertas com lamínula esterilizada e as placas eram incubadas a 30° C, durante 48-72 horas. Posteriormente, as colônias foram avaliadas ao microscópio óptico (Olimpus<sup>®</sup>), através de objetiva com aumento de 10 e 40 vezes.

Para a realização dos testes bioquímicos utilizamos o sistema comercial ID32 C. Foi preparado o inóculo, consistindo de uma suspensão do microrganismo em água destilada esterilizada com turbidez ajustada ao padrão n°2 da escala de McFarland, a partir de cultura com crescimento de 48 horas a 30 °C. Foram dispensados 250 µL de cada suspensão de inóculo a ser testado em ampola contendo o meio C (meio clássico, desprovido de fontes de carbono), sendo o conteúdo final delicadamente homogeneizado. Finalmente, 135 µl do conteúdo da ampola foi pipetado em cada poço da galeria. Foi preparada uma câmara úmida para evitar a desidratação dos testes, onde foram armazenadas as galerias para incubação durante 72 horas, a 30° C. Foram realizadas leituras a cada 24 horas até a leitura final após 72 horas, sendo a assimilação positiva indicada nos poços que apresentaram turvação superior àquela do controle negativo (Fricker-Hidalgo *et al.*, 1996).

A identificação das amostras foi obtida pela definição de código numérico gerado pela presença ou ausência de crescimento em cada substrato, sendo a interpretação final realizada com a ajuda de programa analítico *ApiWeb* versão 3.0 (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, França).

### 3.6 Análise estatística dos dados provenientes das coletas de ar e água

A análise estatística dos dados provenientes das coletas do ar e da água foi realizada utilizando o programa R Development Core Team (2005), Vienna, Austria disponível em <http://www.R-project.org>.

Realizamos a análise descritiva de frequências de propágulos isolados de diferentes espécies, bem como a correlação entre UFC/m<sup>3</sup> com parâmetros ambientais (temperatura e umidade relativa do ar) dos isolados do ar de todo o monitoramento.

As espécies isoladas da água foram analisadas descritivamente e realizada a correlação entre UFC e parâmetros físico-químicos utilizando o coeficiente de correlação de Pearson.

### 3.7 Caracterização genotípica

Os fungos identificados como *Fusarium solani*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus* foram avaliados genotipicamente. A técnica molecular utilizada para avaliação genotípica foi análise do DNA genômico por PCR-*fingerprinting* utilizando os iniciadores M13 minisatélite e (GACA)<sub>4</sub> (GTG)<sub>5</sub> e (GAC)<sub>5</sub> para microsátélites (IDT, San Jose, CA, USA)

#### 3.7.1 Formação de protoplastos e extração do DNA (Kit Prepman Ultra Sample Preparation Reagent , Applied Biosystem)

O kit “PrepMan™ Ultra Sample Preparation Reagent” (Applied Biosystem, California, USA ) é um sistema que consegue extrair e purificar DNA de tecidos vegetais e animais, cultivos celulares, bactérias e fungos em um intervalo de tempo relativamente curto utilizando apenas um reagente. Para a extração de DNA, utilizamos o protocolo do fabricante com modificações (CDC, Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1993). Os isolados de *Fusarium solani*



foram subcultivados em agar batata dextrose por 5 dias, e os isolados de *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus* em agar YES por 3 dias.

Após o crescimento das colônias, selecionamos uma pequena quantidade de células da borda destas, evitando coletar células com agar. Um tamanho de aproximadamente 0,5 cm por 0,5 cm de micélio foram transferidos para um microtubo contendo 300 µl de PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent. As amostras foram homogeneizadas por 30 segundos e em seguida colocadas em banho-maria a 100 °C por 15 minutos. Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas durante 7 minutos a 14000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, e acondicionadas a – 20 °C para a posterior quantificação.

### 3.7.2 Quantificação do DNA

Alíquotas de 20 µl de DNA foram diluídas em 1 ml de água milli-Q. Em seguida, a absorvância foi medida em 260 nm de comprimento de onda em espectrofotômetro (GeneQuantpro Amersham Pharmacia Biotech AB, Cambridge, England). Segundo Sambrook *et al.* (1989), a absorvância igual a 1, contém uma concentração de 50 µg/ml de DNA dupla fita, 40 µg/mL de DNA fita simples e ~ 20 µg/ml de oligonucleotídeos fita simples. Também era medida a absorvância em 280 nm de comprimento de onda para verificar a presença de proteínas e calcular a pureza do DNA. A razão entre as leituras  $DO_{260}/DO_{280}$  permite uma estimativa da pureza do DNA, que deve apresentar valores entre 1,8 e 2,0. A razão abaixo de 1,6 indica grande quantidade de contaminantes e proteínas, e na sua ocorrência, a extração foi realizada novamente.

### 3.8 Reações de PCR *fingerprinting* por minissatélite e microssatélite

Para as reações destes métodos utilizando as 3 espécies: *Fusarium solani*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus*, foram adicionados em tubos de microcentrifugação de 0,2 ml, as seguintes substâncias: 8,5 µl de água milli-Q esterilizada, 2,5 µl de 10 X buffer (Invitrogen), 5 µl de dNTP 100 Mm (Amersham - Pharmacia Biotech), 3,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen) 25 mM, 1 µl de iniciador 50 pmol, 0,13 µl de Tween-20, 0,4 µl de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 4 µl de DNA diluído a 40 ng/µl, resultando em um volume total de 25 µl.

A amplificação foi realizada em um termociclador (Gene Amp PCR System 9600, Perkin Elmer Corporation, Norwalk, CT, USA). Para o iniciador M13 foi programado com ciclo inicial de 97°C por 3 minutos, seguidos de 40 ciclos a 93°C - 20 segundos; 50°C 30 segundos e 72°C - 2 minutos. No último ciclo a temperatura de 72°C era mantida por um período de extensão de 5 minutos e, em seguida, reduzida para 4°C, na qual as amostras ficaram incubadas até sua retirada do aparelho.

Para o “primer” (GACA)<sub>4</sub> foi programado com ciclo inicial de 97°C por 3 minutos, seguidos de 40 ciclos a 93°C - 20 segundos; 48°C -30 segundos e 72°C - 2 minutos. No último ciclo a temperatura de 72°C era mantida por um período de extensão de 5 minutos e, em seguida, reduzida para 4°C, na qual as amostras ficaram incubadas até sua retirada do aparelho.

Para o “primer” (GTG)<sub>5</sub> foi programado com ciclo inicial de 94°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos a 94°C - 15 segundos; 55°C -30 segundos e 72°C - 1 minuto e 30 segundos. No último ciclo a temperatura de 72°C era mantida por um período de extensão de 4 minutos e, em seguida, reduzida para 4°C, na qual as amostras ficaram incubadas até sua retirada do aparelho.

Para o “primer” (GAC)<sub>5</sub> foi programado com ciclo inicial de 94°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos a 94°C - 15 segundos; 45°C -30 segundos e 72°C - 1 minuto e 30 segundos. No último ciclo a temperatura de 72°C era mantida por um período de extensão de 4 minutos e, em seguida, reduzida para 4°C, na qual as amostras ficaram incubadas até sua retirada do aparelho.

Após o término da reação, o DNA amplificado com cada “primer” foi armazenado em freezer a -20°C.

### 3.8.1 Eletroforese em gel de agarose

Foi utilizado gel de agarose (Ultra Pure Agarose-Invitrogen) para eletroforese na concentração de 1,2% em solução tampão TAE 1X (Tris acetato EDTA). Quanto às amostras ambientais e as cepas de referência, foram adicionados 10 µL dos produtos de PCR destas a 2 µL de tampão *Orange G*. Para o marcador de peso molecular (100 base pair Ladder / Amersham - Pharmacia Biotech), 1 µL deste foi diluído em 9 µL de água milli-Q esterilizada e 2 µL de *Orange G*. Doze microlitros das amostras foram utilizados na eletroforese realizada com os seguintes parâmetros: 400 mA a 100 volts durante 20 minutos, 55 volts por 3 horas e 40 minutos.

Após este período, o gel foi corado com solução de brometo de etídio (USB Corporation, Cleveland, OH USA) durante 20 minutos (400 mL de TAE 1X + 20 µL de brometo de etídio 10 mg/mL) e descorado em água destilada por 15 minutos. Os padrões de bandas contidos nos géis tiveram, então, sua imagem visualizada em um transiluminador de raios UV (UVP – BioDoc - it<sup>®</sup> System), capturada e transferida para um disquete (no formato JPEG) para posterior análise em programa analítico.

### 3.8.2 Avaliação da similaridade dos padrões de bandas

A análise dos resultados gerados pelo método microssatélite e minissatélite foi realizada por dendrograma utilizando o programa GEL COMPAR II versão 4.5 Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica) através de análise de agrupamento, de acordo com a similaridade dos padrões de bandas obtidos.

Os géis foram comparados entre si após o aporte de suas imagens pelo programa Gel Compar II. Este programa corrige distorções do gel, como padrões de sorriso, através da comparação com um padrão universal e seleciona automaticamente as bandas presentes no gel. As imagens originais dos géis foram analisadas visualmente para desconsiderar os artefatos. Na construção dos dendrogramas, níveis de similaridade entre os perfis foram calculados utilizando o coeficiente de Dice e as análises das matrizes de similaridade foram realizadas utilizando o método aritmético para dados não pareados (UPGMA). A tolerância escolhida para comparar as bandas foi de 2% (Soll, 2000).

## **4.0 RESULTADOS**

---

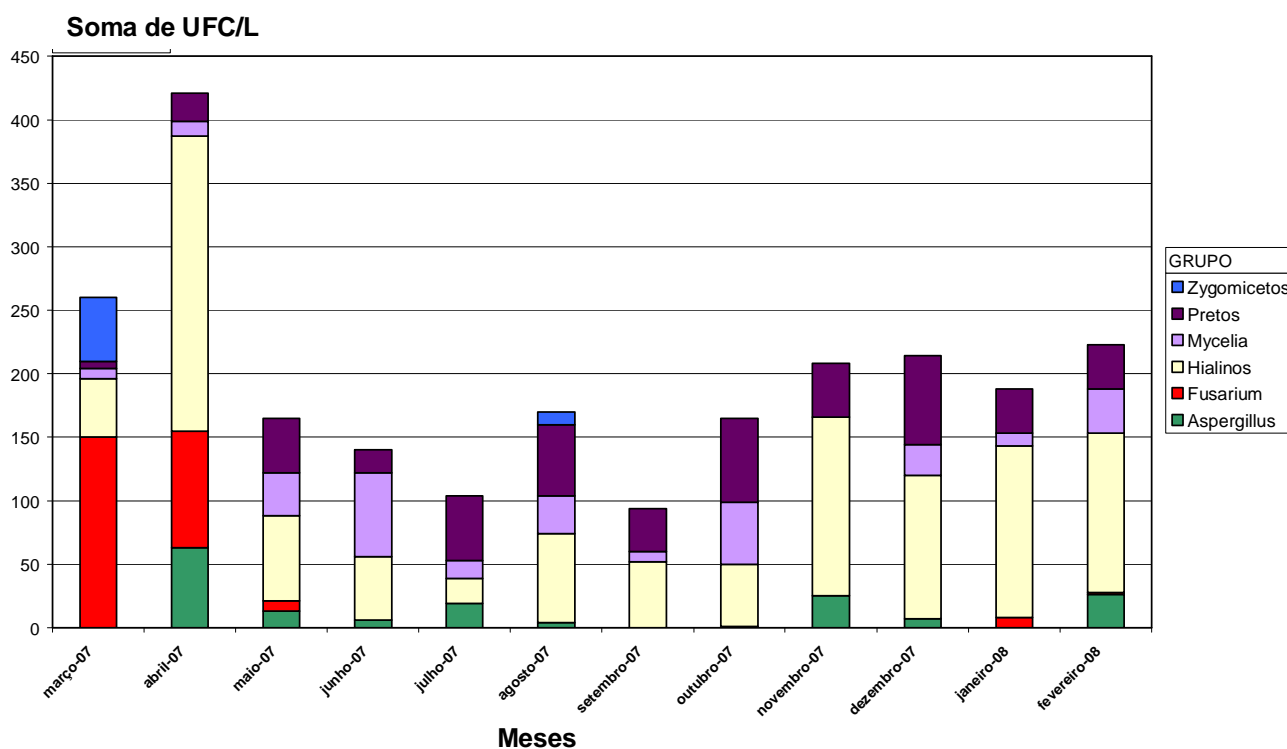
#### 4.1 Análise da água na unidade pediátrica de transplante de células tronco hematopoiéticas

Durante os 12 meses de estudo (março de 2007 a fevereiro de 2008) foram realizadas 106 coletas de 500ml de água e 58 coletas de 1000ml de água em 14 pontos (locais) diferentes da unidade pediátrica de transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH), a saber: quarto 1, quarto 2, quarto 3, quarto 4, banheiro 1, banheiro 2, banheiro 3, banheiro 4 e corredor da unidade; e dos 4 reservatórios que fornecem água para a unidade, além da porta de entrada da água no hospital, o cavalete. O número de coletas ao longo do ano variou de 10-12 por ponto, devido à manutenção do sistema hidráulico em alguns meses do monitoramento (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Descrição dos pontos e volumes de coletas de água realizadas ao longo de 12 meses de estudo.

Pontos de coleta	Número de coletas	Volume/coleta
Quarto 1	12	500 ml
Quarto 2	12	500 ml
Quarto 3	10	500 ml
Quarto 4	12	500 ml
Banheiro 1	12	500 ml
Banheiro 2	12	500 ml
Banheiro 3	12	500 ml
Banheiro 4	12	500 ml
Corredor	12	500 ml
Reservatório 1	12	1000 ml
Reservatório 2	11	1000 ml
Reservatório 3	12	1000 ml
Reservatório 4	12	1000 ml
Cavalete	11	1000 ml

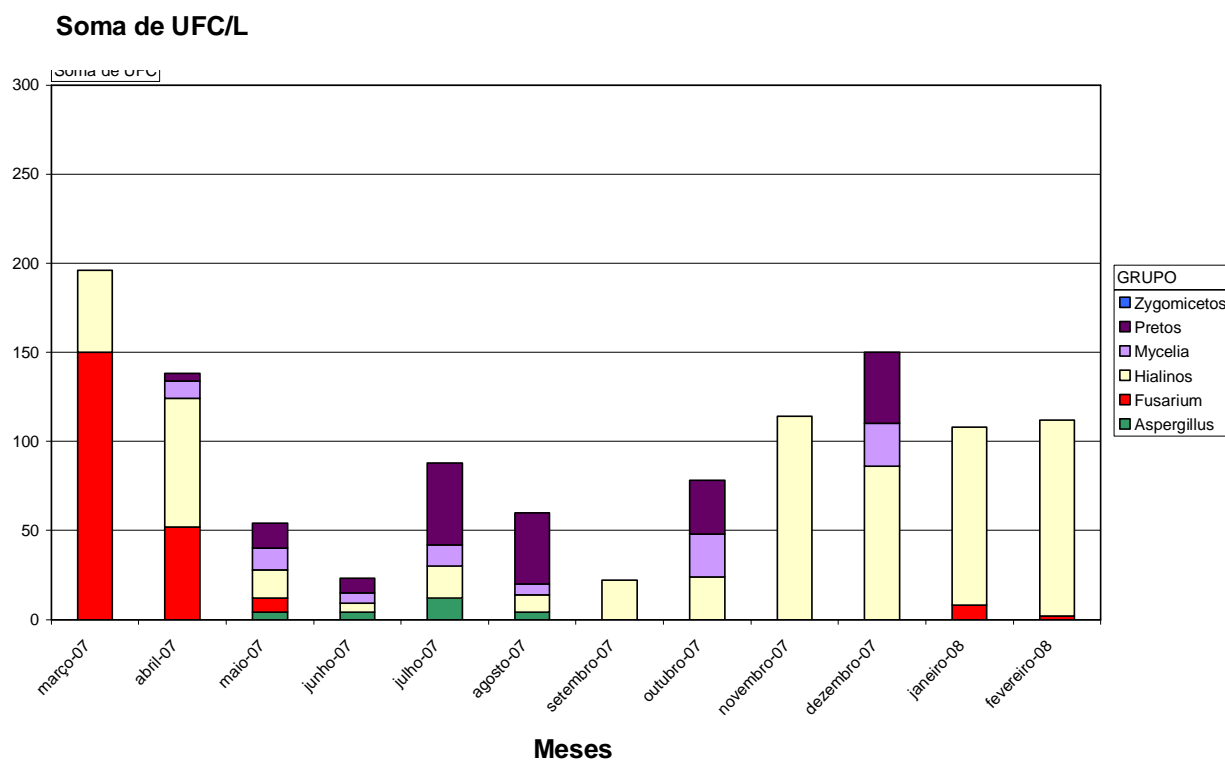
A análise da frequência de fungos filamentosos isolados da unidade interna e dos reservatórios externos é apresentada na **Figura 2**. Os fungos foram agrupados da seguinte forma: *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp, Zigomicetos, fungos pretos ou demáceos, fungos hialinos e *Mycelia sterilia* para facilitar a análise. Podemos observar uma maior frequência de propágulos fúngicos nos meses de março e abril de 2007, e janeiro e fevereiro de 2008. O grupo fungos demáceos foi isolado em todos os meses de coleta sendo o principal gênero isolado *Cladosporium* spp.



**Figura 2.** Gráfico descritivo dos principais gêneros e grupos de fungos isolados durante todo o monitoramento das áreas interna (torneiras dos quartos, banheiros e corredor) e externa (reservatórios) da unidade.

Na **Figura 3** observa-se que houve maior número de propágulos fúngicos isolados na unidade interna (torneiras dos quartos, banheiros e corredor) nos

meses de março e abril de 2007 e janeiro e fevereiro de 2008, que corresponde aos meses de altas temperaturas e elevado índice pluviométrico. O gênero *Fusarium* foi mais frequente no mês de março de 2007, enquanto que o gênero *Aspergillus* no mês de julho de 2007. Houve maior isolamento de fungos hialinos, com prevalência de *Penicillium* spp. e *Paecilomyces* spp. Não houve isolamento de Zigomicetos nos pontos de coleta da unidade durante todo o monitoramento.

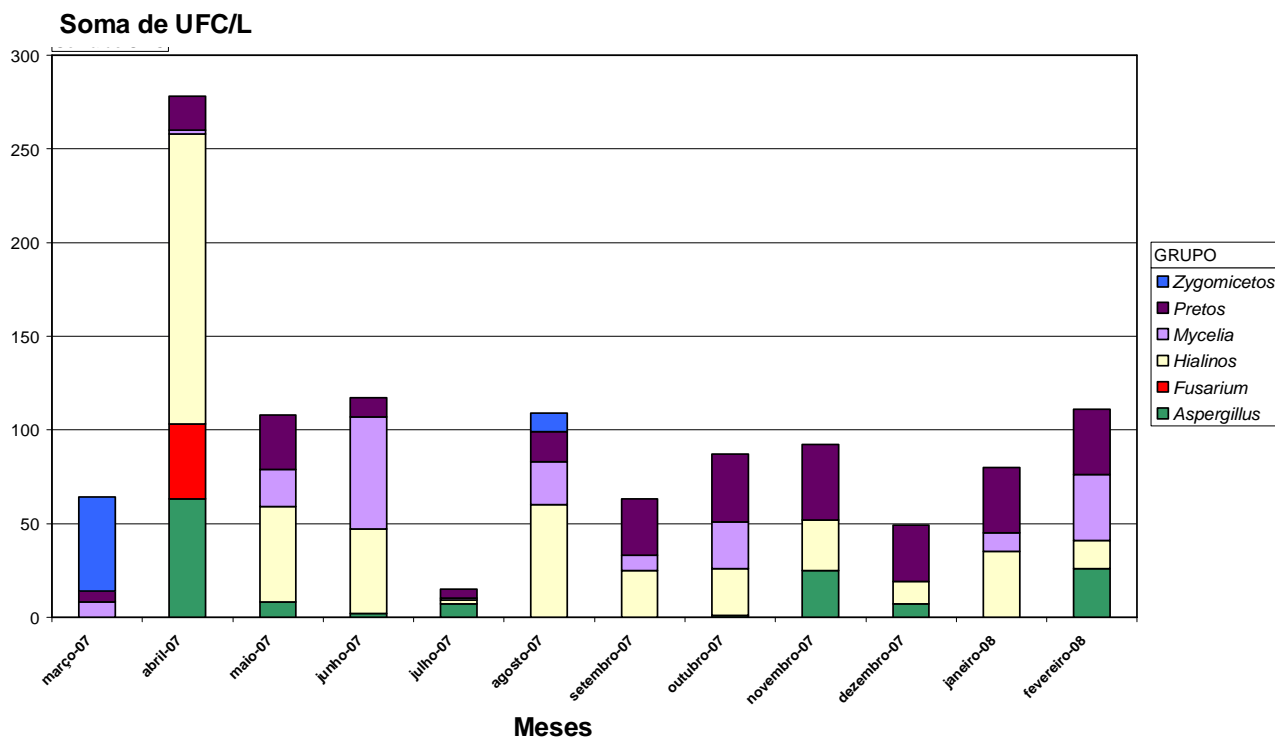


**Figura 3.** Gráfico descritivo dos principais grupos de fungos isolados durante todo o monitoramento da área interna da unidade (torneiras dos quartos, banheiros e corredor).

Na análise dos principais grupos isolados na área externa da unidade (4 reservatórios) o gênero *Aspergillus* foi isolado em 7 meses do monitoramento, enquanto

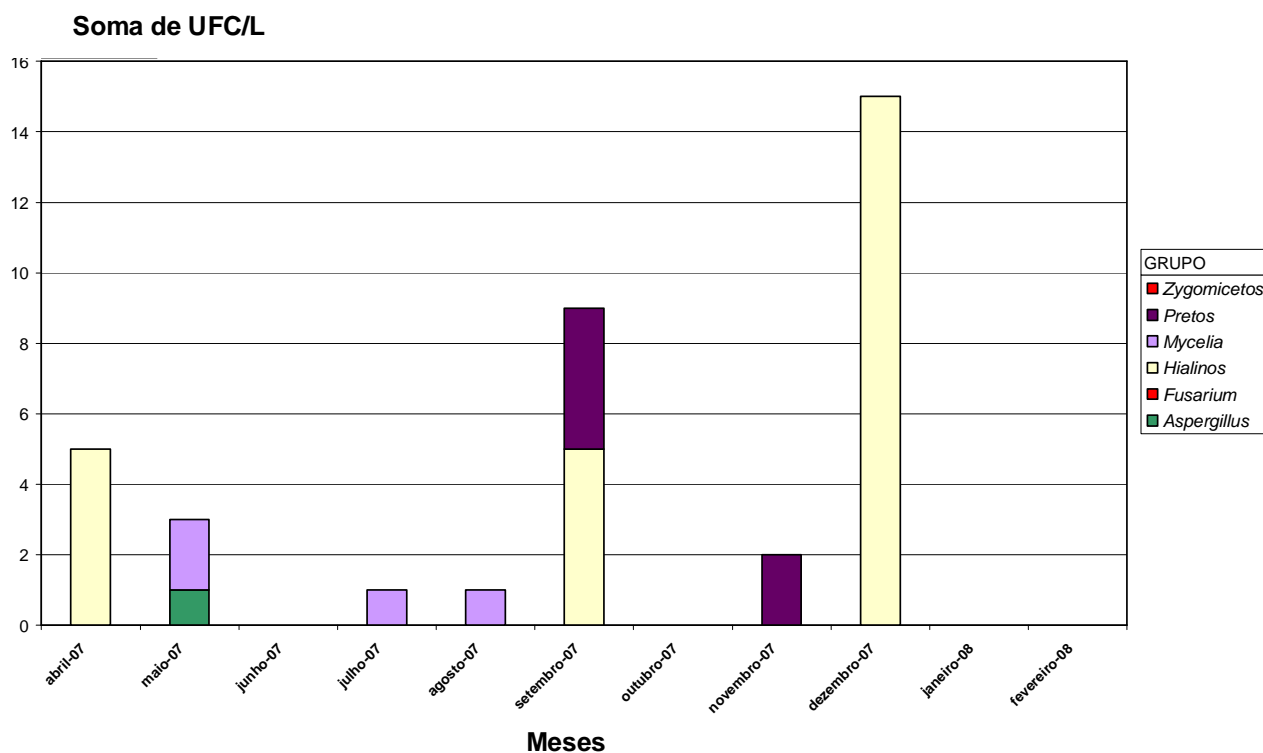


que *Fusarium* spp. apenas foi isolado no mês de abril de 2007. Fungos hialinos e demáceos foram isolados em todos os meses de coleta, com prevalência de *Penicillium* spp. e *Cladosporium* spp. respectivamente. (Figura 4).



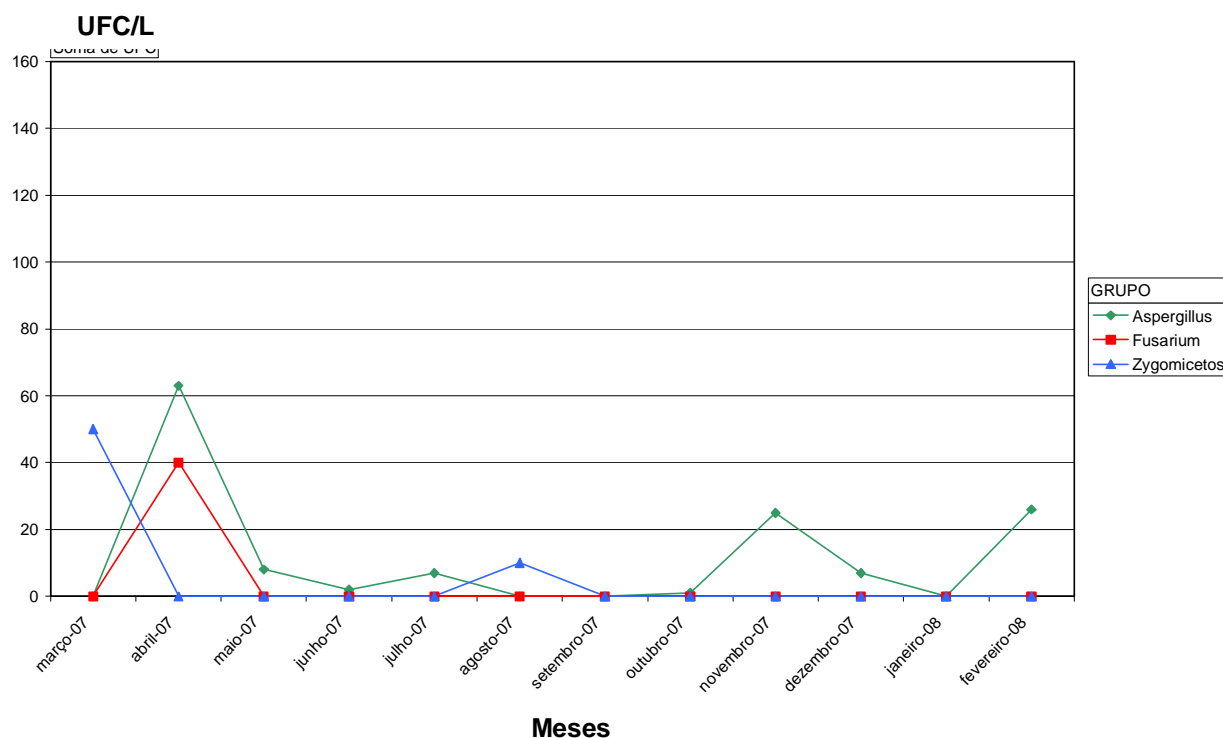
**Figura 4.** Gráfico descritivo dos principais grupos de fungos isolados durante todo o monitoramento da área externa da unidade (reservatórios).

A análise da água do cavalete (porta de entrada da água no hospital, proveniente do sistema municipal de distribuição) mostrou baixo valor de propágulos fúngicos (valor máximo 16 UFC/l), se comparado com os valores obtidos no monitoramento da área interna e externa. Os agentes mais frequentes foram os fungos hialinos (prevalência de *Penicillium* spp.) e demáceos ou pretos (prevalência de *Cladosporium* spp.). Nos meses de julho e outubro de 2007, e janeiro e fevereiro de 2008 não houve isolamento de fungos. O único agente com potencial patogênico para populações de risco isolado do cavalete foi *Aspergillus* spp (Figura 5).



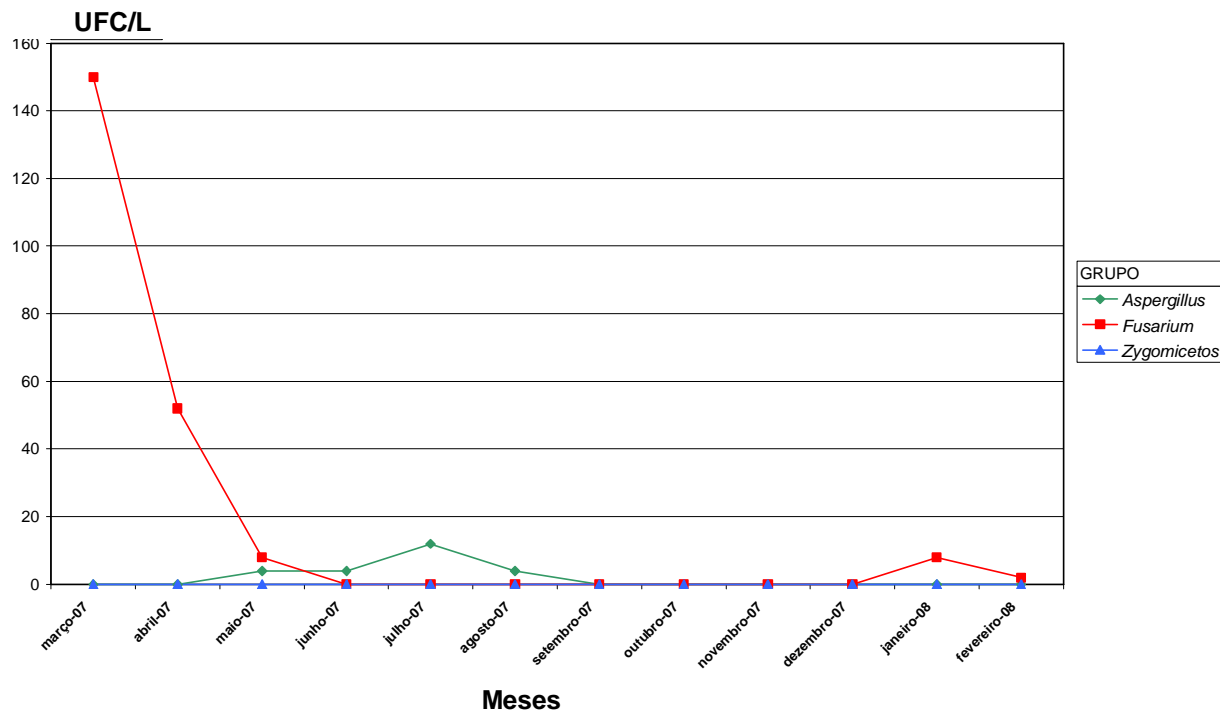
**Figura 5.** Gráfico descritivo dos principais grupos de fungos isolados durante todo o monitoramento da porta de entrada da água no hospital, proveniente do sistema de distribuição municipal (cavalete).

As espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* apresentaram uma maior frequência de isolamento nos meses de abril e novembro de 2007 sendo a principal espécie isolada *Aspergillus flavus*. As espécies do gênero *Fusarium* apresentaram uma elevada concentração no mês de abril de 2007 sendo a principal espécie *Fusarium solani*, os microrganismos foram isolados principalmente nos reservatórios do hospital (**Figura 6**).



**Figura 6.** Frequência de *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp e Zigomicetos isolados dos reservatórios do hospital pediátrico no período de março de 2007 a fevereiro de 2008.

Dos microrganismos isolados da unidade interna podemos observar que o grupo *Fusarium* spp apresentou uma maior frequência de isolamento nos meses de março e abril de 2007 apresentando novamente uma tendência ao aumento em janeiro de 2008, a principal espécie isolada foi *Fusarium solani*. Não houve isolamento de Zigomicetos durante todo o monitoramento da unidade interna (**Figura 7**).



**Figura 7.** Frequência de *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp e Zigomicetos isolados da água da unidade interna de TCH (torneiras dos quartos, banheiro e corredor) do hospital pediátrico no período de março de 2007 a fevereiro de 2008.

A média de UFC/L da água coletada da unidade interna (total 9 pontos de coleta) variou de 1,1 a 13,1, com média de 6,07 UFC/l em todo o monitoramento. Nas coletas da unidade externa a variação foi de 1,2 a 20 UFC/l (total de 5 pontos de coleta) com média anual de 11,05. A **Tabela 2** descreve os 17 agentes isolados no estudo e o valor de UFC total, médio e número de amostras positivas para cada agente nas 164 coletas. Observa-se que dos agentes isolados, 290 UFC puderam ser identificadas fenotipicamente (denominados assim *Mycelia sterilia*), sendo que deste total 8,62% correspondem a fungos hialinos e 3,7 % a fungos demáceos sem frutificação.

**Tabela 2.** Valor total, médio e número de amostras positivas para cada espécie de fungo isolada ao longo de 12 meses de **monitoramento da água** de uma unidade pediátrica de transplante de células tronco hematopoiéticas.

Agentes	UFC total* (n= 164)	Média (UFC/L)	Nº de amostras positivas (n=164)
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	584	3,561	25
<i>Penicillium</i> spp.	468	2,854	45
<i>Cladosporium</i> spp.	406	2,476	45
<i>Mycelia sterilia</i>	290	1,768	40
<i>Fusarium solani</i>	256	1,561	16
<i>Aspergillus flavus</i>	73	0,445	16
<i>Aureobasidium pulullans</i>	72	0,439	7
<i>Rhizopus</i> spp.	55	0,335	2
<i>Aspergillus niger</i>	39	0,238	7
<i>Trichoderma</i> spp.	35	0,213	3
<i>Aspergillus deflectus</i>	25	0,152	1
<i>Aspergillus</i> spp.	24	0,146	2
<i>Chrysonilia sitophila</i>	13	0,079	2
<i>Mucor</i> spp.	5	0,030	1
<i>Fusarium dimerum</i>	4	0,024	1
<i>Aspergillus sydowii</i>	2	0,012	1
<i>Aspergillus oryzae</i>	1	0,006	1

\* Este número reflete o total de colônias que cresceram em placas, ao longo de 12 meses, contemplando todas as amostras positivas.

#### 4.1.2 Análise estatística e correlação com parâmetros físico-químicos

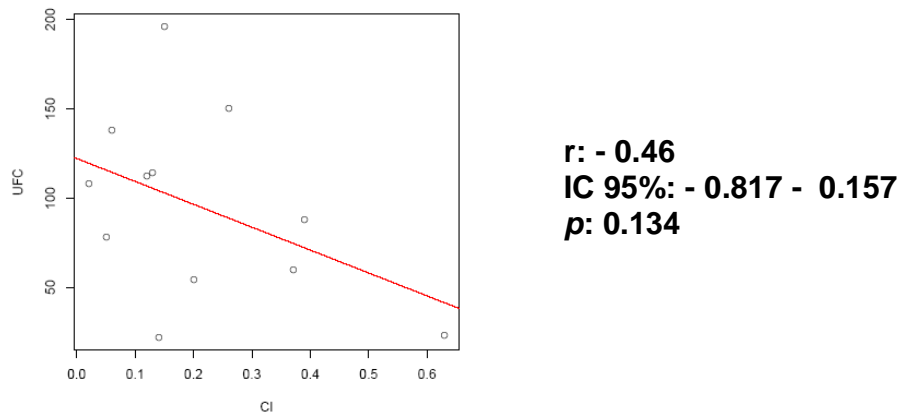
De cada amostra de água foram avaliados os seguintes parâmetros físico-químicos: Temperatura em Graus Celsius (°C), Potencial Hidrogeniônico (pH), Turbidez, Cloro Livre Residual. Na tabela 2 podemos observar o resumo das medidas de

tendência central obtidas, a média do isolamento de fungos considerando a somatória de todas as coletas mensais (14 pontos) foi de 196UFC/l e concentração de cloro livre residual apresentou uma média de 0,38 ppm sendo que os valores de referência variam entre 0,2 e 2,5 ppm segundo a portaria nº 518, de 2004. Os valores de turbidez variaram entre 0,49 e 1,11 dentro dos valores de referência que determinam valores menores a 5 NTU (unidade de turbidez) segundo a mesma portaria (**Tabela 3**).

**Tabela 3:** Medidas de tendência central de todos os dados coletados na unidade interna e externa da unidade oncológica pediátrica ao longo de 12 meses de estudo.

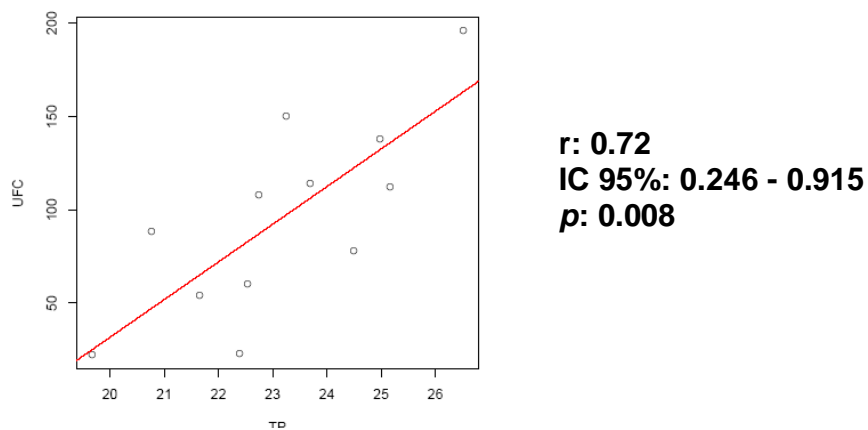
Valores	UFC/L	Cl. Livre (mg/ml)	Temp. (°C)	pH	Turbidez (NTU)
Mínimo	94,0	0,14	20,08	7,53	0,49
Mediana	179,0	0,37	22,98	8,18	0,77
Média	196,0	0,38	23,21	8,13	0,81
Máximo	421,0	0,89	26,69	8,47	1,11

A análise estatística dos resultados foi realizada com a correlação entre as UFC e parâmetros físico-químicos utilizando o coeficiente de correlação de Pearson. Na **Figura 8** observamos uma correlação que indica quando temos uma maior concentração de cloro livre residual obtivemos uma diminuição de propágulos fúngicos, contudo esta diferença não é estatisticamente significativa.



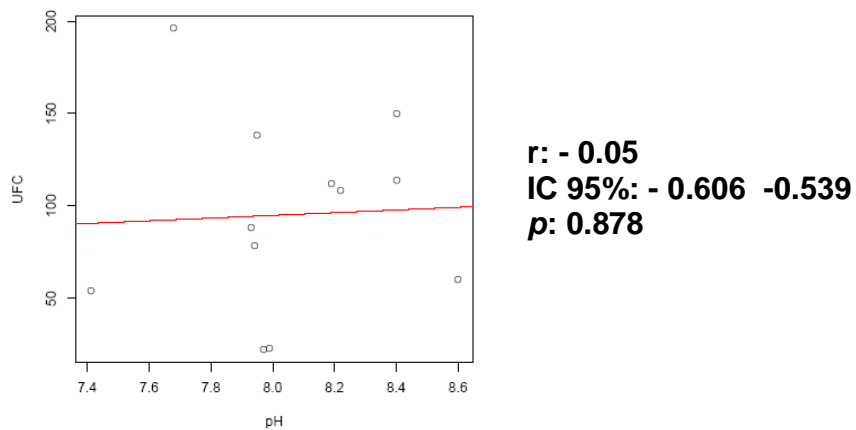
**Figura 8.** Correlação entre valores mensais de cloro livre residual (CL) da água e valores mensais de unidades formadoras de colônias (UFC) de fungos filamentosos obtidos em todas as coletas de água ao longo de 12 meses de estudo.

Na **Figura 9** observamos uma correlação que indica que com uma maior temperatura obtivemos um aumento de propágulos fúngicos sendo esta diferença estatisticamente significativa, o que nos leva a determinar este parâmetro físico-químico como o principal fator.



**Figura 9.** Correlação entre valores mensais da temperatura da água (TP) e valores mensais de unidades formadoras de colônias (UFC) de fungos filamentosos obtidos em todas as coletas de água ao longo de 12 meses de estudo.

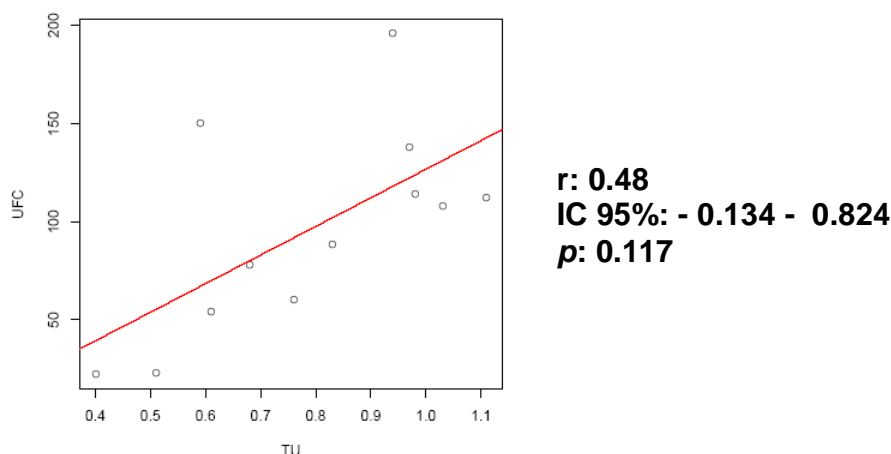
Na **Figura 10** o gráfico não demonstra uma correlação entre o pH e a concentração de propágulos fúngicos.



**Figura 10.** Correlação entre valores potencial hidrogeniônico (pH) da água e valores mensais de unidades formadoras de colônias (UFC) de fungos filamentosos obtidos em todas as coletas de água ao longo de 12 meses de estudo.

No gráfico da próxima página (**Figura 11**) observamos uma correlação que indica que com uma maior a turbidez da água obtivemos um aumento de propágulos fúngicos, contudo esta diferença não é estatisticamente significativa.





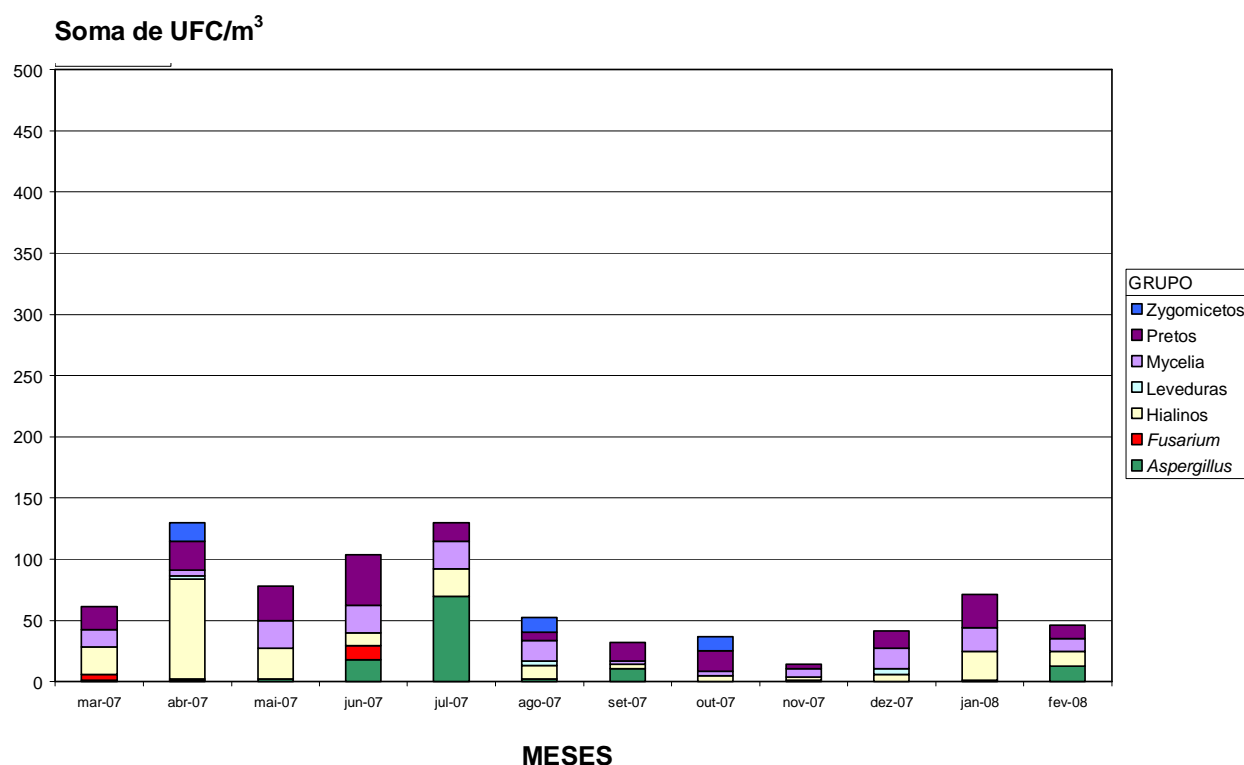
**Figura 11.** Correlação entre valores mensais de turbidez (TU) da água e valores mensais de unidades formadoras de colônias (UFC) de fungos filamentosos obtidos em todas as coletas de água ao longo de 12 meses de estudo.

#### 4.2 Análise do ar realizada na unidade pediátrica de transplante de medula óssea

Durante os 12 meses de estudo (março de 2007 a fevereiro de 2008) foram realizadas 264 coletas de ar com duração de 30 minutos em 11 pontos (locais) diferentes da unidade pediátrica de transplante de medula óssea a saber: quarto 1, quarto 2, quarto 3, quarto 4, banheiro 2 (seco e úmido), banheiro 4 (seco e úmido), corredor, hall do elevador e área externa do hospital. Em relação às coletas nos banheiros somente foram realizadas nos quartos 2 e 4 devido ao tipo de transplante que é realizado nos pacientes alojados nestes quartos e ao risco potencial de infecção nestes casos.

Observou-se uma elevada concentração de propágulos fúngicos nos meses de abril a julho de 2007, a frequência analisada corresponde a 6 pontos de coletas 4 quartos e 2 banheiros, o que corresponde a 21 UFC/m<sup>3</sup> por ponto de coleta aproximadamente nesse período. Os fungos isolados em todos os meses de coleta foram

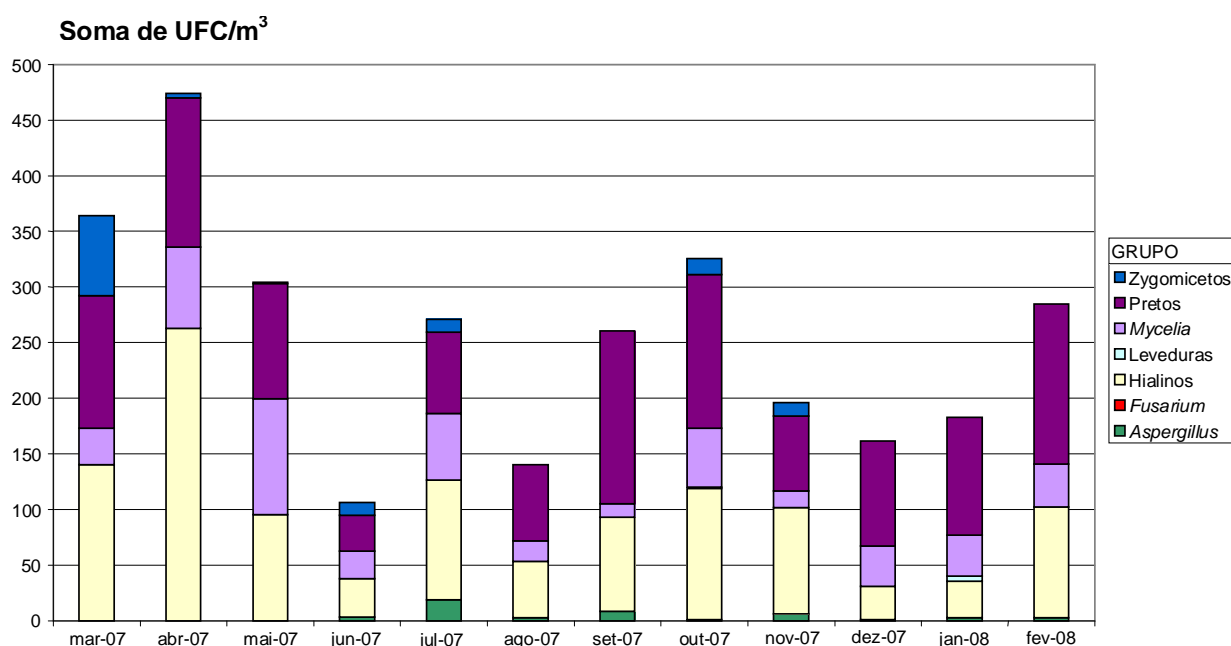
o grupo dos demáceos sendo o seu principal agente *Cladosporium* spp e dos fungos hialinos o principal agente isolado foi *Penicillium* spp. Dentre as espécies que apresentam poder patogênico *Fusarium* spp foi encontrado principalmente nos meses de março, abril e junho de 2007 sendo a principal espécie isolada *Fusarium solani*. As espécies do gênero *Aspergillus* foram isoladas nos meses de maio a setembro de 2007 e novamente em janeiro de 2008 sendo a principal espécie *Aspergillus flavus* (Figura 12).



**Figura 12.** Frequência (UFC/m<sup>3</sup>) de todos os propágulos fúngicos isolados do ar na unidade interna (quartos e banheiros) que utilizam filtros HEPA no período de março de 2007 a fevereiro de 2008.

Os fungos que foram isolados em todos os meses de coleta na unidade externa que corresponde ao corredor, hall e exterior do hospital foram os demáceos sendo o seu principal agente *Cladosporium* spp e dos fungos hialinos o principal agente isolado foi *Penicillium* spp.. Dos fungos que apresentam poder patogênico não isolamos *Fusarium*

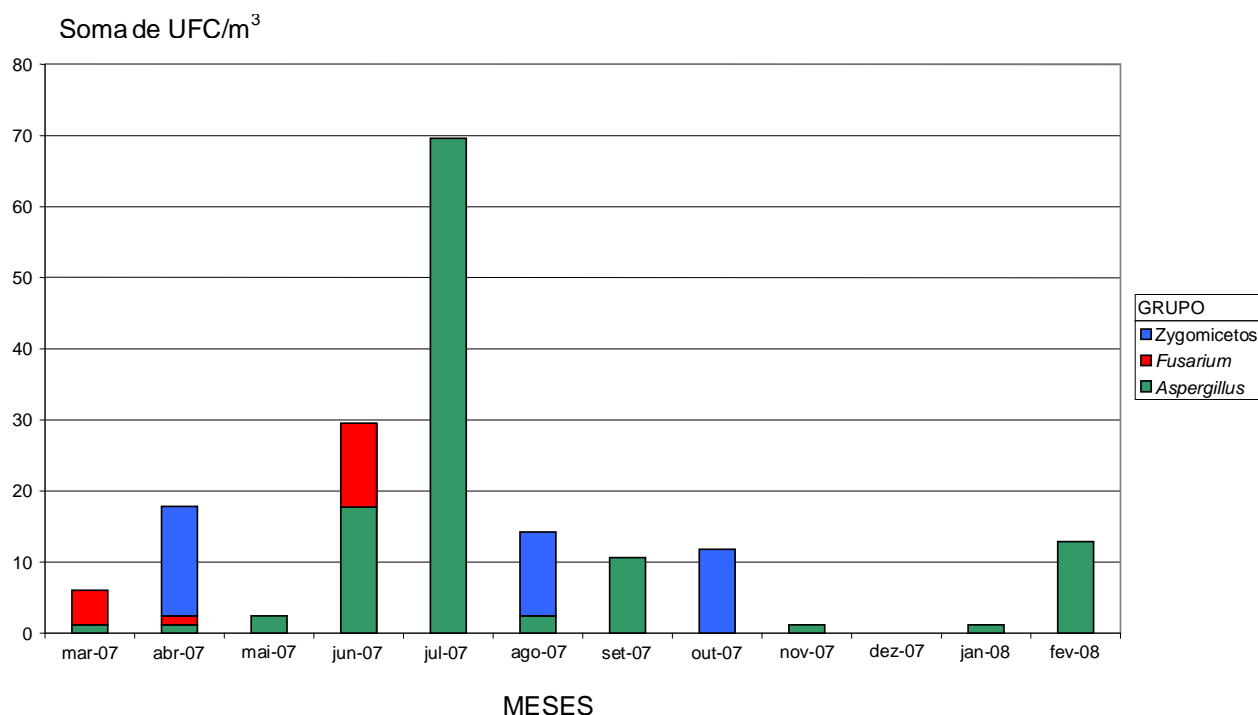
spp.. As espécies do gênero *Aspergillus* foram isoladas nos meses de julho a setembro de 2007 e novamente em novembro de 2007, janeiro e fevereiro de 2008 (Figura 13), sendo a principal espécie *Aspergillus flavus*.



**Figura 13.** Frequência (UFC/m<sup>3</sup>) de todos propágulos fúngicos isolados do ar na unidade externa (corredor, hall do elevador e coleta externa) da unidade no período de março de 2007 a fevereiro de 2008.

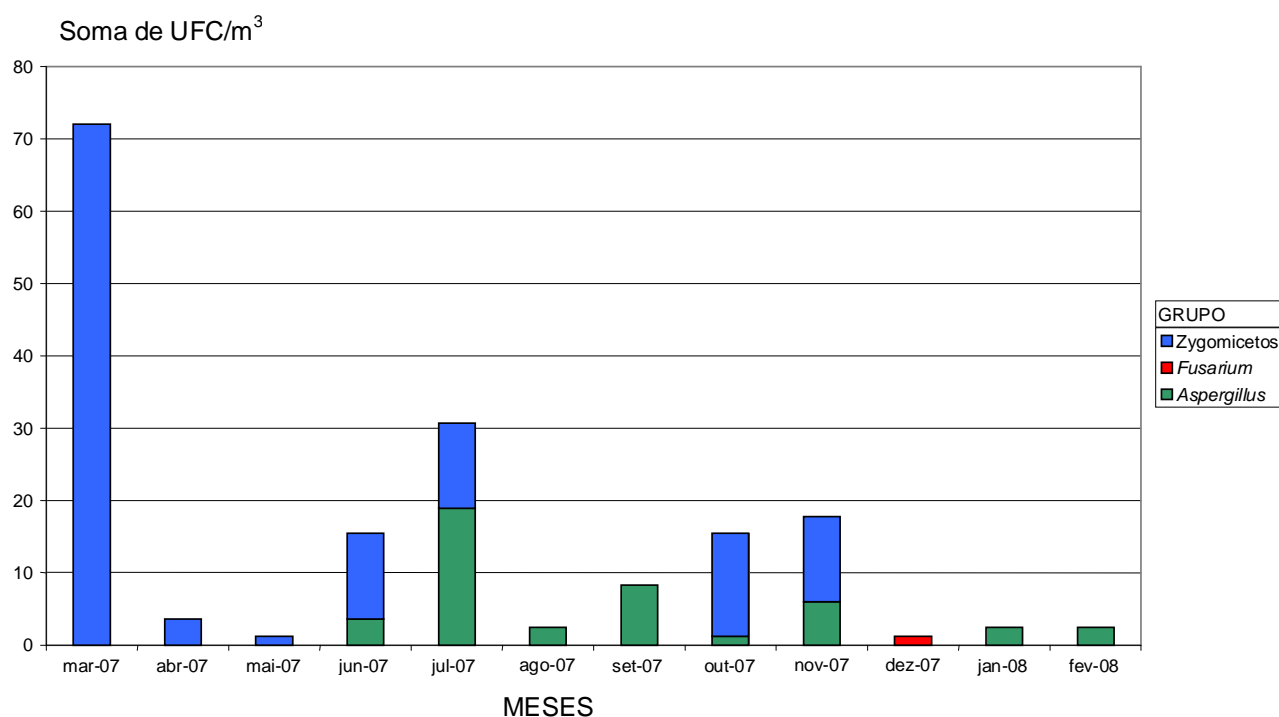
Dentre os fungos que apresentam poder patogênico, *Fusarium* sendo o principal agente *F. solani*, foram isolados nos meses de março, abril e junho de 2007 na unidade interna que corresponde aos quartos e banheiros da unidade. As espécies do gênero *Aspergillus* foram isoladas em todos os meses de coleta exceto no mês de outubro

de 2007, sendo a principal espécie *Aspergillus flavus*. Os Zigomicetos foram isolados principalmente nos meses de abril, agosto e outubro de 2007 (**Figura 14**).



**Figura 14.** Frequência (UFC/m<sup>3</sup>) de propágulos fúngicos de isolados do ar apenas de *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e Zigomicetos na unidade interna (quartos e banheiros) da unidade de transplante de células tronco hematopoiéticas no período de março de 2007 a fevereiro de 2008.

Na área externa, *Fusarium* spp. foi isolado somente no mês de dezembro de 2007. As espécies do gênero *Aspergillus* foram isoladas nos meses de junho a novembro de 2007 e janeiro a fevereiro de 2008, sendo a principal espécie *Aspergillus flavus*. Os Zigomicetos foram isolados principalmente nos meses de março a julho de 2007 e outubro e novembro de 2007 (**Figura 15**).



**Figura 15.** Frequência (UFC/m<sup>3</sup>) de propágulos fúngicos de apenas *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e Zigomicetos, isolados do ar na unidade externa (corredor, hall do elevador e área externa do hospital) ao período de março de 2007 a fevereiro de 2008.

Um total de 36 espécies diferentes foram isoladas ao longo de todo o monitoramento do ar na unidade equipada com filtros HEPA, e na área externa. Os agentes mais frequentes nas 264 coletas foram *Cladosporium* spp. e *Penicillium* spp. O isolamento de leveduras correspondeu a 0,79% do total de fungos isolados, sendo que os agentes foram: *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula* spp e *Trichosporon* spp. Assim como nos isolamentos das coletas de água, *Mycelia sterilia* representou alto valor de UFC (697,2), dos isolados durante todo o monitoramento, sendo que 80% (557,76 UFC total) destes isolados foram fungos hialinos e 20 % (140,14 UFC total) de fungos demáceos sem frutificação, impossível de identificação fenotípica (**Tabela 4**).

**Tabela 4.** Valor total, médio e número de amostras positivas para cada espécie de fungo isolada ao longo de 12 meses de **monitoramento do ar** de uma unidade pediátrica de transplante de células tronco hematopoiéticas.

Agentes	UFC total* (n=264)	Média (UFC/coleta)	Nº de amostras positivas (n=264)
<i>Cladosporium</i> spp.	1508,1	5,713	237
<i>Penicillium</i> spp.	1136,4	4,305	178
<i>Mycelia sterilia</i>	697,2	2,641	171
<i>Aspergillus flavus</i>	139,6	0,529	32
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	129,8	0,492	24
<i>Chrysonilia sitophila</i>	129,1	0,489	12
<i>Mucor</i> spp.	92,2	0,349	12
<i>Rhizopus</i> spp.	72	0,273	7
<i>Trichoderma</i> spp.	62,6	0,237	12
<i>Aspergillus niger</i>	28,5	0,108	12
<i>Fusarium solani</i>	16,6	0,063	5
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	16,5	0,063	4
<i>Phoma</i> spp.	14,2	0,054	3
<i>Trichosporon</i> spp.	10,8	0,041	6
<i>Aspergillus fumigatus</i>	10,6	0,040	4
<i>Aspergillus sydowii</i>	10,6	0,040	3
<i>Candida parapsilosis</i>	7,2	0,027	3
<i>Candida guilliermondii</i>	7,1	0,027	3
<i>Alternaria alternata</i>	4,8	0,018	3
<i>Aspergillus avenaceus</i>	4,7	0,018	1
<i>Curvularia</i> spp.	3,6	0,014	2
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	3,5	0,013	1
<i>Rhodotorula</i> spp.	2,4	0,009	2
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	2,4	0,009	1
<i>Acremonium</i> spp.	1,2	0,005	1
<i>Aspergillus carneus</i>	1,2	0,005	1
<i>Aspergillus janus</i>	1,2	0,005	1
<i>Aspergillus parasiticus</i>	1,2	0,005	1
<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	1,2	0,005	1
<i>Aspergillus</i> spp.	1,2	0,005	1
<i>Curvularia lunata</i>	1,2	0,005	1
<i>Exophiala</i> spp.	1,2	0,005	1
<i>Fusarium dimerum</i>	1,2	0,005	1
<i>Fusarium incarnatum</i>	1,2	0,005	1
<i>Geotrichum candidum</i>	1,2	0,005	1
<i>Paecilomyces variotii</i>	1,2	0,005	1

\* Este número reflete o total de colônias que cresceram em placas, ao longo de 12 meses, contemplando todas as amostras positivas.

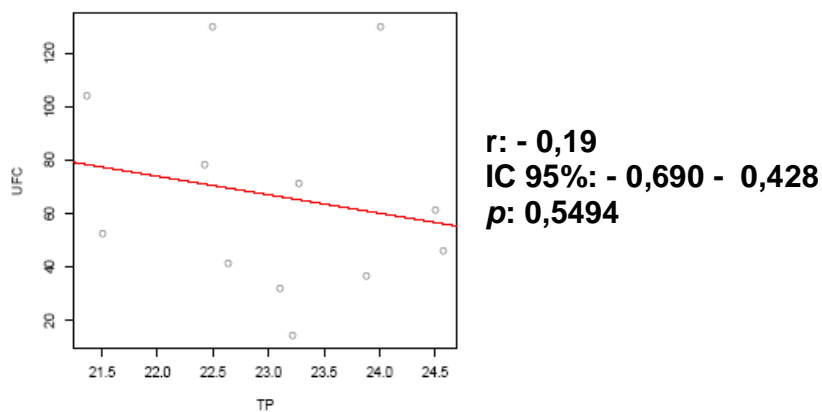
#### 4.2.2 Correlação dos resultados descritivos com condições ambientais

No momento de cada coleta de ar foram medidas a temperatura e a umidade relativa do ar. Na **Tabela 5** observamos o resumo das medidas de tendência central obtidas nas coletas da unidade interior (quartos e banheiros) que utilizam filtros HEPA, sendo no total 6 pontos de coleta, a média do isolamento de fungos foi de 66,52 UFC/m<sup>3</sup>, temperatura média de 23,08°C e umidade média de 61,5% no período de 12 meses de coleta, os valores não podem ser comparados com valores de referência, já que a associação de vigilância sanitária não possui uma portaria que especifique os valores para hospitais que utilizam filtros HEPA .

**Tabela 5.** Medidas de tendência central UFC/m<sup>3</sup>, temperatura e umidade coletados na unidade interna de transplante de células tronco hematopoiéticas em 12 meses de estudo.

Valores	UFC/m <sup>3</sup>	Umidade (%)	Temp. (°C)
Mínimo	14,30	53,45	21,37
Mediana	57,0	62,46	23,16
Média	66,52	61,15	23,08
Máximo	130,10	67,24	24,57

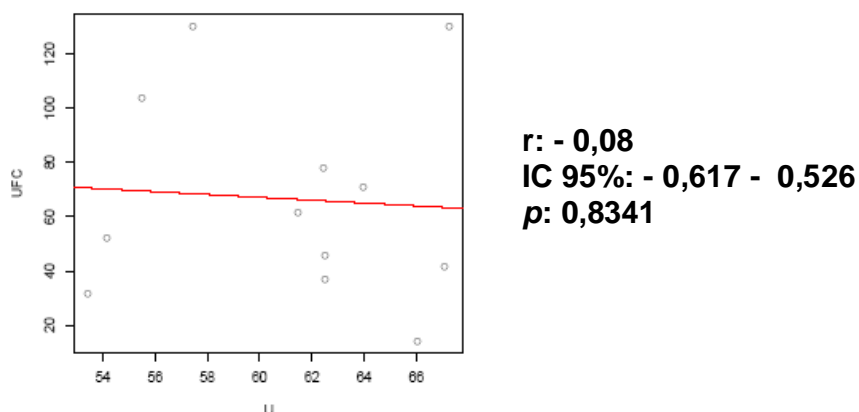
No gráfico da **Figura 16** observa-se uma correlação entre a temperatura e a concentração de propágulos fúngicos da unidade interna (quartos e banheiro), mas esta diferença não é estatisticamente significativa.



**Figura 16.** Correlação entre valores mensais de temperatura ambiente (TP) e unidades formadoras de colônias por metro cúbico (UFC/m<sup>3</sup>) obtidas em 12 meses de estudos na unidade interna (quartos e banheiros) de TCTH.

Não houve uma correlação entre umidade relativa do ar e a concentração de propágulos fúngicos da unidade interna (quartos e banheiro), conforme gráfico da **Figura 17**.





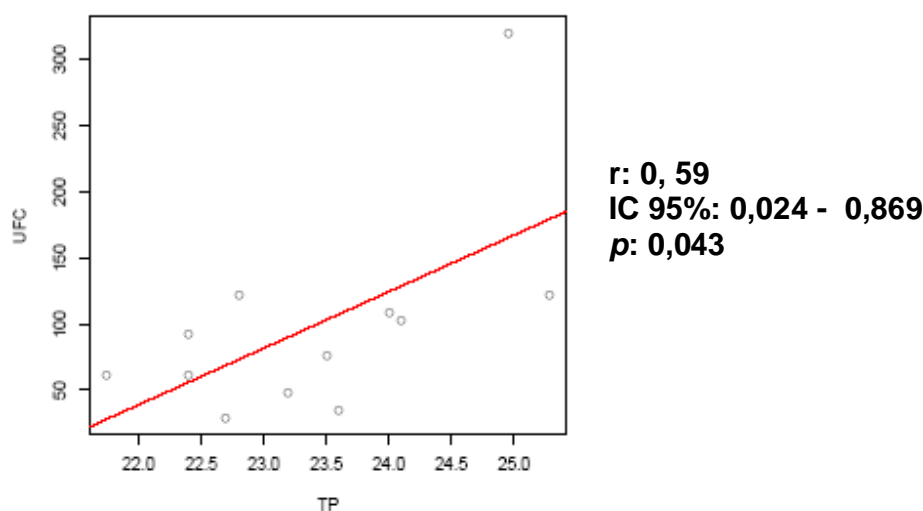
**Figura 17.** Correlação entre valores mensais de umidade relativa do ar (U) e unidades formadoras de colônias por metro cúbico (UFC/m<sup>3</sup>) obtidas em 12 meses de estudos na unidade interna (quartos e banheiros) de TCTH.

Na **Tabela 6** observamos o resumo das medidas de tendência central obtidas nas coletas da unidade exterior (corredor e hall do elevador) que não utilizam filtros HEPA, sendo no total 3 pontos de coleta, a média do total de isolamento de fungos foi de 98,93 UFC/m<sup>3</sup>, temperatura média de 23,39°C e umidade média de 54,84% no período de 12 meses de coleta.

**Tabela 6.** Medidas de tendência central: UFC/m<sup>3</sup>, temperatura e umidade coletados na área externa da unidade de transplante de células tronco hematopoiéticas.

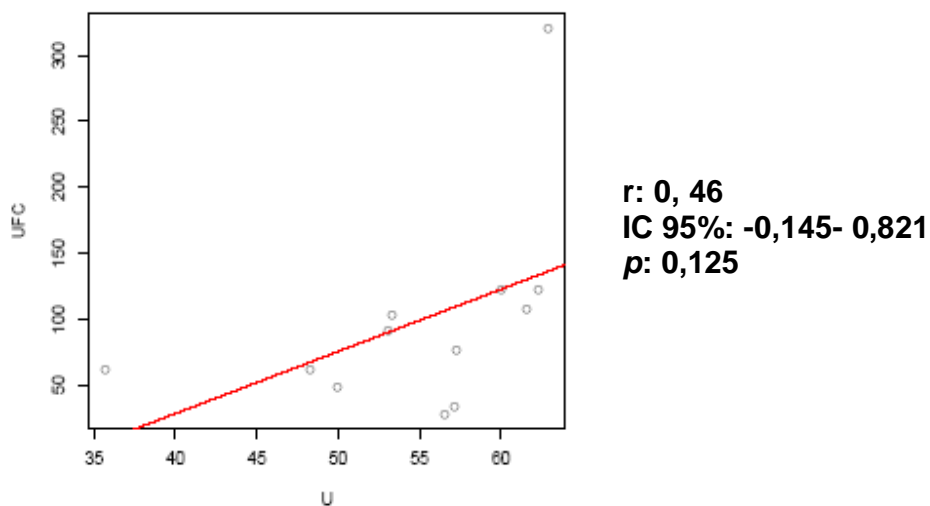
Valores	UFC/m <sup>3</sup>	Umidade (%)	Temp. (°C)
Mínimo	28,40	35,75	21,75
Mediana	84,40	56,83	23,35
Média	98,93	54,84	23,39
Máximo	320,60	62,85	25,28

No gráfico abaixo (**Figura 18**) observa-se uma correlação entre a temperatura e a concentração de propágulos fúngicos da unidade externa (corredor e hall do elevador), sendo esta diferença estatisticamente significativa, o que nos leva a determinar este parâmetro físico-químico como o principal fator.



**Figura 18.** Correlação entre valores mensais de temperatura ambiente (TP) e unidades formadoras de colônias por metro cúbico (UFC/m<sup>3</sup>) obtidas em 12 meses de estudos na unidade externa (corredor, hall do elevador e área externa do hospital de pediatria oncológica).

Observou-se uma tendência a correlação entre a umidade e a concentração de propágulos fúngicos da unidade externa (corredor e hall do elevador e área externa do hospital), mas esta diferença não é estatisticamente significativa (**Figura 19**).

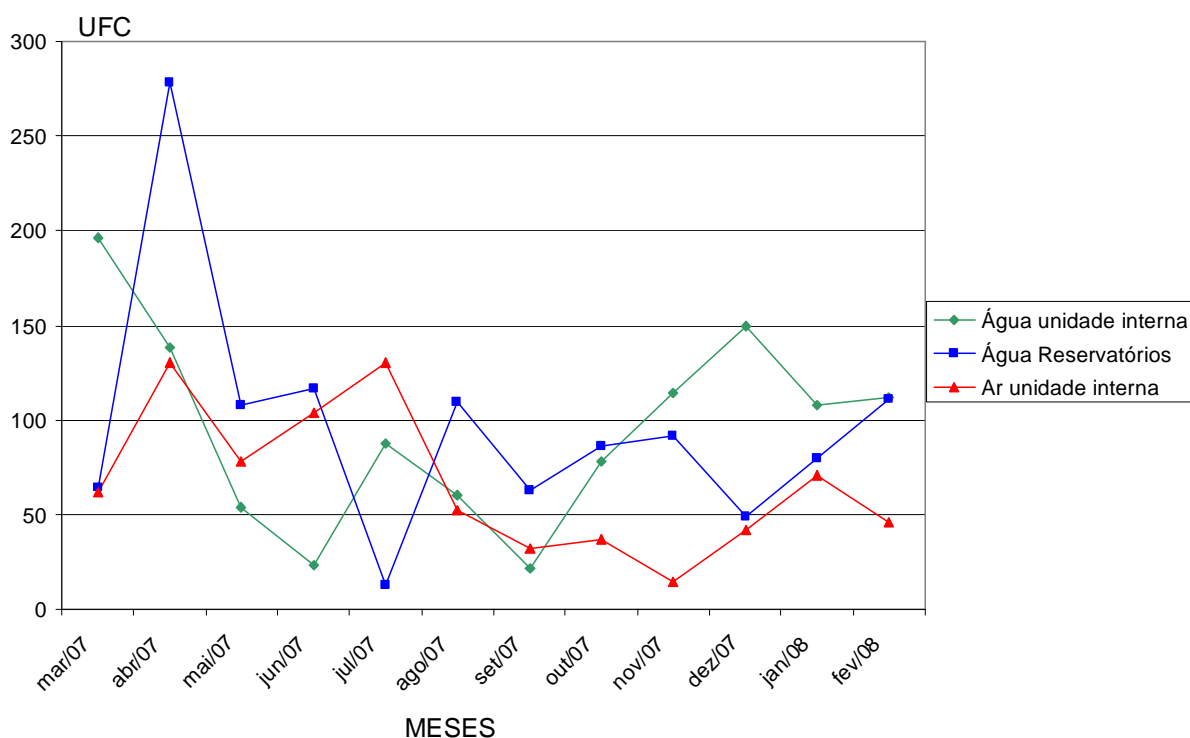


**Figura 19.** Correlação entre valores mensais de umidade relativa do ar (U) e unidades formadoras de colônias por metro cúbico (UFC/m<sup>3</sup>) obtidas em 12 meses de estudos na unidade externa (corredor, hall do elevador e área externa do hospital de pediatria oncológica)

#### 4.3 Comparação entre valores e espécies isoladas do ar e da água ao longo do estudo

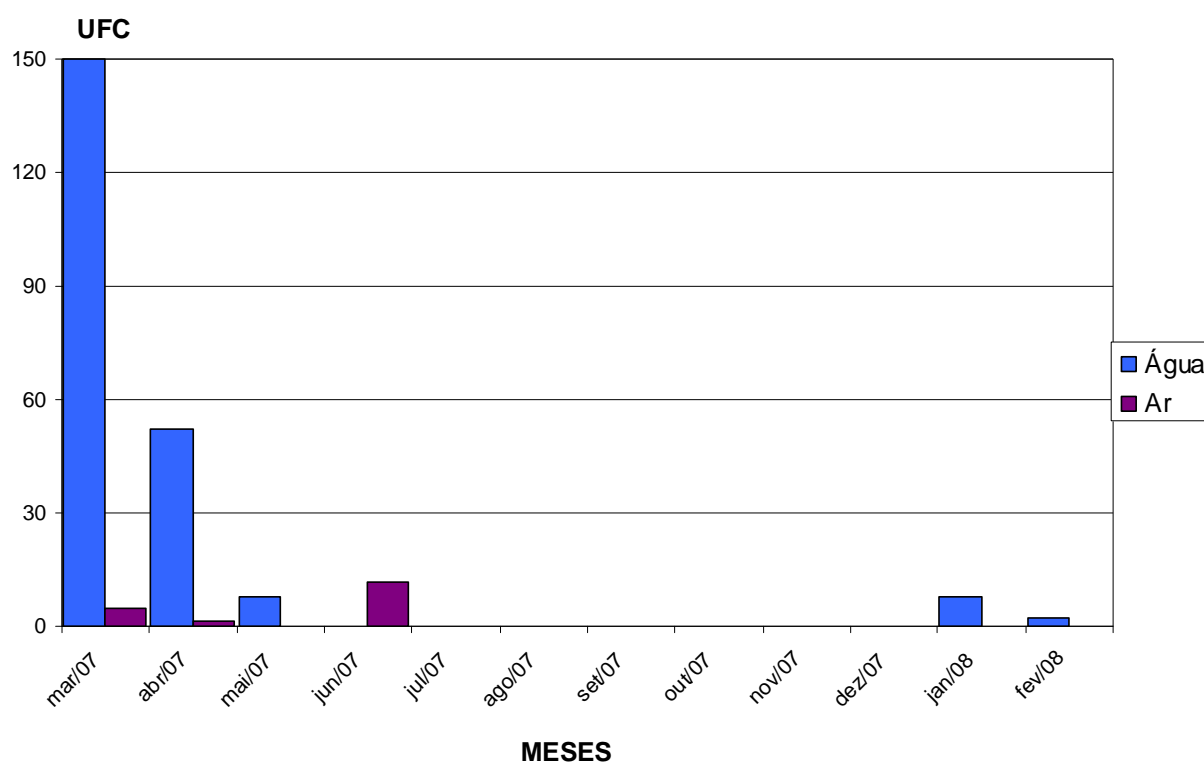
Ao longo do estudo foram isoladas em todas as coletas de água (14 pontos de coletas mensais) 2352 colônias de fungos filamentosos de 17 espécies distintas, e 4124 colônias de fungos filamentosos e leveduriformes obtidos em 12 meses de coletas de ar (11 pontos de coletas mensais) de 35 espécies diferentes. A média de propágulos isolados da água, na unidade interna que corresponde as torneiras de quartos, banheiros e corredor variou de 1,1 a 13,1 UFC/l, com média anual de 6,07 UFC/l por pontos de coleta. Nas coletas de ar na unidade (quartos e banheiros) que possuem filtros HEPA e pressão positiva, a média por ponto de coleta variou de 2,38 a 21,8 UFC/m<sup>3</sup>, com média anual por de 11,09 UFC/m<sup>3</sup> ponto de coleta.

Quando comparamos os resultados obtidos das coletas de ar na unidade de TCTH, da água da mesma unidade e da água dos reservatórios observamos que apenas no mês de abril de 2007, houve grande quantidade de propágulos fúngicos nos diferentes sítios. No geral, a quantidade de fungos isolados da água e do ar da unidade interna (quartos e banheiros) e dos reservatórios não demonstrou o mesmo padrão de variação ao longo dos 12 meses, como observamos na **Figura 20**, contudo na comparação entre UFC da água coletada na unidade interna e nos valores de UFC obtidos nas coletas de ar da mesma unidade, observamos queda de propágulos fungicos nos meses de maio, agosto e setembro de 2007, e picos de isolamento nos meses de abril, julho, e outubro de 2007.



**Figura 20.** Comparação entre propágulos fúngicos (UFC) isolados da água dos 4 reservatórios e da unidade interna (quartos e banheiros) e do ar da unidade interna de TCTH (quartos e banheiro) ao longo de 12 meses de estudo.

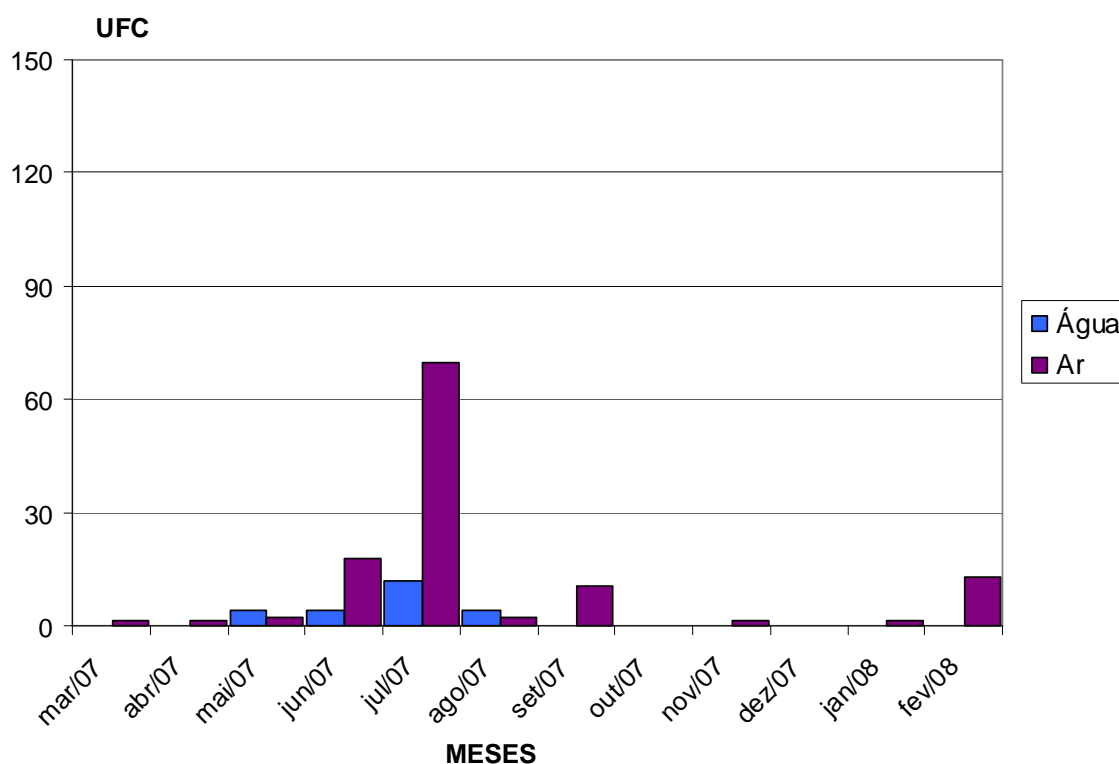
Avaliando os valores de UFC do gênero *Fusarium*, obtidos nas coletas de água e ar, da unidade de TCTH, evidenciamos que o isolamento foi mais frequente na água da unidade (total de UFC 220 em todo o estudo). No ar o total de UFC/m<sup>3</sup> foi de 17,8 em todo o monitoramento. Não observamos um padrão na variação dos 2 sítios (ar a água) nos 12 meses de estudo (**Figura 21**).



**Figura 21.** Comparação entre propágulos fúngicos (UFC) do gênero *Fusarium* isolados da água e do ar da unidade interna (quartos e banheiros) de TCTH ao longo de 12 meses de estudo.

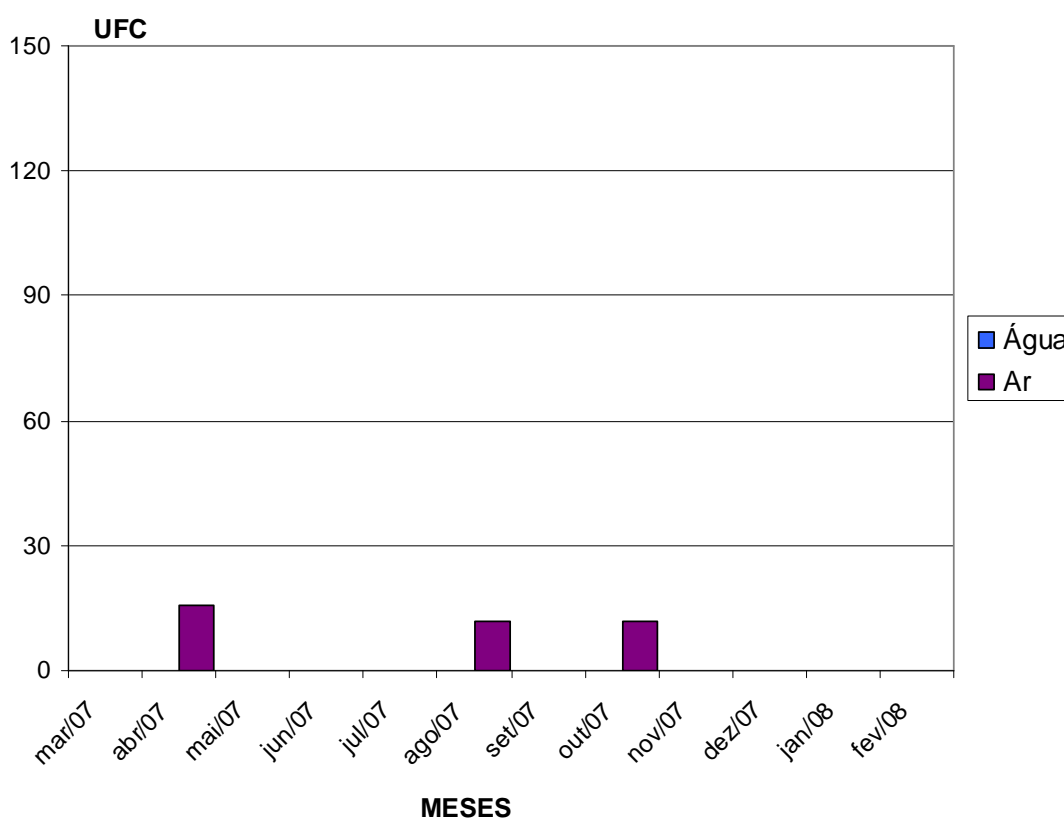
O gênero *Aspergillus* foi mais frequente no ar da unidade de TCTH, sendo isolado em 10 meses ao longo do monitoramento (não houve isolamento apenas nos meses de outubro e dezembro de 2007), com grande número de propágulos isolados

no mês de julho de 2007 (total de 69,9 UFC). No mesmo mês observamos também maior quantidade de propágulos de *Aspergillus* spp. na água das torneiras da unidade (total de 12 UFC no mês). A espécie mais frequente no ar e na água da unidade foi *Aspergillus flavus*. O total de UFC na unidade (quartos e banheiros) em 12 meses de estudo foi de 24, enquanto que no ar da mesma unidade e no mesmo período foi de 120,4 UFC (**Figura 22**).



**Figura 22.** Comparação entre propágulos fúngicos (UFC) do gênero *Aspergillus* isolados da água e do ar da unidade interna (quartos e banheiros) de TCTH ao longo de 12 meses de estudo.

Os Zigomicetos representados por *Rhizopus* spp. e *Mucor* spp. não foram isolados na água das torneiras da unidade (quartos e banheiros). No ar da mesma unidade houve isolamento de Zigomicetos em somente 3 meses: abril, agosto e outubro de 2007. O valor total máximo isolado na unidade (8 pontos) foi de 15,4 UFC (**Figura 23**).



**Figura 23.** Comparação entre propágulos fúngicos (UFC) de Zigomicetos isolados da água e do ar da unidade interna (quartos e banheiros) de TCTH ao longo de 12 meses de estudo.

Os Zigomicetos *Rhizopus* spp. e *Mucor* spp. foram mais frequentes da água dos reservatórios, se compararmos aos resultados obtidos nas coletas de água das torneiras e do ar dos quartos e banheiros da mesma unidade. A espécie *Fusarium solani* foi mais isolada da água do que no ar da unidade (216 UFC e 16,6 UFC total, respectivamente). Em comparação ao número de propágulos isolados dos reservatórios, os valores máximos obtidos por ponto de coleta Na unidade foram 5 vezes maiores do que dos reservatórios. Dentre as espécies de *Aspergillus* com poder patogênico para populações de risco, *A. flavus* foi mais frequente no ar da unidade e na água dos reservatórios. *A. fumigatus* não foi isolado na água em nenhuma das coletas ao longo de 12 meses de estudo (**Tabela 7**).

**Tabela 7.** Comparação de concentração de propágulos fungicos (apenas *Aspergillus* spp. *Fusarium* spp. e Zigomicetos) isolados nas coletas de água e ar na unidade de TCTH (quartos e banheiros) e água dos reservatórios no monitoramento de 12 meses.

Espécies	Água Reservatórios				Água Torneiras				Ar Quartos e Banheiros			
	UFC total*	Máximo	Média	Mínimo	UFC total*	Máximo	Média	Mínimo	UFC total*	Máximo	Médio	Mínimo
<i>Aspergillus flavus</i>	55	20	0,94	1	18	8	0,23	1	118,3	13	0,2	1,2
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	8,2	3,5	0,014	1,2
<i>Fusarium solani</i>	40	20	0,68	1	216	80	2,76	1	16,6	9,4	0,02	1,2
<i>Mucor</i> spp.	5	5	0,03	0	0	0	0	0	15,4	11,8	0,02	1,2
<i>Rhizopus</i> spp.	55	50	0,4	1	0	0	0	0	24,8	11,8	0,04	1,2

\* Este número reflete o total de colônias que cresceram em placas, ao longo de 12 meses, contemplando todas as amostras positivas para cada espécie nos referidos ambientes.



#### **4.4 Avaliação genotípica das amostras de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* e *Fusarium solani***

##### **4.4.1 Genotipagem por minissatélite e microsatélite**

Os fungos viáveis identificados fenotipicamente como *Fusarium solani*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus* foram analisados utilizando as técnicas moleculares: DNA genômico por PCR-*fingerprinting* utilizando os iniciadores M13 minissatélite e (GACA)<sub>4</sub>, (GTG)<sub>5</sub> e (GAC)<sub>5</sub> para microsatélites.

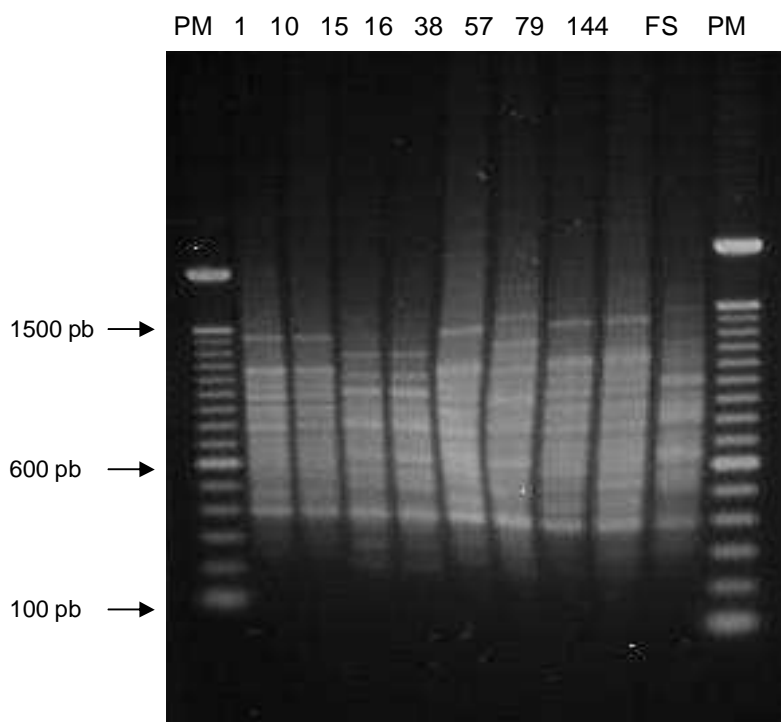
##### **4.4.2 Genotipagem das cepas de *Fusarium solani* isoladas do ar e da água na unidade pediátrica de transplante de células tronco hematopoiéticas**

Para a análise genotípica foram utilizados 8 isolados identificados fenotipicamente como *Fusarium solani* e a cepa controle *Fusarium solani* ATCC 62877 (Tabela 8).

**Tabela 8.** Isolados de *Fusarium solani* utilizados na análise genotípica

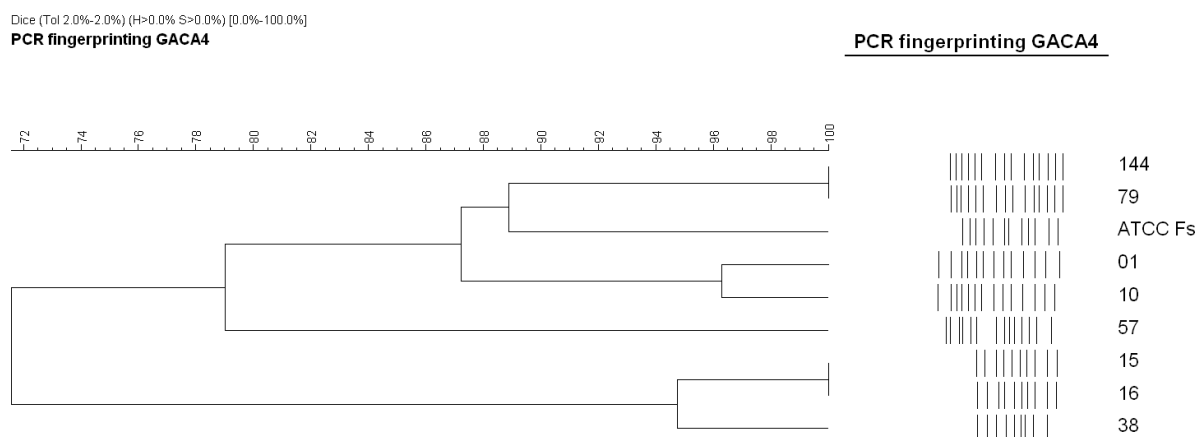
Número	Mês da Coleta	Ponto de coleta	Tipo de amostra
1	Março/2007	Quarto 2	Água
10	Março/2007	Quarto 3	Água
15	Março/2007	Quarto 2 mod. seca	Ar
16	Março/2007	Quarto 3 mod. Seca	Ar
38	Abril/2007	Quarto 4	Ar
57	Abril/2007	Reservatório 4	Água
79	Maiio/2007	Quarto 4	Água
144	Abril/2007	Quarto 4	Água

A **Figura 24** mostra o resultado do microssatélite com o iniciador (GTG)<sub>5</sub> da espécie em estudo. Nota-se que apesar de pequenas variações serem observadas entre os perfis de bandas, as de alta intensidade estavam presentes na maioria das amostras, o que permitiu a correta análise.

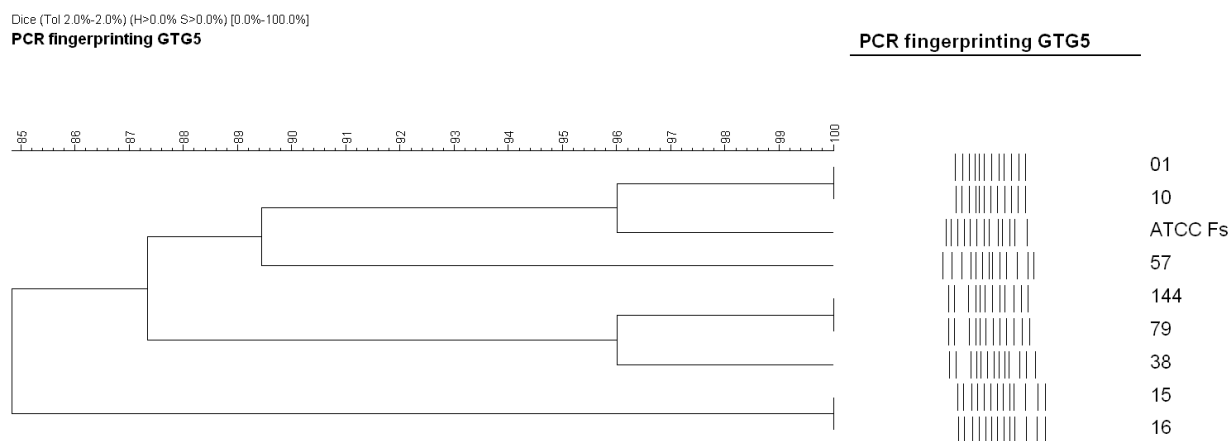


**Figura 24.** Gel de agarose exibindo padrões genotípicos de isolados de *F. solani* amplificados pela técnica microsatélite, com o iniciador  $(GTG)_5$ . Nas canaletas temos: PM (marcador molecular); cepas 1, 10, 15, 16, 38, 57, 79, 144 FS (ATCC *F. solani* 62877) e PM (marcador molecular).

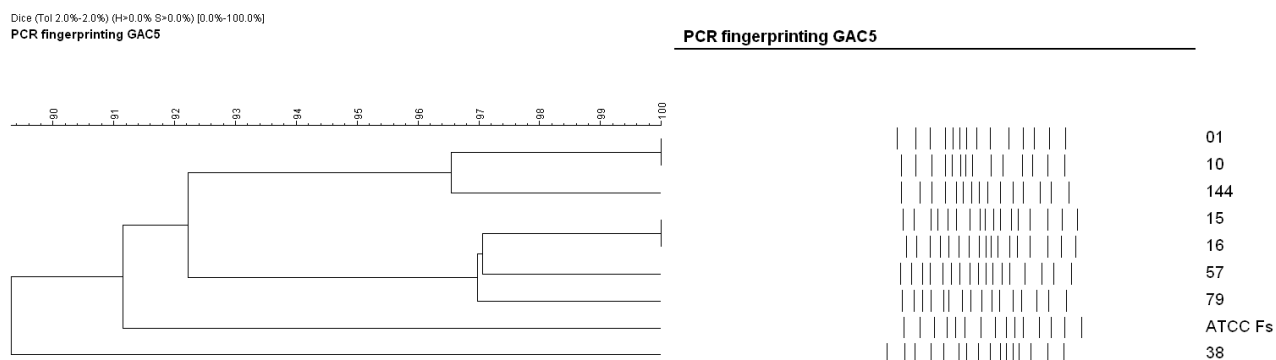
Com a análise de dendrograma gerado pela análise das bandas amplificadas utilizando o programa Gel Compar II, versão 4.5 Bionumerics foi possível sugerir que as cepas 144 e 79 correspondentes a duas amostras de água do quarto 4 apresentam um alto grau de similaridade; as cepas 01 e 10 que correspondem a uma amostra de água do quarto 2 e 3 respectivamente apresentam também um alto grau de similaridade; os isolados 15 e 16 que correspondem a uma amostra de ar do quarto 2 e quarto 3 respectivamente também apresentaram um alto grau de similaridade quando comparamos os perfis utilizando os 4 “primers” (**Figuras 25, 26, 27 e 28**).



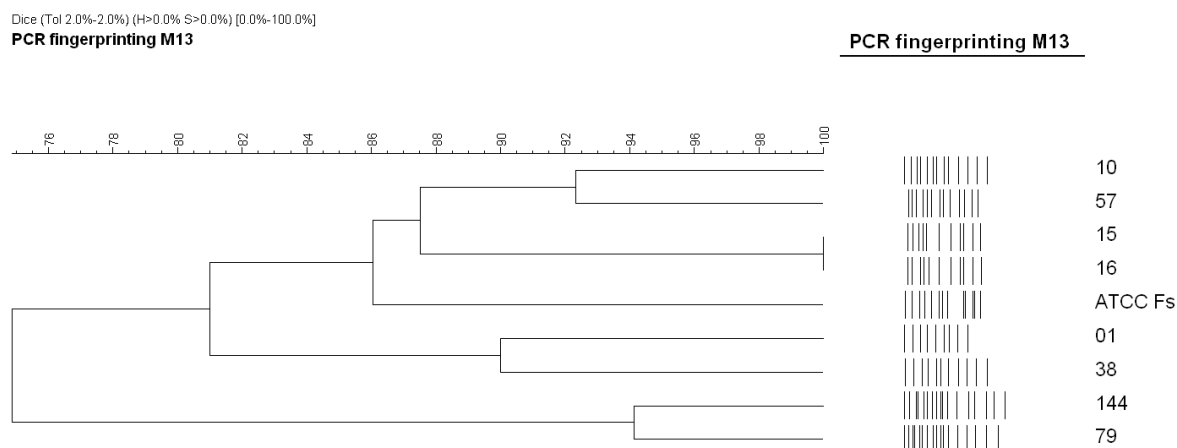
**Figura 25.** Dendrograma gerado pelo programa GelCompar II pelo método UPGMA referente aos padrões de bandas gerados por amplificação de cepas de *Fusarium solani* utilizando o “primer” (GACA)<sub>4</sub> de microssatélite.



**Figura 26.** Dendrograma gerado pelo programa GelCompar II pelo método UPGMA referente aos padrões de bandas gerados por amplificação de cepas de *Fusarium solani*, utilizando o “primer” (GTG)<sub>5</sub> de microssatélite.



**Figura 27.** Dendrograma gerado pelo programa GelCompar II pelo método UPGMA referente aos padrões de bandas gerados por amplificação de cepas de *Fusarium solani* utilizando o “primer” (GAC)<sub>5</sub> de microssatélite.



**Figura 28.** Dendrograma gerado pelo programa GelCompar II pelo método UPGMA referente aos padrões de bandas gerados por amplificação de cepas de *Fusarium solani* utilizando o “primer” M13 de minissatélite.

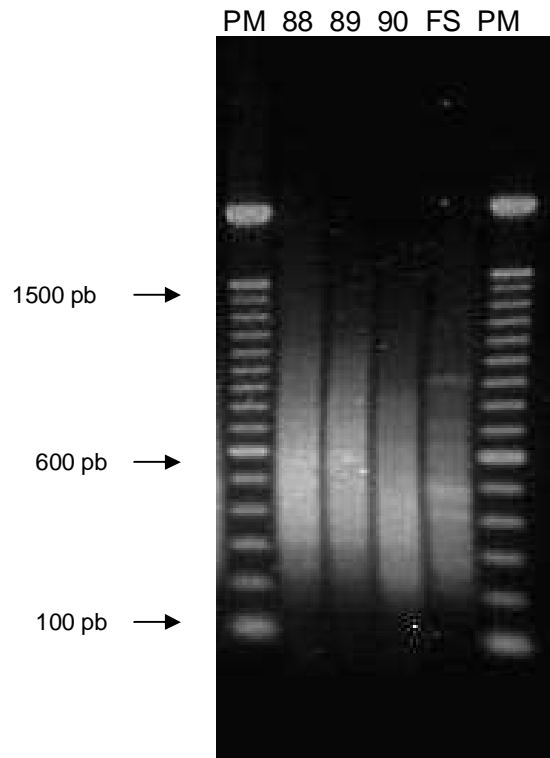
#### 4.4.3 Genotipagem das cepas de *Aspergillus fumigatus* isoladas do ar e da água na unidade pediátrica de transplante de células tronco hematopoiéticas

Para a análise genotípica foram utilizados apenas 3 isolados identificados fenotipicamente como *Aspergillus fumigatus* (Tabela 9) e a cepa controle *Fusarium solani* ATCC 62877. Como já descrito anteriormente *A. fumigatus* teve baixa frequência entre os isolados do ar e da água de todo o monitoramento.

**Tabela 9.** Isolados de *Aspergillus fumigatus* utilizados na análise genotípica

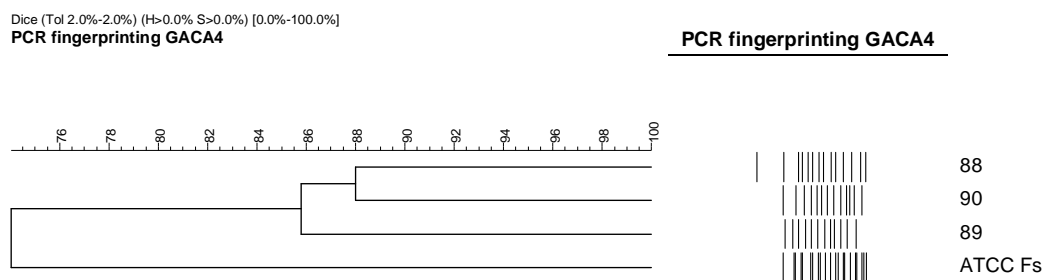
Número	Mês da Coleta	Ponto de coleta	Tipo de amostra	Espécie
88	Junho/2007	Banheiro 2 mod. umida	Ar	<i>Aspergillus fumigatus</i>
89	Junho/2007	Quarto 4	Ar	<i>Aspergillus fumigatus</i>
90	Junho/2007	Corredor	Ar	<i>Aspergillus fumigatus</i>

A **Figura 29** mostra o gel de agarose corado com brometo de etídio, resultado do microssatélite com o iniciador (GACA)<sub>4</sub> com isolados de *A. fumigatus*. Nota-se que apesar das variações serem observadas entre os perfis de bandas, o perfil de bandas da cepa controle (ATCC *F. solani*) diferem muito dos 3 isolados.

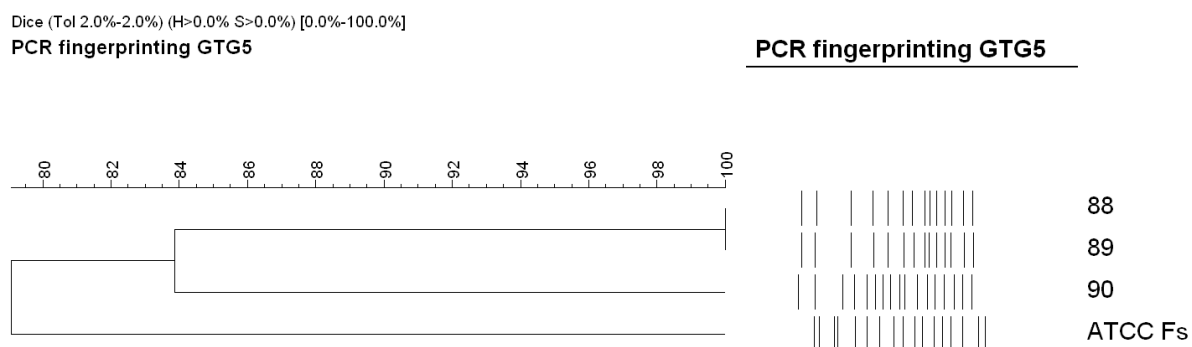


**Figura 29.** Gel de agarose exibindo padrões genotípicos de isolados de *Aspergillus fumigatus* amplificados pela técnica de microsatélite, com o iniciador (GACA)<sub>4</sub>. Nas canaletas temos: PM (marcador molecular); cepas 88, 89, 90, FS (ATCC *F. solani* 62877) e PM (marcador molecular).

Com a análise do dendrograma gerado pela análise das bandas amplificadas foi possível sugerir que as cepas 88 e 90 correspondem a duas amostras de ar do banheiro 2 (úmido) e quarto 4 apresentaram 100% de similaridade quando utilizados 3 “primers” (GTG)<sub>5</sub>, (GAC)<sub>5</sub> e M13 (**Figuras 31, 32 e 33**). Utilizando o “primer” (GACA)<sub>4</sub> a análise mostrou 86% de similaridade entre os isolados (**Figura 30**).



**Figura 30.** Dendrograma gerado pelo programa GelCompar II pelo método UPGMA referente aos padrões de bandas gerados por amplificação de cepas de *Aspergillus fumigatus*, utilizando o “primer” (GACA)<sub>4</sub> de microsssatélite.

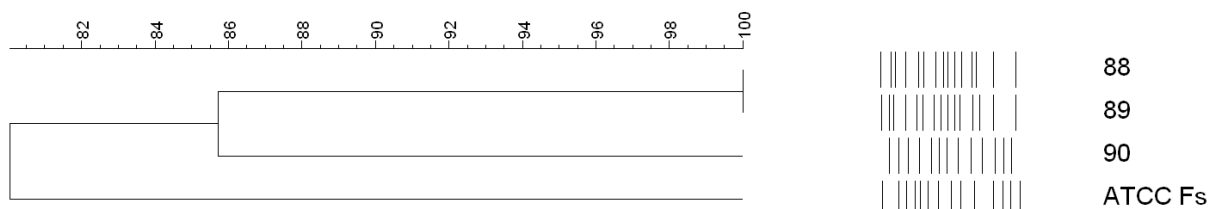


**Figura 31.** Dendrograma gerado pelo programa GelCompar II pelo método UPGMA referente aos padrões de bandas gerados por amplificação de cepas de *Aspergillus fumigatus* utilizando o “primer” (GTG)<sub>5</sub> de microsssatélite.



Dice (Tol 2.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
 PCR fingerprinting GAC5

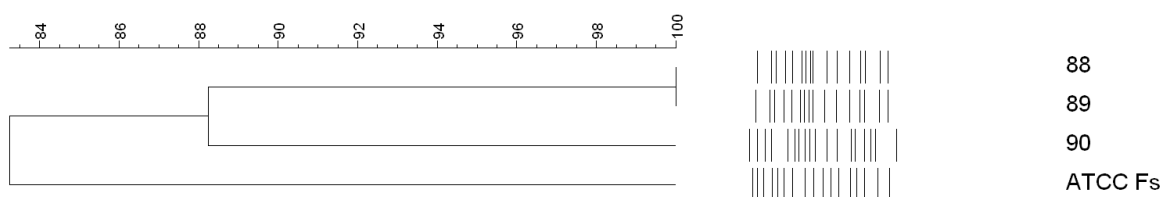
PCR fingerprinting GAC5



**Figura 32.** Dendrograma gerado pelo programa GelCompar II pelo método UPGMA referente aos padrões de bandas gerados por amplificação de cepas de *Aspergillus fumigatus* utilizando o “primer” (GAC)<sub>5</sub> de microsssatélite.

Dice (Tol 2.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
 PCR fingerprinting M13

PCR fingerprinting M13



**Figura 33.** Dendrograma gerado pelo programa GelCompar II pelo método UPGMA referente aos padrões de bandas gerados por amplificação de cepas de *Aspergillus fumigatus* utilizando o “primer” M13 de minissatélite.

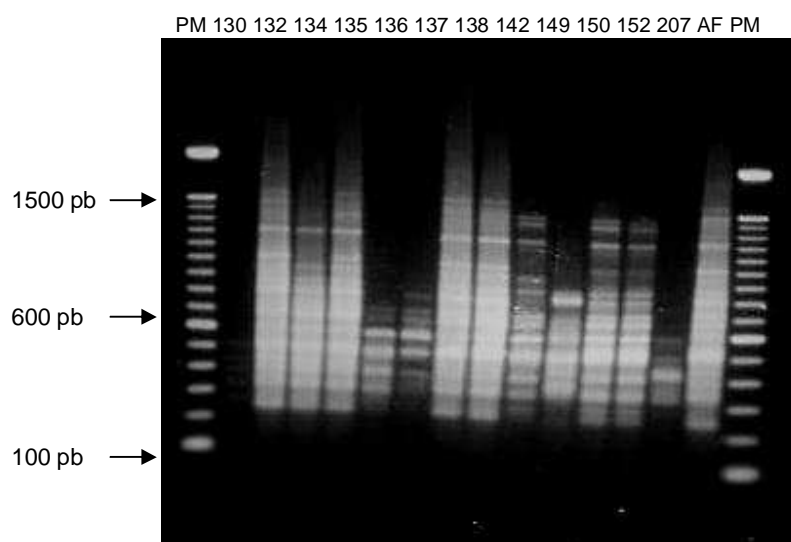
#### 4.4.4 Genotipagem de cepas de *Aspergillus flavus* isoladas do ar e da água na unidade pediátrica de transplante de células tronco hematopoiéticas.

Para a análise genotípica foram utilizados 24 isolados identificados fenotipicamente como *Aspergillus flavus* (Tabela 10) e a cepa controle *Aspergillus flavus* IMI 190443. *A. flavus* teve isolamento frequente se comparado a outras espécies do gênero *Aspergillus*, entre os isolados do ar e da água de todo o monitoramento.

**Tabela 10.** Isolados de *Aspergillus flavus* utilizados na análise genotípica

Número	Mês da Coleta	Ponto de coleta	Tipo de amostra
91	Junho/2007	Quarto 3	Ar
92	Junho/2007	Quarto 4	Ar
93	Junho/2007	Hall do elevador	Ar
95	Junho/2007	Quarto 1	Ar
106	Junho/2007	Banheiro 4 mod. úmida	Ar
107	Junho/2007	Reservatório 2	Água
111	Julho/2007	Quarto 1	Água
118	Julho/2007	Banheiro 2 mod. Úmida	Ar
119	Julho/2007	Banheiro 4 mod. seca	Ar
120	Julho/2007	Quarto 4	Ar
124	Julho/2007	Banheiro 4	Água
127	Julho/2007	Quarto 2	Ar
130	Julho/2007	Quarto 1	Ar
132	Julho/2007	Reservatório 2	Água
134	Julho/2007	Reservatório 3	Água
135	Julho/2007	Banheiro 3	Água
136	Julho/2007	Banheiro 4 mod. úmida	Ar
137	Julho/2007	Banheiro 2	Água
138	Julho/2007	Corredor	Água
142	Julho/2007	Quarto 3	Ar
149	Agosto/2007	Banheiro 2 mod. Úmida	Ar
150	Agosto/2007	Banheiro 2	Água
152	Agosto/2007	Quarto 2	Ar
207	Novembro/2007	Reservatório 3	Água

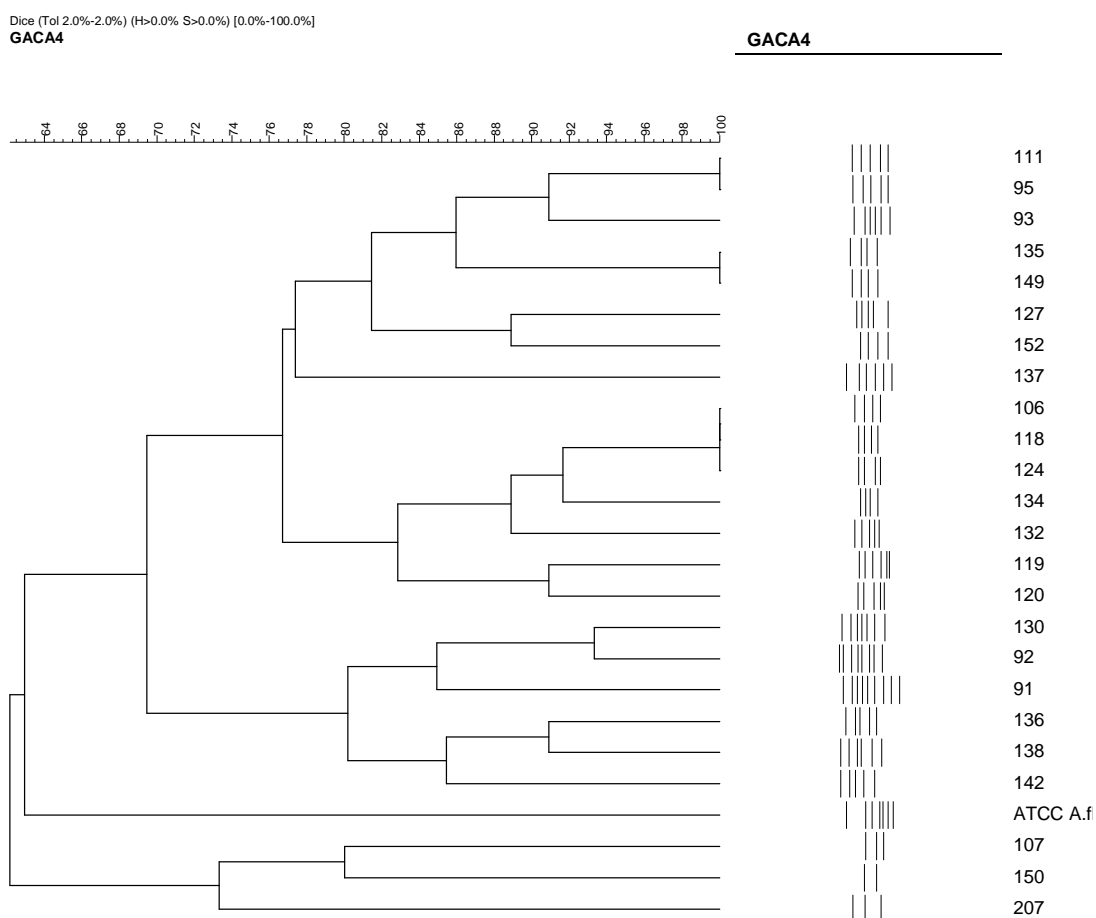
A **Figura 34** mostra o gel de agarose corado com brometo de etídio, resultado do microssatélite com o iniciador (GTG)<sub>5</sub> com isolados de *A. flavus*. Nota-se grandes variações dos perfis de bandas visualizadas.



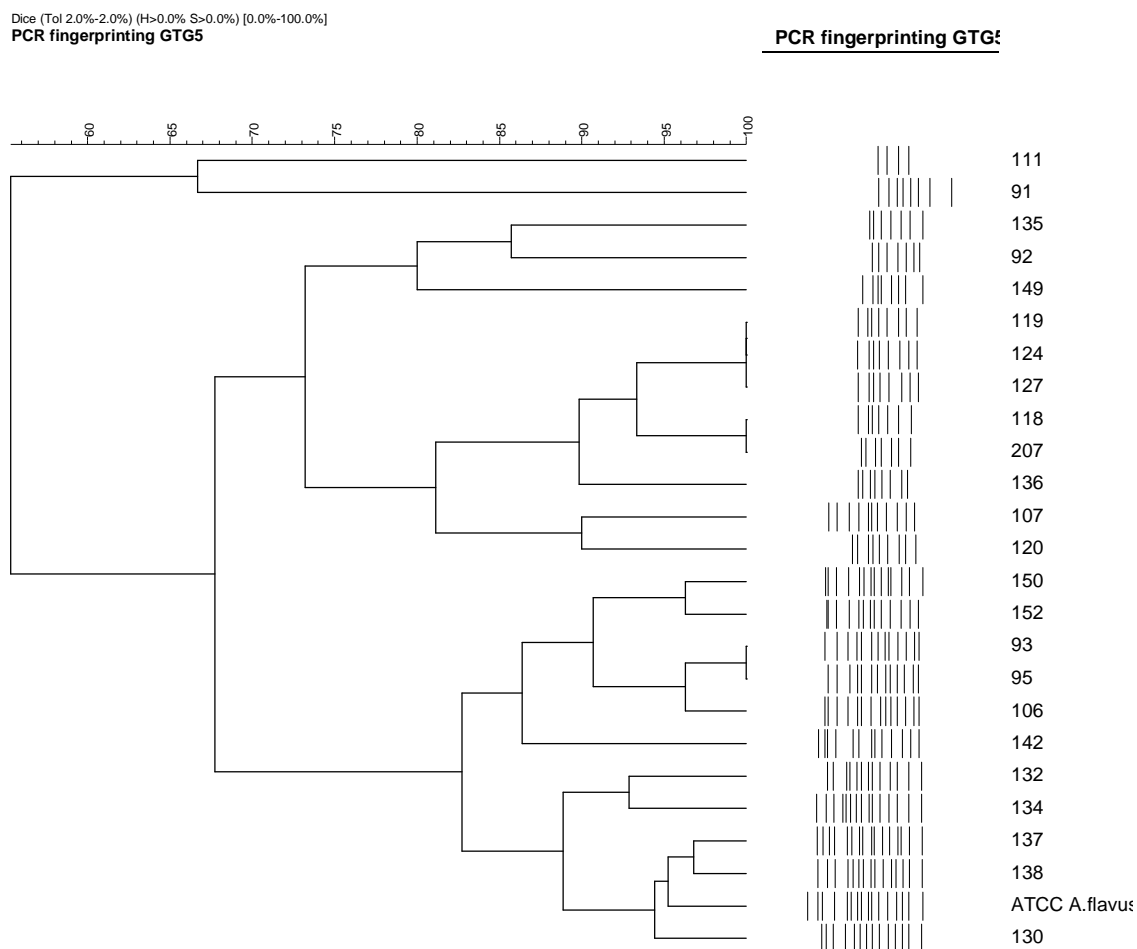
**Figura 34.** Gel de agarose exibindo padrões genotípicos de isolados de *Aspergillus flavus* amplificados pela técnica microssatélite, com o iniciador (GTG)<sub>5</sub>. Nas canaletas temos: PM (marcador molecular); cepas 130, 132 134 135 136 137 138 142 149 150 152 207, AF (ATCC *A. flavus* IMI 190443) e PM (marcador molecular).

Com a análise do dendrograma gerado pelo padrão de bandas amplificadas foi possível sugerir que as cepas 119 e 120 correspondentes a duas amostras de ar do quarto 4 apresentaram um alto grau de similaridade quando utilizados os “primers” (GACA)<sub>4</sub> e (GAC)<sub>5</sub>; as cepa 150 e 152 correspondentes a amostra de água do banheiro 2 e uma amostra de ar do quarto 4 respectivamente, apresentaram um alto grau de similaridade quando utilizados os “primers” M13 e (GTG)<sub>5</sub>. As cepas 95 e 106 correspondentes a duas amostras de ar do quarto 1 e banheiro 4 apresentaram um alto grau de similaridade quando utilizados os primers (GTG)<sub>5</sub> e (GAC)<sub>5</sub> (**Figuras 35, 36, 37 e**

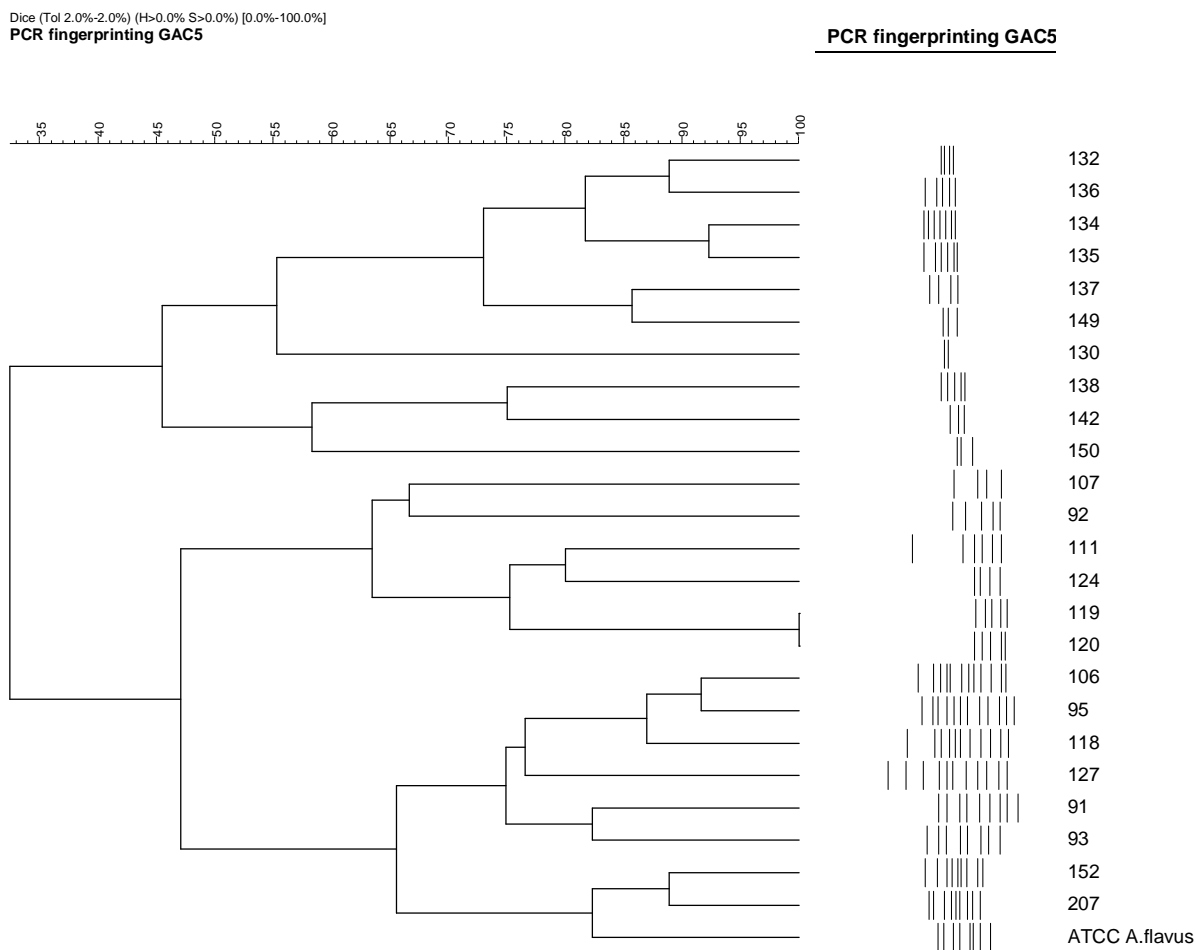
38). Para esta espécie os “primers” de minissatélite e microsatélite utilizados neste estudo mostraram grande diversidade genotípica das amostras isolados do ar e da água, o que demonstra da heterogeneidade da espécie, hoje considerada um grupo de espécies (Complexo Flavi) com características fenotípicas muito similares e muitas vezes indistinguíveis.



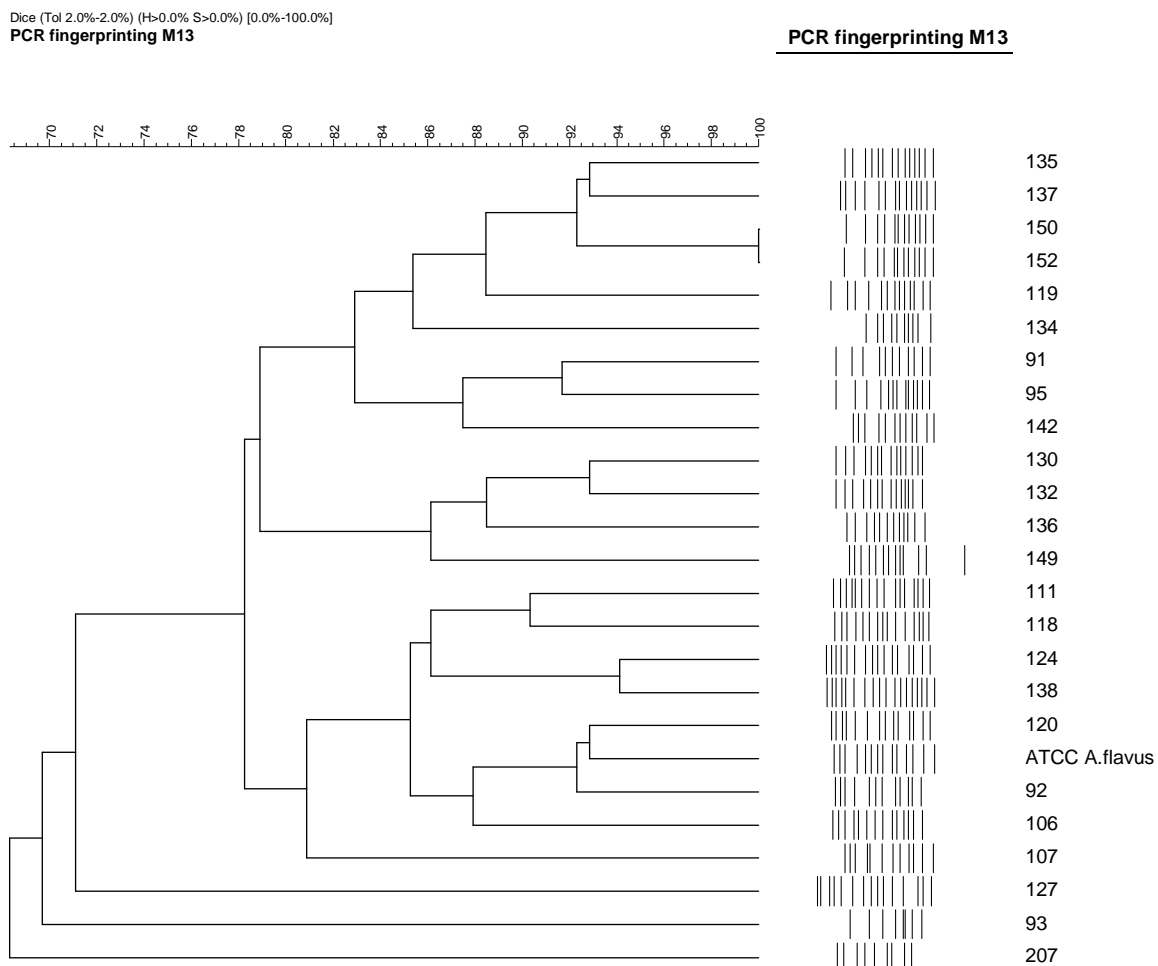
**Figura 35.** Dendrograma gerado pelo programa GelCompar II pelo método UPGMA referente aos padrões de bandas gerados por amplificação de cepas de *Aspergillus flavus* utilizando o “primer” (GACA)<sub>4</sub> de microsatélite.



**Figura 36.** Dendrograma gerado pelo programa GelCompar II pelo método UPGMA referente aos padrões de bandas gerados por amplificação de *Aspergillus flavus* utilizando o “primer” (GTG)<sub>5</sub> de microssatélite.



**Figura 37.** Dendrograma gerado pelo programa GelCompar II pelo método UPGMA referente aos padrões de bandas gerados por amplificação de cepas de *Aspergillus flavus* utilizando-se o “primer” (GAC)<sub>5</sub> de microssatélite.



**Figura 38.** Dendrograma gerado pelo programa GelCompar II pelo método UPGMA referente aos padrões de bandas gerados por amplificação de cepas de *Aspergillus flavus* utilizando o “primer” M13 de minissatélite.

## **5.0 DISCUSSÃO**

---



O aumento da incidência de doenças fúngicas invasivas (DFIs) em unidades oncohematológicas, principalmente por fungos filamentosos emergem como um fator de limitação na sobrevivência dos pacientes. De origem ambiental, os fungos filamentosos são facilmente dispersos, e sobrevivem em diferentes condições atmosféricas, representando assim um risco potencial para estes pacientes, particularmente *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., Zigomicetos e *Scedosporium* spp. Nas últimas duas décadas a terapia imunossupressora e o transplante de células tronco hematopoiéticas emergiram como condições de risco para o desenvolvimento de DFIs por fungos filamentosos (Marr *et al.*, 2002, Segal *et al.*, 2007, Pagano *et al.*, 2007, Haiduvan *et al.*, 2008, Bartley & Olmsted, 2008).

Para o estabelecimento de medidas preventivas eficazes, são necessários estudos para o claro entendimento de como as infecções fúngicas são adquiridas e qual a fonte ambiental de infecção. *Aspergillus* spp. é primordialmente disperso pelo ar e assim inalado pelo paciente. Numerosos surtos de aspergilose são descritos em unidades hematológicas em todo o mundo, principalmente em períodos de construção no ambiente hospitalar. Medidas como filtros HEPA, fluxo laminar e pressão positiva nos quartos reduzem substancialmente a quantidade de propágulos dispersos no ar, todavia não inibem totalmente propágulos fúngicos, e outras vias de disseminação como a água, onde evidenciadas em estudos de monitoramento como fontes potenciais de fungos e bactérias, poderiam assim ter função de disseminação para o ar através da aerossolização (Hayjeh & Warnock, 2001, Warris *et al.*, 2001, Warris & Verweij, 2005, Periroth *et al.*, 2007).

No passado, o isolamento de fungos na água foi pouco considerado quando eram discutidos e analisados microrganismos de veiculação hídrica e sua importância como agentes de doenças. Recentes estudos demonstraram a importância de reservatórios de água como fontes de infecção por fungos filamentosos (Nagy & Olson, 1983, Göttlich *et al.*, 2005, Hageskal *et al.*, 2006; Kanzler *et al.*, 2007).

No presente estudo nós constatamos que a água proveniente do sistema de distribuição que abastece o hospital, dos reservatórios e torneiras dos quartos e banheiros da unidade de TCTH constituem potenciais reservatórios de

fungos filamentosos patogênicos ao homem, ressaltando a presença de *Fusarium solani* e *Aspergillus flavus*.

Nossos resultados demonstraram maior isolamento de fungos no sistema hidráulico, nos meses de março e abril de 2007 e janeiro e fevereiro de 2008, que correspondem as estações outono e verão respectivamente. Estudos que realizaram monitoramento microbiológico da água por um período superior a 12 meses na Europa obtiveram resultados diferentes, quanto ao padrão de distribuição sazonal principalmente por haver diferenças nas condições atmosféricas continentais e mesmo regionais (Fisher *et al.*, 2007, Morris *et al.*, 2008). Vale mencionar que, dependendo da região avaliada há menor quantidade de chuvas, e períodos de seca. Da mesma forma, a presença de fontes ambientais naturais de fungos, como o padrão de vegetação, variam de acordo com os diferentes países e continentes.

Warris *et al.* (2001) num estudo conduzido numa unidade de TCTH, onde foi monitorado o perfil microbiológico da água de torneiras e chuveiros, e em paralelo monitorado pontos do sistema de distribuição da cidade de Oslo, Noruega, observaram maior isolamento de fungos nos meses correspondentes ao inverno. Gonçalves *et al.*, (2006), numa investigação conduzida em Portugal ao longo de 16 meses, também isolou maior quantidade de propágulos fúngicos no inverno. Panagopoulou *et al.* (2002), em um monitoramento da água de 3 distintos hospitais na Grécia, não observou nenhuma associação entre isolamento de fungos e variação sazonal. Variações geográficas sugerem haver mudança do padrão de distribuição e quantidade de espécies isoladas do ambiente.

Na análise estatística realizada no presente estudo, a temperatura da água foi o único parâmetro físico que foi estatisticamente significativa quando correlacionamos a maior quantidade de propágulos isolados em todos os pontos e a variação de temperatura da água coletada. Poucos estudos correlacionam parâmetros físico-químicos com quantidade de propágulos presente na água, sendo que o cloro residual livre o parâmetro isolado mais comumente analisado, por sua utilização no tratamento da água e controle de doenças de veiculação hídrica. Os valores de cloro residual livre não foram correlacionados com o aumento ou diminuição de propágulos fúngicos isolados ao longo de 12 meses de estudo. Este aspecto pode ter relação com

o fato de, ao longo do estudo, a variação cloro livre residual esteve entre 0,14 e 0,89 mg/ml, com média de 0,38 mg/ml, valor este dentro dos parâmetros estabelecidos pela Portaria 518 de 2004 do Ministério da Saúde, que estabelece o padrão de potabilidade da água para consumo humano.

Outra probabilidade para explicar a ausência de correlação significativa, pode ser representado pelo menor impacto do cloro livre residual sobre o crescimento de fungos, quando comparados a sua ação sobre enterobactérias. Nagy & Olson (1983) num estudo conduzido na Califórnia, USA, monitorou a água do sistema de distribuição municipal, e concluiu que o tratamento da água potável com cloro não inibe a ocorrência de fungos, o contrário do que ocorre com enterobactérias. Rosenzweig *et al.*, (1983) também demonstrou que conídios de fungos filamentosos são mais resistentes ao tratamento com cloro, seguido de blastoconídios de leveduras e enterobactérias.

O isolamento de fungos demáceos, principalmente *Cladosporium* spp. foi frequente em todo o monitoramento, estando presente em todos os meses de coleta. Dentre os fungos hialinos os gêneros prevalentes incluíram *Penicillium* spp. e *Paecilomyces lilacinus*, considerando a água do cavalete, reservatórios e torneiras dos quartos e banheiros da unidade. Nossos resultados estão de acordo com dados europeus e norte americanos, onde estudos de monitoramento da água observaram também grande frequência de isolamento *Cladosporium* spp. e *Penicillium* spp., o que sugere distribuição mundial destes agentes em reservatórios de água (Arvantidou *et al.*, 1999, Gonçalves *et al.*, 2006; Hageskal *et al.*, 2006, Kanzler *et al.*, 2007, Varo *et al.*, 2007, Kauffmann-Lacróix *et al.*, 2009).

Ao contrário de investigações européias e norte americana, que realizaram monitoramento da água de reservatórios, torneiras e chuveiros de hospitais (Arvantidou *et al.*, 1999, Arvantidou *et al.*, 2000, Panagopoulou *et al.*, 2002, Anaissie *et al.*, 2003), espécies de *Aspergillus* foram pouco frequentes em isolamentos de fungos da água, sendo *A. flavus* e *A. niger* as espécies mais isoladas, e *A. fumigatus* ausente em todo o monitoramento. Vale ressaltar que a contagem de propágulos fúngicos infectantes nos reservatórios foi maior em comparação ao isolamento na água das torneiras. Aparentemente, estes fungos não apresentaram adaptação ao sistema

hidráulico, com formação de biofilme e ampliação de seu inóculo ao longo da tubulação.

Dentre os fungos com potencial patogênico para população de risco, *Fusarium* spp. teve elevado isolamento na água das torneiras (quartos e banheiros) da unidade, com menor frequência nos reservatório e nenhum isolamento na água do cavalete. Anaissie *et al.* (2001) documentou num estudo realizado durante 10 anos, num hospital no Texas, USA, que *Fusarium* spp. colonizava o sistema hidráulico do hospital, e que propágulos eram constantemente aerossolizados no ar dos banheiros durante o banho dos pacientes. A maior ocorrência de *Fusarium* na água de torneiras em comparação ao seu isolamento na água dos reservatórios, pode sugerir que este agente seja muito eficaz na formação de biofilme, ampliando seu inóculo ao longo do sistema hidráulico, aspecto que justificaria sua maior concentração ao longo do sistema.

Dogget (2000) caracterizou o biofilme formado no sistema de distribuição municipal de água na cidade de Springfield (USA), por microscopia eletrônica. Esporos e fragmentos hifas de fungos, além de outros microrganismos foram observados aderidos na matriz do biofilme, conferindo assim resistência ao tratamento de água, e liberação constante de fungos na água, incluindo propágulos *Aspergillus* spp. e *Cladosporium* spp. e *Penicillium* spp. No entanto, dois estudos relataram a abundância de *Fusarium* spp. em biofilme misto em duas situações diferentes: uma no sistema de distribuição de um centro de hemodiálise e outra em tanques de água utilizados em tanques industriais, evidenciando assim o potencial deste agente na formação de biofilme e constante liberação de propágulos na água (Elvers *et al.*, 1998, Pires-Gonçalves *et al.*, 2008).

No caso dos Zigomicetos, *Rizopus* spp. e *Mucor* spp. foram apenas isolados na água dos reservatórios não sendo encontrados nas torneiras ao longo do monitoramento. Estes dados sugerem assim que o sistema hidráulico representa uma barreira a sobrevivência destes fungos na água, e conseqüentemente menor poder de aerossolização e esporos no ambiente nosocomial.

Outros estudos que coletaram água de torneiras e chuveiros, a ocorrência de Zigomicetos foi baixa ou ausente (Arvantidou *et al.*, 1999, Arvantidou *et al.*, 2000, Warris *et al.*, 2001). Gonçalves *et al.* (2006) num estudo conduzido em Portugal, analisou a qualidade da água de torneiras de vários pontos na Universidade de Braga, onde em 16 meses houve isolamento de zigomicetos em apenas um mês. Por outro lado, em reservatórios e análise de biofilme de sistema de distribuição de água, o isolamento de *Rhizopus* foi reportado (Dogget, 2000, Anaissie *et al.*, 2003). O fato de estes agentes terem menor frequência de isolamento na água, pode justificar sua presença na formação de biofilme, com pouca sobrevivência de suas hifas ao longo do sistema hidráulico, uma vez que são naturalmente menos resistentes devido a largura e pouca presença de quitina na parede, isso quando comparados aos Ascomicetos (De Hoog *et al.*, 2000).

O monitoramento do ar na unidade hematológica equipada com filtros HEPA ao longo dos 12 meses de estudo, teve média de propágulos fúngicos com variação de 2,38 a 21,8 UFC/m<sup>3</sup>, sendo o valor médio de propágulos em 12 meses de estudo 11,09 UFC/m<sup>3</sup> com maior frequência nos meses de abril, maio, junho e julho de 2007, que correspondem ao outono e início de inverno. Nestes meses de elevada concentração de fungos no ar da unidade, não observamos nenhum evento que justificasse estes valores, como por exemplo, reformas. As reformas são descritas como períodos onde há aumento de propágulos no ar, mesmo em unidade que adotam medidas preventivas como filtros HEPA, pressão positiva nos quartos e sistema de fluxo laminar (Cornet *et al.*, 1999, Cooper *et al.*, 2003, Araújo *et al.*, 2008). A correta manutenção dos filtros HEPA é necessária para que sua eficiência no controle ambiental seja garantida. Recomenda-se que o sistema de filtros esteja realizando no mínimo 12 trocas de ar por hora para o ótimo funcionamento em unidades de TCTH (Dykewicz, 2001, Humphreys, 2004). O controle da pressão positiva é fundamental para evitar a propagação de conídios da área externa para os quartos. Ao longo do estudo, não monitoramos a eficiência da pressão positiva, e sendo assim não podemos comentar qualquer resultado técnico com variação de propágulos nos quartos com filtros HEPA.

Apesar deste aumento de propágulos no ar no período descrito, nenhum caso de IFI foi relatado na unidade, que adota medidas como a utilização de pressão positiva e filtros HEPA nos quartos, além da remoção dos chuveiros, para evitar uma possível aerossolização de propágulos fúngicos nos banheiros representando assim um risco a mais para os pacientes submetidos a TCTH.

O padrão sazonal de distribuição de fungos é descritos em estudos de monitoramento de ar. Observamos no monitoramento ambiental da unidade pediátrica, maior ocorrência de propágulos fúngicos no outono.

Em outras investigações o padrão sazonal de ocorrência de fungos no ar também foi avaliado. Anaissie *et al.* (2003) num estudo conduzido no Texas (USA) isolou maior quantidade de propágulos no ar de ambiente nosocomial durante o outono (21 UFC/m<sup>3</sup>) e menor quantidade de propágulos durante a primavera (7.1 UFC/m<sup>3</sup>). Na europa Panagopoulou *et al.* (2002) também isolou maior quantidade de propágulos em períodos que correspondem ao verão e outono, com variação de 0.6-37 UFC/m<sup>3</sup>. Em outro estudo de monitoramento microbiológico do ar, conduzido em um hospital terciário, Panagopoulou *et al.* (2007), também observou maior quantidade de propágulos durante o verão e o outono, com variação de propágulos isolados nestes períodos de 8 a 56 UFC/m<sup>3</sup>. Sautour *et al.* (2009), avaliou a distribuição sazonal de fungos isolados no ar em duas unidades hematológicas de hospitais na França. O estudo observou variação de propágulos no ambiente interno da unidade, com elevação durante o verão e outono. Estes estudos sugerem que, as estações outono e verão são períodos de maior concentração de propágulos no ar.

No nosso estudo, em paralelo as coletas de ar, em cada ponto foi medido a temperatura e umidade relativa do ar. A análise estatística não correlacionou estes valores com o aumento ou diminuições de propágulos isolados. A ausência de correlação de temperatura e umidade relativa do ar com a ocorrência de propágulos, era esperada na unidade com filtro HEPA, visto que nestes ambientes há o controle de temperatura pelo uso concomitante de ar condicionado que mantém o ambiente com pouca variação de temperatura. Ao longo de estudo houve pequena variação de temperatura (21,37 - 24,57 °C) e maior variação observada nos valores de umidade relativa do ar (53,45 - 67,24 %).

No ambiente externo grande quantidade de propágulos foram isolados no ar, como era esperado, sendo que picos de isolamento ocorreram nos meses de março e abril de 2007.

Recentemente, uma atenção maior tem sido dada a micobiota em ambientes externos por representar fonte de patologias em plantas, animais e humanos. Os fungos são importantes agentes de alergias, além de estarem relacionados à Síndrome do Edifício Doente em patologias ligadas a atividades ocupacionais. A mudança nos parâmetros atmosféricos, ocorrência de eventos como chuvas e furacões alteram sensivelmente a composição atmosférica, podendo aumentar a quantidade de fungos no ar de residências e hospitais (Guinea *et al.*, 2006, Albrecht *et al.*, 2007, Pyrri & Gotsi, 2007, Rao *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2007, Gorman & Fuller, 2008, Kasprzyk, 2008, Morris *et al.*, 2008, Srikanth *et al.*, 2008).

Ao contrário do ambiente interno, a análise estatística correlacionou a temperatura ambiental, que variou de 21,75 a 25,28 °C, com maior quantidade de fungos isolados nas áreas externa a unidade. A interferência de chuvas, velocidade do vento e presença de árvores de arbustos nas áreas externas, principalmente a área externa do hospital, promove a dispersão de conídios, diferentemente do que ocorre no ambiente interno, onde há controle de temperatura, além de não ser influenciada pela velocidade do vento, onde há isolamento nas janelas (Peternel *et al.*, 2004, Gomes *et al.*, 2006, Fischer *et al.*, 2007).

No ar dos ambientes interno e externo da unidade de TCTH houve predomínio dos gêneros *Cladosporium* e *Penicillium*, que em todos os meses foram isolados. *Cladosporium* spp. é um agente pouco freqüente em IFI em unidades de risco, contudo considerado um importante agente em processos respiratórios alérgicos (Peternel *et al.*, 2004, Gomes *et al.*, 2006, Gorman & Fuller, 2008). Em ordem de frequência (UFC/m<sup>3</sup>), após *Cladosporium* spp. (36%) e *Penicillium* spp. (27,54), seguem *Mycelia sterilia* (17%), *Aspergillus flavus* (3,4%) e *Paecilomyces lilacinus* (3,14%).

*Penicillium* spp. (exceto *P. marneffe*) emerge como um patógeno oportunista na última década, apesar da baixa frequência em IFIs (Lyratzopoulos *et al.*, 2002). Recentemente Araújo *et al.* (2008a) propôs que *Penicillium* spp. seja considerado como um indicador geral de níveis de fungos no ambiente interno do hospital S. João em Portugal, onde realizou monitoramento ambiental, e observou grande frequência do agente no ar.

No nosso estudo, entre os isolados de *Aspergillus*, houve prevalência foi de *A. flavus* seguida de *A. niger* e *A. fumigatus*, diferente do que é descrito em monitoramentos de ar em ambientes nosocomiais norte-americanos e europeus. Na maioria dos estudos, parece haver prevalência de isolamentos de *A. fumigatus* e não *A. flavus*. (Cornet *et al.*, 1999, Rainer *et al.*, 2000, Anaissie *et al.*, 2002, Pardelli *et al.*, 2006, Falvey & Streifel, 2007, Pini *et al.*, 2007).

Entretanto, diferenças geográficas podem ser observadas na distribuição e prevalência de *Aspergillus* spp. no ar. Panagopoulou *et al.* (2002) monitorou o ar em 3 diferentes hospitais na Grécia. Neste estudo, a espécie prevalente foi *A. niger*, seguida de *A. flavus* e *A. fumigatus*. Curtis *et al.*, (2004) numa investigação do ar de um hospital terciário de TCTH em Chicago (USA), durante período de reforma, isolou maior quantidade de propágulos de *A. niger*, seguido de *A. candidus*, *A. flavus* e *A. fumigatus*. Em outro estudo conduzido na Grécia, o predomínio foi de *A. niger* seguido de *A. flavus* no ar de unidades de um hospital terciário, ao longo de 12 meses (Panagopoulou *et al.*, 2007).

Em relação à quantidade de propágulos isolados de *Fusarium* spp., na área externa da unidade observamos menor quantidade em relação aos valores obtidos nas coletas de ar nos quartos e banheiros. Menos frequente em IFIs, *Fusarium* spp., principalmente *F. solani*, é um importante patógeno emergente, frequentemente isolado no ar e na água em estudos ambientais e epidemiológicos na investigação de surtos (Anaissie *et al.*, 2001, Raad *et al.*, 2002). Estes dados sugerem que a fonte de propágulos infectantes deste patógeno pode ser os reservatórios de água, uma vez que esta espécie foi isolada na água das torneiras dos quartos e banheiros em grande quantidade.



No Brasil, 2 estudos relataram a presença de *Fusarium* no ar em distintos hospitais. Távora *et al.* (2003), num estudo conduzido na cidade de São Paulo, em 3 unidades de transplantes (hepático, renal e TCTH), equipadas com filtros HEPA, monitorou a qualidade do ar com 2 amostradores diferentes (Andersen 6 estágios e RCS portátil). A média de propágulos isolados na unidade de TCTH foi de 12UFC/m<sup>3</sup>, e *Fusarium* spp. o quarto agente mais frequente.

Martins-Diniz *et al.* (2005), com intuito de caracterizar os fungos anemófilos e leveduras de uma unidade hospitalar na cidade de Araraquara (São Paulo), que não utiliza filtros HEPA, realizou coletas de ar com o amostrador Andersen 1 estágio. Neste estudo *Fusarium* spp. foi o segundo agente mais freqüente no ar, inclusive no período pré-reforma, principalmente nas UTIs do hospital.

Quando comparamos os resultados obtidos nas coletas de ar e de água na unidade observamos maior diversidade de espécies nos isolamentos do ar (36 espécies quando comparadas com aos isolados da água, 17 espécies). Apesar da variação de propágulos não apresentar ao mesmo padrão de variação nos diferentes sítios de coleta (água das torneiras, ar da unidade e água dos reservatórios), ao longo dos 12 meses, observamos picos e quedas de propágulos isolados no ar e água coletados na unidade em todos os pontos de coleta.

Anaissie *et al.* (2001) documentou a aerossolização de propágulos de *Fusarium* spp. num estudo de monitoramento de ar e água. No presente estudo, *F. solani* foi isolado em grande quantidade na água das torneiras da unidade dos quartos e banheiros, sendo este valor superior aos valores obtidos nas coletas dos reservatórios, quando analisamos a quantidade total de UFC isoladas, o valor máximo por ponto de coleta e o valor médio do agente, o que sugere uma possível colonização deste agente no sistema hidráulico do hospital.

*Aspergillus* spp. teve maior isolamento no ar da unidade, quando comparado aos valores obtidos nas coletas de ar com os valores obtidos nas coletas de água da unidade, não observamos o mesmo padrão de ocorrência (picos e quedas de isolamento), não parecendo ser a água um reservatório significativo na composição deste agente no ar. Assim como ocorre com outros agentes, o ambiente externo pode

ser um fator que influencia a concentração de fungos em ambientes internos, sobretudo *Aspergillus*. Diferente do que ocorreu com a maioria das espécies, *A. fumigatus* só foi isolado do ar da unidade, não ocorrendo em nenhuma das 106 coletas de água realizadas nas torneiras. Neste caso sugerimos a principal fonte de conídios o ambiente externo, que é descrito constantemente como principal fonte de propágulos (Vackova *et al.*, 2006, Araújo *et al.*, 2008b, Falvey & Streifel 2008).

Agentes emergentes em IFIs em unidades hematológicas, os Zigomicetos, representados neste estudo pelos gêneros *Rhizopus* e *Mucor* foram isolados do ar da unidade, representando 1,5% do total de propágulos em 12 meses. Na área externa, o isolamento representou 2,47%. O fato do não isolamento nas torneiras da unidade a despeito do seu isolamento na água dos reservatórios sugere que apesar da presença na água, o sistema hidráulico pode oferecer uma barreira a disseminação de propágulos destes agentes. Da mesma forma que com *A. fumigatus*, nossos dados sugerem que o perfil micológico do ar externo é o principal determinante na concentração de Zigomicetos no ar da unidade, sendo a água um reservatório com pouca importância.

O isolamento de leveduras do ar da unidade representou 0,79% de todos os isolados. As espécies isoladas são reconhecidamente de origem ambiental (*C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *Rhodotorula* spp. e *Trichosporon* spp.), e isoladas em estudos investigativos em superfícies inanimadas e profissionais de saúde (Martins-Diniz *et al.*, 2005). No presente estudo, constatamos a presença de esporos leveduriformes dispersos no ar, o que nos leva a pensar esta via como uma das formas de contaminação em hospitais.

No Brasil a portaria 518 de 2004 do Ministério da Saúde estabelece o padrão da qualidade da água para o consumo humano, definindo também a quantidade mínima e a frequência de amostra de água para a análise microbiológica e físico-química. No entanto, a portaria não estabelece parâmetros para a quantidade de fungos isolados da água potável, não sendo possível utilizar esta portaria como referência para estabelecer qualquer juízo de valor sobre os resultados obtidos neste estudo.

Em relação aos resultados obtidos no monitoramento de ar na unidade de TCTH, a resolução número 9 de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), dispõe sobre a qualidade do ar interior em ambientes climatizados artificialmente e de uso público e coletivo, estabelece que o valor máximo de fungos no ar não deve ultrapassar a 750 UFC/m<sup>3</sup>, valor este obtido através de coleta de ar com amostrador de ar por impactação de 1 a 6 estágios. Nossos resultados assim estão de acordo com o preconizado por esta resolução, uma vez que os valores obtidos no presente estudo na unidade de TCTH, não ultrapassaram 21,8 UFC/m<sup>3</sup> (2,38 a 21,8 UFC/m<sup>3</sup>) por ponto de coleta, utilizando o mesmo amostrador descrito na portaria como o indicado em monitoramento de ar em ambientes internos. Entretanto, salientando que a portaria não relata valores máximos de propágulos fungicos em unidades com filtros HEPA. A consulta pública nº 109 de 2003 (ANVISA), não publicada até a presente data, dispõe sobre a qualidade do ar ambiental interior em serviços de saúde, estipula que em ambientes críticos com filtros HEPA, a concentração de propágulos no ar não deve ultrapassar 50 UFC/m<sup>3</sup>. O Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings (Siegel *et al*, 2007) não estabelece valores de UFC/m<sup>3</sup> em unidades oncohematológicas, se limitando a recomendações a respeito de medidas preventivas (filtro HEPA com 12 trocas de ar por hora, fluxo laminar, medidas de higiene de superfícies e medidas de contato).

Um dos objetivos da presente investigação era correlacionar os isolados de *F. solani*, *A. fumigatus* e *A. flavus* provenientes da água, do ar e de possíveis amostras clínicas na unidade de TCTH. Durante o monitoramento não houve relato de nenhum caso de infecção fúngica ocasionada por fungos filamentosos, sendo que a análise de genotipagem restringiu-se a culturas ambientais.

Para a correlação entre cepas de ar e água descritos anteriormente, utilizamos a técnica molecular de minissatélite e microssatélite, que é aplicada na solução de problemas epidemiológicos, investigações de surtos, e na determinação de fontes nosocomiais de infecção, pela alta reprodutibilidade, baixo custo e aumento do poder discriminatório com a análise do perfil de bandas gerado com a utilização de softwares específicos. Os “primers” escolhidos de minissatélite e microssatélite são utilizados em genotipagem de diversas espécies de fungos como *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cereviae* e *Fusarium solani* (Meyer *et al.*,

1993, Couto *et al.*, 1996, Castellá *et al.*, 1999, Bartie *et al.*, 2001, Brasileiro *et al.*, 2004, Trilles *et al.*, 2008).

Na análise dos isolados identificados fenotipicamente como *F. solani*, utilizando 3 iniciadores de microssatélite e 1 de minissatélite, observamos que a similaridade esteve entre 70% e 96 % na maior parte das amostras (baixo nível de identidade). Conseqüentemente, houve evidente diversidade no perfil genotípico das amostras do ar e da água. Além da grande diversidade ambiental entre amostras de *F. solani* genotipados, não identificamos isolados do ar e da água em nosso estudo que apresentaram perfil idêntico na análise molecular. Em relação a características de dispersão ambiental da espécie, algumas conclusões são pertinentes: a) não identificamos alta similaridade entre cepas isoladas do ar e da água; b) 2 isolados (79 e 144) provenientes da água do mesmo quarto em períodos diferentes tiveram o mesmo perfil genotípico na análise molecular; c) o mesmo ocorreu em 2 isolados da água de pontos diferentes (1 e 10, quartos 2 e 3 respectivamente) no mesmo mês. Em contra partida, correlacionamos 2 cepas isoladas do ar de coletas diferentes, obtidas em um mesmo período, sugerem uma fonte externa em comum de propágulos de *F. solani*.

Estes resultados sugerem que *F. solani* pode estar presente no sistema de distribuição de água do hospital, com a formação de biofilme, permitindo persistir e ampliar constantemente seu inoculo ao longo do percurso do reservatório até a torneira, e que, além disso, sua presença no ar nos quartos pode ter uma fonte comum. Qualquer conclusão apontada neste contexto é limitada pelo pequeno número de amostras ambientais estudadas, assim como o poder discriminatório da técnica de microssatélite e minissatélite utilizadas neste estudo. Através da ferramenta de tipagem que utilizamos não fomos capazes de estabelecer relação direta da presença de *Fusarium* na água e seu impacto no perfil microbiológico do ar. Por outro lado demonstramos que a mesma cepa de *Fusarium* pode permanecer no sistema hidráulico por um período superior a 30 dias, sugerindo que este é um potencial reservatório para infecção humana.

Anaissie *et al.* (2001) utilizando as técnicas de IR-PCR (interrepeat polymerase chain reaction), RAPD (random amplified polymorphic DNA) e RFPL

(restriction fragment-length polymorphism), em isolados de *F. solani* do ar, água e amostras clínicas, correlacionou isolados ambientais com amostras de pacientes. Além disso, grande diversidade genética foi observada entre os isolados provenientes da água do hospital, sendo que alguns genótipos persistiram no sistema de distribuição de água hospitalar, ao longo do monitoramento de 10 anos.

Em relação a *A. fumigatus*, duas cepas provenientes do ar de ambientes distintos (banheiro 2 e quarto 4) num mesmo período, apresentaram na análise genotípica o mesmo perfil, o que sugere uma fonte externa de dispersão deste agente no ambiente interno pra ambos os ambientes.

O uso de técnicas moleculares é descrito em estudos epidemiológicos e de análise de polimorfismo de *A. fumigatus*, uma espécie de distribuição mundial, e descrita como o segundo agente em DFIs em unidades de risco. Warris *et al.* (2003) num estudo conduzido numa unidade oncológica pediátrica na cidade de Oslo, Noruega, utilizou a técnica de DNA *fingerprinting* AFLP (amplifield fragment length polymorphism) na genotipagem de isolados de *A. fumigatus*, do ar, água e de amostras clínicas de pacientes. Houve correlação entre os isolados da água e do ar com amostras de pacientes da unidade, sugerindo que estes sítios são potenciais fontes de infecção nesta unidade de risco. No presente estudo, não podemos comparar o potencial dos reservatórios de água como fonte de propágulos no perfil microbiológico do ar da unidade de risco, uma vez que ao longo do estudo não houve isolamento deste agente na água.

Na análise genotípica de 24 amostras de *A. flavus*, apesar de haver perfis idênticos entre amostras obtidas nas coletas de ar e de água na unidade de TCTH, os resultados conflitantes entre diferentes “primers” nos apontam o panorama da grande diversidade genotípica entre as amostras, não sendo possível assim, estabelecer relação direta entre propágulos isolados do ar e da água.

Diante da dificuldade na identificação e da grande diversidade genética do “complexo” *A. flavus*, o uso de sequenciamento da região ITS, ou de genes essenciais como  $\beta$ -tubulina, ou mesmo a combinação de técnicas são necessárias na diferenciação de espécies do complexo e melhor entendimento da epidemiologia de *A.*

*flavus* em estudos de monitoramento ambiental e correta identificação de amostras clínicas (Henry *et al.*, 2000, Cary & Ehrlich, 2006, Hedayati *et al.*, 2007).

Concluimos que o monitoramento ambiental em unidades de risco é possivelmente de grande importância não só aplicado em ocasiões de surtos, como também na avaliação de potenciais fontes de infecção nosocomial. Apesar do uso de filtros HEPA e pressão positiva nos quartos da unidade, o monitoramento do ar demonstrou que o isolamento de fungos patogênicos ao longo dos 12 meses, foi constante, com variações sazonais. Não estabelecemos relação genotípica entre cepas de *F. solani*, *A. fumigatus* e *A. flavus* isoladas do ar e da água. A ausência de similaridade genotípica entre as cepas isoladas do ar e da água, não exclui a possibilidade de comunicação entre estes diferentes reservatórios, podendo este achado, refletir as limitação no número de amostras estudadas e eficiência do método molecular.

Neste estudo demonstramos que fungos filamentosos patogênicos ao homem podem ser isolados, com frequência, do sistema hidráulico e de torneiras de quartos de hospital terciário. Documentamos ainda que, cepas de *F. solani* são capazes de persistir meses no sistema hidráulico, o que evidencia seu potencial na contaminação de pacientes.

## **6.0 CONCLUSÕES**

---

A presente investigação obteve as seguintes conclusões:

1. A água proveniente do sistema de distribuição do hospital pediátrico é um reservatório de fungos com potencial patogênico para pacientes submetidos a TCTH, uma vez que documentamos o isolamento constante de espécies de *Aspergillus* e *Fusarium* ao longo dos 12 meses de estudo;
2. A temperatura da água no presente estudo, foi o único parâmetro correlacionado com a quantidade de propágulos fungicos isolados a água;
3. Apesar da presença de medidas preventivas contra a exposição a propágulos fúngicos (filtros HEPA e pressão positiva), adotadas nos quartos da unidade, o monitoramento do ar ao longo de 12 meses, demonstrou constante isolamento de fungos;
4. Através do uso das técnicas de tipagem minissatélite e microssatélite, não identificamos relação genotípica, entre amostras provenientes do ar e da água, de propágulos de *A. fumigatus*, *A. flavus* e *F. solani*.



## **7.0 ANEXOS**

---

---

**Anexo 1. Preparo dos meios e reagentes utilizados no estudo****Ágar aveia com cloranfenicol**

- Ágar aveia Difco).....75,2g
- Cloranfenicol (Farmitalia/Carlo Erba).....0,30g
- Água destilada q.s.p.....1000,0mL

Em balão de 2000mL, o ágar aveia foi adicionado à água destilada e a solução foi aquecida até completa dissolução, adicionando depois o cloranfenicol. Após homogeneização, o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos e distribuído em placas de Petri 90 X 15 mm.

**Ágar Batata**

- Infusão de batatas .....500 mL
- Glicose (Inlab).....10,0g
- Ágar (Oxoid).....15,0g
- Água destilada q.s.p.....1000,0mL

Em balão de 2000mL, foi adicionado 200 gramas de batatas descascadas em 500 mL de água e cozinhados durante 1 hora. A infusão foi filtrada através de gaze e o volume completado a 500 mL com água destilada. Após, foi adicionado o ágar, dissolvido completamente e para a posterior adição de glicose. Após homogeneização, o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos e distribuído em placas de Petri 90 X 15 mm.

**Agar Czapeck**

- Sacarose (Inlab).....30 g
- Nitrato de sódio (Synth)..... 3,0 g
- Fosfato dibásico de potássio (Synth).....1,0 g

- Sulfato de magnésio 7H<sub>2</sub>O(Synth).....0,5 g
- Cloreto de potássio (Synth).....0,5 g
- Sulfato de ferro 7H<sub>2</sub>O (Synth).....0,01 g
- Agar (Oxoid).....15 g
- Água destilada q.s.p .....1000,0 mL

Em balão de 2000mL, foi dissolvido o agar em 1000 mL de água destilada, aquecendo em banho-maria, adicionando os sais em agitação. Em seguida foi misturado a sacarose, dissolvendo-a completamente. Após homogeneização, o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos e distribuído em placas de Petri 90 X 15mm.

### **Agar fubá com Tween-80**

- Farinha de milho.....12,5g
- Agar (Oxoid).....3,8g
- Tween-80 (Becto).....3,0 mL
- Água destilada q.s.p .....300,0 mL

A farinha de milho foi adicionada a 300 mL de água destilada, aquecida durante uma hora a 60°C, filtrada através de gaze dobrada e o volume completado para 300 mL. O ágar foi adicionado ao preparo acima e aquecido até a sua completa fusão. Após acrescentar o Tween-80, o meio foi distribuído em alíquotas de 18 mL em tubos de ensaio e autoclavados a 121° C por 15 minutos. No momento do uso, o meio foi dissolvido e vertido em placas de Petri 90 X 15 mm.

### **Agar GPYA – (Glucose peptone yeast extract agar) com cloranfenicol**

- Dextrose (Inlab).....20 g
- Extrato de levedura (Difco)..... 5 g
- Peptona (Difco).....5 g
- Cloranfenicol (Farmitalia/Carlo Erba).....0,3 m
- Agar (Oxoid) .....20 g
- Água destilada q.s.p .....1000,0 mL

Em um balão volumétrico de 2000 mL foi adicionado a dextrose, peptona, extrato de levedura, ágar technical, a água destilada, o cloranfenicol e homogeneizado. Após dissolver os componentes em microondas, o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos e distribuído em placas de Petri 90 X 15 mm.

### **Agar Sabouraud-dextrose com cloranfenicol**

- Sabouraud dextrose agar (Oxoid).....65g
- Cloranfenicol (Farmitalia/Carlo Erba).....0,3 mL
- Água destilada q.s.p .....1000,0 mL

Em um balão de 2000 mL, o Sabouraud foi adicionado à água destilada juntamente com o cloranfenicol e homogeneizado. Após homogeneização, o meio foi autoclavado a 121°C por 15 minutos e distribuído em placas de Petri 90 X 15 mm.

### **Agar YES ( yeast extract sucrose)**

- Sacarose (Inlab).....150 g
- Extrato de levedura (Difco)..... 20 g
- Agar (Oxoid).....20 g
- Água destilada q.s.p .....1000,0 mL

Em um balão volumétrico de 2000 mL foi adicionado a sacarose, extrato de levedura, o agar e a água destilada e homogeneizado. Após dissolver os componentes em microondas, o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos e distribuído em placas de Petri 90 X 15 mm.

### **Brometo de Etídio 10 mg/mL**

- Brometo de etídio (Pharmacia).....0,2g
- Água destilada.....19,80 mL

O brometo de etídio foi dissolvido em água destilada e estocado à temperatura ambiente em frasco escuro.

### **Caldo de cultura YEPD**

- Extrato de leveduras (Difco).....5,0g
- Dextrose (Difco).....10,0 mL
- Bactopeptona (Difco).....10,0 mL
- Água destilada q.s.p .....500,0 mL

Todos os componentes foram dissolvidos em água destilada, distribuídos em tubos de ensaio e autoclavados a 121°C por 15 minutos.

### **CHROMagar *Candida*®**

- CHROMagar *Candida* (CHOMagar).....47,6g
- Água destilada q.s.p .....1000,0 mL

O meio foi aquecido em água destilada autoclavada, evitando a fervura, até que o pó estivesse completamente dissolvido. Em seguida, foi distribuído em placas de Petri 90 X 15 mm.

### **EDTA 0,5M pH 8,0**

- EDTA (Gibco BRL).....186,1g
- Água destilada q.s.p .....1000,0 mL

O EDTA foi dissolvido (em agitador magnético) em 700 mL de água destilada acrescentando-se NaOH em pastilhas até que o EDTA estivesse dissolvido. O pH foi ajustado para 8,0 com HCl e NaOH. O volume foi completado para 1000,0 mL. A solução foi autoclavada a 121° C durante 15 minutos e estocada à temperatura ambiente.

**Gel de agarose 1,2% para Microsatélite e Minissatélite**

- Agarose (Invitrogen).....2,16g
- TAE 1X.....180,0 mL

A agarose foi adicionada ao TAE 1X e a mistura resultante foi aquecida em microondas até torna-se completamente límpida.

**Iniciadores**

Cada iniciador liofilizado foi hidratado com água milli-Q autoclavada, para a concentração de 1 nmol/ $\mu$ L. Alíquotas foram diluídas na proporção de 1:20 (20  $\mu$ L de oligonuclotídeo + 380  $\mu$ L de água milli-Q autoclavada), resultando em uma concentração de 50 pmol/ $\mu$ L, para uso na reação de microssatélite e minissatélite.

**Solução de dNTP**

- dATP 100mM (Pharmacia).....6,3  $\mu$ L
- dCTP 100mM (Pharmacia).....6,3  $\mu$ L
- dGTP 100mM (Pharmacia).....6,3  $\mu$ L
- dTTP 100mM (Pharmacia).....6,3  $\mu$ L
- Água milli Q.....475,0  $\mu$ L

Os nucleotídeos foram pipetados na ordem descrita, homogeneizados gentilmente, e a solução foi mantida a -20°C.

**TAE – Tris acetato EDTA – solução concentrada 50X**

- Trizma base (Gibco BRL).....242,0g
- Ácido acético glacial (Synth).....57,1 mL
- EDTA 0,5 M pH 8,0.....100,0 mL
- Água destilada q.s.p .....1000,0 mL

Os componentes foram dissolvidos sob agitação manual e a solução foi armazenada à temperatura ambiente.

**TAE – Tris acetato EDTA – solução concentrada 1X**

- TAE – Tris acetato – solução concentrada 50X.....20 mL
- Água destilada q.s.p .....1000,0 mL

Os reagentes acima foram misturados nas quantidades determinadas e homogeneizados. A solução foi preparada na hora do uso.

## **8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---



## Referências Bibliográficas

---

Albrecht A, Fischer G, Brunnemann-Stubbe G, äckel U, Kämpfer P. Recommendations for study design and sampling strategies for airborne microorganisms, MVOC and odours in the surrounding of composting facilities. *Int J Hyg Environ.* 2007; 211: 121-131.

Alonso MA, Ramos IJ, Lletí MS, Permán J. Epidemiology of invasive fungal infections due to *Aspergillus* spp. and Zygomycetes. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12(7): 2-6.

Alvares-Perez S, Garcia ME, Bouza E, Pelaez T, Blanco JL. Characterization of multiple isolates of *Aspergillus fumigatus* from patients: genotype, mating type and invasiveness. *Med Mycol.* 2008; 1-8.

Anaissie EJ, Kuchar RT, Rex JH, Francesconi A, Kasai M, Muller FCC, Lozano-Chiu M, Summerbell RC, Dignani MC, Chanock SJ, Walsh TJ – Fusariosis associated with pathogenic *Fusarium* species colonization of a hospital water system: a new paradigm for the epidemiology of opportunistic mold infections. *Clin Infect Dis.* 2001; 33: 1871-1378.

Anaissie EJ, Costa SF - Nosocomial aspergillosis is waterborne. *Clin Infect Dis.* 2001; 33 (9):1546-8

Anaissie EJ, Penzak SR, Dignani MC – The hospital water supply as a source of nosocomial infections. *Arch Intern Med.* 2002; 162: 1483-1492.

Anaissie EJ, Stratton SL, Dignani MC, Lee CK, Summerbell RC, Rex JH, Monson TP, Walsh TJ – Pathogenic molds (including *Aspergillus* species) in hospital water distribution system: a 3-year prospective study and clinical implications for patients with hematologic malignancies. *Blood.* 2003; 101 (7): 2542-2546.

## Referências Bibliográficas

---

Araujo R, Cabral JP, Rodrigues AG. Air filtration systems and restrictive access condition improve indoor air quality in clinical units: *Penicillium* as a general indicator of hospital indoor fungal levels. Am J Infect Control. 2008 **a**; 36 (2): 129-134.

Araujo R, Carneiro A, Oliveira SC, Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Guimaraes JE. Fungal infections after haematology unit renovation: evidence of clinical, environmental and economical impact. Eur J Haematol. 2008 **b**; 80: 436-443.

Arvanitidou M, Kanellou K, Constantinides TC, Katsouyannopoulos V – The occurrence of fungi in Hospital and community potable waters. Lett Appl Microbiol. 1999; 29: 81-84.

Arvanitidou M, Spaia S, Velegraki A, Pazarloglou M, Kanetidis D, Pangidis P, Askepidis N, Katsinas C, Vayonas G, Katsouyannopoulos V. High level of recovery of fungi from water and dialysate in haemodialysis units. J Hosp infect. 2000; 45: 225-230.

Barnes PD, Marr KA. Risks, diagnosis and outcomes of invasive fungal infection in haematological stem cell transplant recipients. British Journal of Haematology. 2007; 139: 519-531.

Bart-Delabesse E, Cordonnier C, Bretagne S – Usefulness of genotyping with microsatellite markers to investigate hospital-acquired invasive aspergillosis. J Hosp infect. 1999; 42: 322-327.

Bart-Delabesse E, Sarfati J, Debeaupuis JP, van Leeuwen W, van Belkum A, Bretagne S, Latge JP - Comparison of restriction fragment length polymorphism, microsatellite length polymorphism, and random amplification of polymorphic DNA analyses for fingerprinting *Aspergillus fumigatus* isolates. J Clin Microbiol. 2001; 39 (7):2683-6.

Bartie KL, Willians DW, Wilson MJ, Potts JC, Lewis MAO. PCR Fingerprinting of *Candida albicans* associated with chronic hyperplastic candidosis and other oral conditions. J Clin Microbiol. 2001; 39(11): 4066-4075.

Bartley JM, Olmsted RN. Reservoirs of pathogens causing health care-associated infection in the 21st century: Is renewed attention to inanimate surfaces warranted? Clin Microbiol newsletter. 2008; 30(15): 113-7.

Batista PP, Santos JF, Oliveira NT, Pires APD, Motta CMS, Lima EALA. Genetic characterization of Brazilian strains of *Aspergillus flavus* using DNA markers. Genet. Mol. Res. 2008; 7(3): 706-717.

Behre GF, Schwartz S, Lenz K, Ludwig WD, Wandt H, Schilling E, Heinemann V, Link H, Trittin A, Boenisch O, et al - Aerosol amphotericin B inhalations for prevention of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic cancer patients. Ann Hematol. 1995; 71 (6): 287-91.

Bertout S, Renaud R, Barton R, Symoens F, Burnod J, Piens MA, Lebeu B, Viviani MA, Chapuis F, Bastide JM, Grillot R, Mallié M. Genetic polymorphism of *Aspergillus fumigatus* in clinical samples from patients with invasive aspergillosis: investigation using multiple typing methods. J Clin Microbiol. 2001; 39: 1731-1737.

Blum G, Perkhofer S, Grif K, Mayr A, Kropshofer G, Nachbaur D, Kafka-Ritsch R, Dierich MP, Lass-Flörl C. A 1-year *Aspergillus terreus* surveillance study at the University Hospital of Innsbruck: molecular typing of environmental and clinical isolates. Clin Microbiol Infect. 2008; 14: 1146-1151.

Bouza E, Peláez T, Pérez-Molina J, Marín M, Alcalá L, Padilla B, Muñoz P – Demolition of a hospital building by controlled explosion: the impact on filamentous fungal load in internal and external air. J Hosp Infect. 2002; 52: 234-242.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 9 de 16 de janeiro de 2003. Determina a orientação técnica elaborada por grupo técnico assessor sobre padrões referenciais de qualidade do ar interior em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo. 2003.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Consulta pública nº 109 de 11 de dezembro de 2003. Dispõe sobre indicadores de qualidade do ar ambiental interior em serviços de saúde. 2003.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria 518 de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. 2004.

Brasileiro BTRV, Coimbra MRM, Marais MA, Oliveira NT. Genetic variability within *Fusarium solani* specie as revealed by PCR-Fingerprinting baseado n PCR markers. Bras J Microbiol. 2004; 35: 205-210.

Cary JW, Ehrlich KC. Aflatoxigenicity in *Aspergillus*: molecular genetics, phylogenetic relationships and evolutionary implications. Mycopathologia. 2006; 162: 167-177.

Castellá G, Cano J, Guarro J, Cabañes FJ – DNA fingerprinting of *Fusarium solani* isolates related to a cutaneous infection in a sea turtle. Med Mycol. 1999; 37: 223-226.

Center for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health (CDC), Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories 1993. Publication Number (CDC) 93-8395.

Chazalet V, Debeaupuis JP, Sarfati J, Lortholary J, Ribaud P, Shah P, Cornet M, Vu Thien H, Gluckman E, Brücker G, Latgé JP – Molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus* from various hospital settings. J Clin Microbiol. 1998; 36 (6): 1494-1500.

Cimon B, Symoens F, Zouhair R, Chabasse D, Nolard N, Defontaine A, Bouchara JP – Molecular epidemiology of airway colonization by *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis patients. J Med Microbiol. 2001; 50: 367-374.

Cooper EE, Mpubhth M, O' Reilly MA, Guest DI, Dharmage SC. Influence of building construction work on *Aspergillus* Infection in a Hospital Setting. Infect Hosp Epidemiol. 2003; 25: 472-476.

Cornet M, Levy V, Fleury L, Lortholary J, Barquins S, Coureul MH, Deliere E, Zittoun R, Brücker G, Bouvet A. Efficacy of prevention by high-efficiency particulate air filtration or laminar airflow against *Aspergillus* airborne contamination during hospital renovation. Infect Control Hosp Epidemiol. 1999; 20 (7): 508-513.

Couto MMB, Eijmsa B, Hofstra H, Huis JHJ, Vosen JMBM. Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strain. Appl Environ Microbiol. 1996; 62: 41-46.

Cucé LC, Andrade FA, Salebian A, Heins-Vaccari – Flora anemófila em ambiente hospitalar (OS e UTI). Na Bras Dermatol. 1993; 68 (4): 201-204.

Curtis L, Cali S, Conroy L, Baker K, Ou CH, Hershow R, Norlock-Cruz F, Scheff P. *Aspergillus* surveillance project at a large tertiary-care hospital. J Hosp Infect. 2005; 56: 188-196.

De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ - Atlas of Clinical Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira Virgili, Reus, Spain, 2000.

Denning DW – Invasive Aspergillosis. Clin. Infect. Diseases. 1998; 26: 781-805.

Doggett MS – Characterization of fungal biofilms within a municipal water distribution system. Appl Environ Microbiol. 2000; 66 (3): 1249-1251.

Dykewicz CA. Summary of the guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant recipients. Clin Infect Dis. 2001; 33: 139-44.

Elvers KT, Leeming K, Moore CP, Lappin-Scott HM. Bacterial-fungal biofilms in flowing water photo-processing tanks. J Appl Microbiol. 1998; 84: 607-618.

Falvey DG & Streifel AJ. Ten-year air sample analysis of *Aspergillus* prevalence in a university hospital. Journal of Hospital Infection. 2007; 67: 35-41.

Fischer G, Albrecht A, Jäckel U, Kämpfer P. Analysis of airborne microorganism, MVOC and odour in the surrounding of composting facilities and implications for future investigations. Int J Hyg Environ Health. 2008; 211: 132-142.

Fricke-Hidalgo H, Vandapel O, Duchesne MA, Mazoyer MA, Monget D, Lardy B, Ledeau B, Freney J, Ambroise-Thomas P, Grillot R. Comparison of the new API *Candida* system to the ID 32C system for identification of clinical important species. J Clin Microbiol. 1996; 34:1846-1848.

Fridkin S, Jarvis W. Epidemiology of nosocomial fungal infections. Clin. Microbiol Rev. 1996; 9: 499-511.

Galagan JE, Henn MR, Ma LJ, Cuomo CA, Birren B. Genomics of the fungal kingdom: insights into eukaryotic biology. Genome Res. 2005; 15: 1620-1631.

Gambale W, Croce J, Costa-Manso E, Croce M, Sales M – Library fungi at the university of São Paulo and their relationship with respiratory allergy. J Invest Allergol Clin Immunol. 1993; 3 (1): 45-50.

Gambale W – Fungos contaminantes. In: Zaitz, C. Compendio de micologia medica. São Paulo, Medsi, 1998. pp 113-121.

Garraway MO, Evans RC – Fungal nutrition and physiology. John Wiley & Sons, New York, 1984.

Gerson SL, Talbot GH, Hurwitz S, Strom BL, Lusk EJ, Cassileth PA – Prolonged granulocytopenia: the major risk factors for invasive pulmonary aspergillosis in patients with acute leukemia. Ann Intern Med. 1984; 100: 345-351.

Girardin H, Sarfati J, Traoré F, Dupouy Camet J, Derouin F, Latgé JP – Molecular epidemiology of nosocomial invasive aspergillosis. J Clin Microbiol. 1994; 32 (3): 684-690.

Godoy P, Cano J, Gene J, Guarro J, Hofling-Lima AL, Lopes Colombo A. Genotyping of 44 isolates of *Fusarium solani*, the main agent of fungal keratitis in Brazil. J Clin Microbiol. 2004; 42 (10):4494-7.

Gomez AS, Torres-Rodriguez JM, Ramirez EA, Garcia SM, Belmonte-Soler J. Seasonal distribution of *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* and *Penicillium* species isolated in homes of fungal allergic patients. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2006; 16(6): 357-363.

Gonçalves AB, Paterson RM, Lima N. Survey and significance of filamentous fungi from tap water. *Int J Hyg Environ Health*. 2006; 209: 257-264.

Gorman CM, Fuller HT. Prevalence of culturable airborne spores of selected allergenic and pathogenic fungi in outdoor air. *Atmospheric Environment*. 2008; 42: 4355-4368.

Göttlich E, Lubbe W, Lange B, Fiedler S, Melchert I, Reifenrath M, Flemming H C, De Hoog S. Fungal flora in groundwater-derived public drinking water. *Int. J. Hyg. Environ. Health*. 2002; 205: 269-279.

Graudenz G, Kalil J, Saldiva PH, Gambale W, Latorre MRDO, Morato-Castro FF – Upper respiratory symptoms associated with aging of the ventilation system in artificially ventilated offices in São Paulo, Brazil. *Chest*. 2002; 122: 729-735.

Graudenz G, Kalil J, Saldiva PH, Latorre MRDO, Morato-Castro FF – Decreased respiratory symptoms after intervention in artificially ventilated offices in São Paulo, Brazil. *Chest*. 2004; 125: 326-329.

Guinea J, Peláez T, Alcalá L, Bouza E. Outdoor environmental levels of *Aspergillus* spp. conidia over a wide geographical area. *Med micol*. 2006; 44: 349-356.

Hageskal G, Knutsen AK, Gaustad P, De Hoog GS, Skaar I. Diversity and



## Referências Bibliográficas

---

significance of mold species in Norwegian drinking water. Appl and Environ Microbiol. 2006; 72(12): 7586-7593.

Haiduven D. Nosocomial aspergillosis and building construction. Med Micol. 2008; S1-S7.

Haijeh RA, Warnock, DW. Counterpoint: Invasive aspergillosis and the environment – rethinking our approach to prevention. Clin Infect Dis. 2001; 33: 1549-52.

Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, Bowyer P, Denning DW. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. Microbiology. 2007; 153: 1677-1692.

Henry T, Iwen PC, Hinrichs SH. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. J Clin Microbiol. 2000; 38(4): 1510-1515.

Hering O, Nirenberg HI - Differentiation of *Fusarium sambucinum* Fuckel *sensu lato* and related species by RAPD PCR. Mycopathologia.1995; 129(3):159-64.

Humphreys H. Positive-pressure isolation and the prevention of invasive aspergillosis. What is the evidence? J Hosp Infect. 2004; 56: 93-100.

Jensen TG, Hansen BG, Arendrup M, Bruun B. *Fusarium* fungaemia in immunocompromised patients. Clin Microbiol Infect. 2004; 10 (6): 499-501.

Kanzler D, Buzina W, Paulitsch A, Haas D, Platzer S, Marth E, Mascher F. Occurrence and hygienic relevance of fungi in drinking water. *Mycoses*. 2007; 51: 165-169.

Kasprzyk I. Aeromycology – Mains research fields of interest during the last 25 years. *Ann Agric Environ Med*. 2008; 15: 1-7.

Kauffmann-Lacroix C, Bousseau A, Dalle F, Breinier-Pinchart MP, Delhaes L, Machouart M, Tousaint MG, Datry A, Lacroix C, Hennequin C, Toubas D, Morin O. Prevention of fungal infections related to the water supply in French hospitals proposal for standardization of methods. *Presse Med*. 2008; 37(5):751-9.

Kennedy HF, Michie JR, Richardson MD – Air sampling for *Aspergillus* spp. during building activity in a paediatric hospital ward. *J Hosp Infect*. 1995; 31: 322-325.

Lacaz CS – In: Lacaz CS, Porto C, Martins JEC - Guia para Identificação. Fungos Actinomicetos e Algas, São Paulo, Sarvier, 1998.

Leenders A, Belkum AV, Behrendt M, Luijendijk AD, Verbrugh HA – Density and molecular epidemiology of *Aspergillus* in air and relationship to outbreaks of *Aspergillus* infection. *J Clin Microbiol*. 1999; 37 (6): 1752-1757.

Loo VG, Bertrand C, Dixon C, Vityé D, DeSalis B, Mclean APH, Brox A, Robson HG – Control of construction – associated nosocomial aspergillosis in an antiquated hematologic unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1996; 17 (6): 360-364.

Lyratzopoulos G, Ellis M, Nerringer R, Denning DW. Invasive infection due to *Penicillium* species other than *P. marneffe*. *J Infect*. 2002; 45: 184-207.

Marr KA, Cartr RA, Crippa F, Wald A, Corey L. Epidemiology and outcome of mould infection in hematopoietic stem cell transplant recipients. Clin Infect Dis. 2002; 34: 909-917.

Martins-Diniz JN, Silva RAM, Miranda ET, Mendes-Giannini MJS. Monitoring of airborne fungus and yeast species in a hospital unit. Rev Saúde Pública. 2005; 39(3): 1-7.

Menezes EA, Trindade ECP, Costa MM, Freire CCF, Cavalcante MS, Cunha FA – Airborne fungi isolated from Fortaleza city, state of Ceará, Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2004; 46 (3): 133-137.

Mezzari A, Perin C, Santos SA, Bernd LAG - Airborne fungi in the city of Porto Alegre, rio Grande do Sul, Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2002; 44 (5): 269-272.

Meyer W, Mitchell TG, Freedman EZ, Vilgalys R. Hybridization probes for conventional DNA Fingerprinting used as single promoters in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol. 1993; 31(9): 2274-2280.

Meyer W, Marszewska K, Amirmostofian M, Igreja RP, Hardtke C, Methling K, Viviani MA, Chindamporn A, Sukroongreung S, John MA, Ellis DH, Sorrell TC - Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA-a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. Electrophoresis. 1999; 20(8):1790-9.

## Referências Bibliográficas

---

Morris CE, Sands DC, Bardin M, Jaenicke R, Vogel B, Leyronas C, Ariya PA, Psenner R. Microbiology and atmospheric processes: an upcoming era of research on bio-meteorology. *Biogeosciences Discuss.* 2008; 5: 191-212.

Mousa HAL, Al-Bader SM, Hassan DA – Correlation between fungi isolated from burn wound and burn care units. *Burns.* 1999; 25: 145-147.

Nagy LA, Olson BH – The occurrence of filamentous fungi in drinking water distribution systems. *Can J Microbiol.* 1982; 28: 667-671.

Nemunaitis J, Shannon-Dorcy K, Appelbaum FR, Meyers J, Owens A, Day R, Ando D, O'Neill C, Buckner D, Singer J - Long-term follow-up of patients with invasive fungal disease who received adjunctive therapy with recombinant human macrophage colony-stimulating factor. *Blood.* 1993; 82 (5): 1422-7.

Nucci M, Akiti T, Barreiros G, Silveira F., Revankar SG, Wickes BL, Sutton DA, Patterson F. Nosocomial Outbreak of *Exophiala jeanselmei* fungemia associated with Contamination of Hospital Water. *Clin Infect Dis.* 2002; 34: 1475-1480.

Nucci M, Marr KA, Queiroz-Telles F, Martins CA, Trabasso P, Costa S, Voltarelli JC, Colombo AL, Imhof A, Pasquin R, Maiolino A, Souza CA, Anaissie E. *Fusarium* infection in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2004; 38: 1237-1242.

Nucci M, Anaissie E. *Fusarium* infection in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20: 695-704.

## Referências Bibliográficas

---

Opal SM, Asp AA, Cannady PB Jr, Morse PL, Burton LJ, Hammer PG – Efficacy of Infection control measures during a nosocomial outbreak of disseminated Aspergillois associated with hospital construction. *The Journal Infect. Dis.* 1986; 153(3): 634- 7.

Oren I, Haddad N, Finkelstein R, Rowe JM – Invasive pulmonary in neutropenic patients during hospital construction: before and after chemoprophylaxis and institution of HEPA filters. *Am J Hematol.* 2001; 66: 257-262.

Pagano L, Caira M, Candoni A, Offidani M, Fianchi L, Martino B, Pastore D, Picardi M, Bonini A, Chierichini A, Fanci R, Caramatti C, Invernizzi R, Mattei D, Mitra M E, Melillo L, Aversa F, Van Lint MT, Falcucci P, Valentini CG, Girmenia C, Nosari A. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM – 2004 study. *Haematologica.* 2006; 91(8): 1068-1075.

Pagano L, Caira M, Nosari A, Van Lint MT, Candoni A, Offidani M, Aloisi T, Irrera G, Bonini A, Picardi M, Camaratti C, Invernizzi R, Mattei D, Melilo L, Waure C, Reddiconto G, Fianchi L, Valentini CG, Leone G, Aversa F. Fungal infections in recipients of hematopoietic stem cell transplant: results of the SEIFEM B-2004 study – sorveglianza epidemiologica infezioni fungible nelle emopatie maligne. *Clin Infect Dis.* 2007; 45: 1161-70.

Panagopoulou P, Filiot J, Petrikkos G, Giakouppi P, Anatoliotaki M,, Farmaki E, Kanta A, Apostolakou H, Avlami A, Samonis G, Roilides E. Environmental surveillance of filamentous fungi in three tertiary care hospitals in Greece. *J Hosp Infect.* 2002; 52: 185-91.

Panagopoulou P, Filioti J, Farmaki E, Maloukou A, Roilides E. Filamentous fungi in a tertiary care hospital: environmental surveillance and susceptibility to antifungal drugs. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007; 28: 60-67.

## Referências Bibliográficas

---

Pardelli F, Cristina ML, Sartini M, Spagnolo AM, Dallera M, Ottria G, Lombardi R, Grimald M, Orlando P. F. Fungal contamination in hospital environments. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2006; 27: 44-47.

Perioth J, Choi B, Spellberg B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol*. 2007; 45: 312-346.

Perraud M, Piens MA, Nicoloyannis N, Girard P, Sepetjan M, Garin JP – Invasive nosocomial pulmonary aspergillosis: risk factors and hospital building works. *Epidem Infect*. 1987; 99: 407-412.

Peternel R, Culing J, Hrga I. Atmospheric concentrations of *Cladosporium* spp. and *Alternaria* spp. spores in Zagreb (Croatia) and effects of some meteorological factors. *Ann Agric Environ Med*. 2004; 11: 303-307.

Pini G, Faggi E, Donato R, Sacco C, Fanci R. Invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients and the influence of hospital renovation. *Mycoses*. 2007; 51: 117-122.

Pires-Gonçalves PH, Sartori FG, Montanari LB, Zaia JE, Melhem MSC, Mendes-Giannini MJS, Martins CHG. Occurrence of fungi in water used at a haemodialysis centre. *Let Appl Microbiol*. 2008; 46: 542-7.

Power EGM - RAPD typing in microbiology - A technical review. *J Hosp Infect*. 1996; 34: 247-265.

Pyrrri I, Gotsi EK. A comparative study on the airborne fungi in Athens, Greece, by viable and non-viable sampling methods. *Aerobiologia*. 2007; 23: 3-15.

## Referências Bibliográficas

---

Raad I, Tarrant J, Hanna H, Albitar M, Jansen E, Boktour M, Bodey G, Mardani M, Hachem R, Kontoyiannis D, Whimbey E, Rolston K. Epidemiology, molecular mycology, and environmental sources of *Fusarium* infection in patients with cancer. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2002; 23: 532-537.

Rainer J, Peintner U, Pöder R. Biodiversity and concentration of airborne fungi in a hospital environment. *Mycopathologia*. 2000;149: 87-97.

Rao CY, Riggs MA, Chew GL, Mulenberg ML, Thorne PS, Sickle DV, Dunn KH, Brown C. Characterization of airborne molds, endotoxins, and glucans in homes in new after hurricanes Katrina and Rita. *Appl Environ Microbiol*. 2007; 73: 1630-4.

Richardson M, Lass-Flörl C. Changing epidemiology of systemic fungal infection. *Clin Microbiol and Infect*. 2008; 14(4): 5-24.

Rosenzweig WD, Minnigh HA, Pipes WO – Chlorine demand and inactivation of fungal propagules. *Appl Environ Microbiol*. 1983; 45 (1): 182-186.

Rotstein C, Cummings KM, Tidings J, Killion K, Powell E, Gustafson TL, Higby D – An outbreak of invasive aspergillosis among allogeneic bone marrow transplants: a case – control study. *Infect Control*. 1985; 6 (9): 347-355.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T – *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

Saracli MA, Mutiu FM, Yildran ST, Kurekci AE, Gonium A, Erdem U, Basustaoglu AC, Sutton DA. Clustering of invasive *Aspergillus ustus* eye infection in a tertiary care hospital: A molecular epidemiology study of an uncommon species. *Med Mycol*. 2007; 45: 377-384.

Sautour M, Sixt N, Dalle F, L'olliver C, Fourquenet V, Calinon C, Paul K, Valvin S, Maurel A, Aho S, Couillault G, Cachia C, Vagner O, Cuisenier B, Caillot D, Binnin A. Profiles and seasonal distribution of airborne fungi in indoor and outdoor environments at a French hospital. *Sci Total Environ*. 2009; 407 (12): 3766-71.

Segal BH, Almyroudis NG, Battiwalla M, Herbrecht R, Perfect JR, Walsh TJ, Wingard JR. Prevention and early treatment of invasive fungal infection in patients with cancer and neutropenia and in stem cell transplant recipients in the era of newer broad-spectrum antifungal agents and diagnostic adjuncts. *Clin Infect Dis*. 2007; 44: 402-9.

Sharples GJ, Lloyd RG – A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Res*. 1990; 18: 6503-08.

Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L, and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee 2007. Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. 2007. disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf> .

Singh N, Paterson DL. *Aspergillus* infection in transplant recipients. *Clin Microbiol Rev*. 2005; 18(1): 44-69.

Soll DR - The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2000; 13 (2): 332-70.

Srikanth P, Sudharsanam S, Steinberg R. Bio-aerosols in indoor environment: composition, health effects and analysis. *Ind J Med Microbiol*. 2008; 26(4): 302-12.



## Referências Bibliográficas

---

Streifel AJ, Lauer JL, Vesley D, Juni B, Rhame FS – *Aspergillus fumigatus* and other thermotolerant fungi generated by hospital building demolition. Appl Environ Microbiol. 1983; 46 (2): 375-378.

Swaminathan B, Matar GM - Molecular typing methods. In Swaminathan B, Matar GM, eds. Diagnostic Molecular Biology, ASM press, Washington DC, 1994. p. 26-50.

Távora LGF – Qualidade do ar do hospital das clínicas da faculdade de medicina da universidade de São Paulo e sua correlação com a síndrome dos edifícios doentes. [Tese Doutorado]. São Paulo, 2002.

Távora LGF, Gambale W, Heins-Vaccari EM, Arriagada GLH, Lacaz CS, Santos CR, Levin AS – Comparative performance of two air samplers for monitoring airborne fungal propagules. Braz J med Biol res. 2003; 36 (5): 613-616.

Taylor JW, Geiser DM, Burt A, Koufopanou V - The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. Clin Microbiol Rev. 1999; 12 (1): 126-46.

Teixeira ABA, Silva M, Lyra L, Luz EA, Uno J, Takada H, Miyaji M, Nishimura K, Schreiber AZ. Antifungal susceptibility and pathogenic potential of environmental isolated filamentous fungi compared with colonizing agents in immunocompromised patients. Mycopathologia. 2005; 160: 129-135.

Trilles L, Lazéra MS, Wanke B, Oliveira RV, Barbosa GG, Nishikawa MM, Morales BP, Meyer W. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008; 103(5): 455-462.

## Referências Bibliográficas

---

Vackova M, Buchta V, Prymula R, Cerman J, Kubatova A, Hamai P, Raclavsky V, Chlibeka R. The occurrence of microscopic fungi in air samples from a transplant intensive care unit. *Indoor Built Environ.* 2006; 15: 115-118.

Varo S D, Martins CHG, Carddoso MJO, Sartori FG, Montanari L B, Pires-Gonçalves RH – Isolamento de fungos filamentosos em água utilizada em uma unidade de hemodiálise. *Rev. da Soc Bras. de Med Tropical.* 2007; 40(3): 326-331.

Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR – Distribution of repetitive DNA sequences in *eubacteria* and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19: 6823-6831.

Wang BL, Takigawa T, Yamasaki Y, Sakano N, Wang DH, Ogino K. Symptom definitions for SBS (sick building syndrome) in residential dwellings. *Int J Hyg Environ Health.* 2007; 211: 144-120.

Warris A, Gaustad P, Meis JFGM, Voss A, Verweij PE, Abrahamsem TG – Recovery of filamentous fungi from water in a pediatrics bone marrow transplantation unit. *J Hosp Infect.* 2001; 47: 143-148.

Warris A, Voss A, Abrahamsen TG, Verweij PE – Contamination of hospital water with *Aspergillus fumigatus* and other molds. *Clin Infect Dis.* 2002; 34: 1159.

Warris A, Klaassen CH, Meis JF, De Ruiter MT, De Valk HA, Abrahamsen TG, Gaustad P, Verweij PE - Molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus* isolates recovered from water, air, and patients shows two clusters of genetically distinct strains. *J Clin Microbiol.* 2003; 41 (9):4101-6.

Warris A, Verweij PE. Clinical implications of environmental sources for *Aspergillus*. *Med Micol.* 2005;43: S59-S-65.

Weising K, Atkinson RG, Gardner RC. Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation. *Genome Res.* 1995; 4: 249-255.

Yeo SF, Wong B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(3): 465-484.

Zacheus OM, Lehtola MJ, Korhonen LK, Martikainen PJ - Soft deposits, the key site for microbial growth in drinking water distribution networks. *Water Res.* 2001; 35 (7):1757-65.

## **BIBLIOGRAFIA CONSULTADA**

Ferreira ABH, Dicionário Aurélio Básico de Língua Portuguesa. Nova Fronteira. Rio de Janeiro; 1988.

Rother ET, Braga MER. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. São Paulo; 2005. 122p.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)