



HELOIZA MARIA DA SILVA OLIVEIRA

**PERFIL ENZIMÁTICO DE FUNGOS COLONIZADORES E AGENTES
DE PNEUMOPATIAS**

**RECIFE
FEVEREIRO/2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

**PERFIL ENZIMÁTICO DE FUNGOS COLONIZADORES E AGENTES
DE PNEUMOPATIAS**

**HELOIZA MARIA DA SILVA
OLIVEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

**Área de Concentração: Micologia
Aplicada**

**Orientador: Prof^a. Dr^a. Oliane
Maria Correia Magalhães**

**RECIFE
FEVEREIRO/2011**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Oliveira, Heloiza Maria da Silva
Perfil enzimático de fungos colonizadores e agentes de pneumopatias/
Heloiza Maria da Silva Oliveira– Recife: O Autor, 2011.

82 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Oliane Maria Correia Magalhães

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Ciências Biológicas, Biologia de Fungos, 2011.

Inclui bibliografia e anexos

- 1. Fungos patogênicos 2. Pulmões- doenças 3. Aspergilose**
pulmonar I. Magalhães, Oliane Maria Correia (orientadora) II. III.
Título

571.995

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 331

**PERFIL ENZIMÁTICO DE FUNGOS COLONIZADORES E AGENTES
DE PNEUMOPATIAS**

HELOIZA MARIA DA SILVA OLIVEIRA

Data da defesa: 24/02/2011

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Prof^a. Oliane Maria Correia Magalhães (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Rejane Pereira Neves
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Márcia Maria Camargo de Moraes
Universidade de Pernambuco

DEDICO

A Renato, meu noivo e verdadeiro companheiro,
que traduz perfeitamente a palavra amor.

Agradecimentos

A Universidade Federal de Pernambuco pela oportunidade.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos.

À FACEPE pela bolsa concedida.

À minha orientadora, Oliane Magalhães, por sua dedicação, disponibilidade, seu exemplo de profissional e ser humano.

A toda equipe do Setor de Pneumologia do Hospital Geral Otávio de Freitas, em especial ao Dr. Fernando Lundgren, Dra. Liany Barros e Dr. João Queiroga na avaliação dos casos e realização das broncoscopias, e as enfermeiras Anilda e Ellen.

Após uma longa jornada, é edificante agradecer aos que estiveram ao meu lado: em primeiro lugar, e acima de tudo, agradeço à Deus, princípio e fim, não teria conseguido sem a presença d'Ele em minha vida.

Aos professores Armando Lacerda Filho, Rejane Neves, Cristina Motta e Débora Lima pelo auxílio prestado na leitura das lâminas e identificação dos isolados.

À minha família: meus pais, Irandi Oliveira e Lindalva Oliveira, meu irmão Márcio Oliveira, minha avó Alice da Silva, pelo apoio e formação.

Meu noivo Renato Barros Moraes, que em muitos momentos abdicou da minha presença, me compreendeu, confortou e impulsionou, sua presença foi fundamental e sempre será.

À família Barros Moraes, pelos momentos de descontração, apoio e torcida.

Aos colegas da pós-graduação e do laboratório de Micologia Médica, em especial aos amigos Aline Mary, Phelipe Oller, Tatianne Nascimento, Helton Vasconcelos, Rodrigo Holanda, Julliana Ribeiro, Susane Chang, Alide Fontes, Ildnay Brandão, Fabiola Marques, Elvislene, Rubem Moraes, Michele Chianca, Mona Lisa Venâncio, Adriana Souza, Nadyr Pedi, Daniela Buonafina, Cyndy Mary, Danielle Macêdo, Bruno Severo, Carla Bernardo, Fernanda Barreto, Vannubia Morais, a todos os meus amigos, que durante a minha vida estiveram comigo, e a todos que me apoiaram nessa longa jornada, muito obrigada!

RESUMO GERAL

Infecções fúngicas em imunossuprimidos aumentaram significativamente nas últimas décadas, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade. Fatores de virulência, como produção de enzimas pelos agentes infecciosos, contribui no dano causado aos pacientes. Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram detectar, isolar e identificar fungos em amostras clínicas, principalmente das vias respiratórias, de pacientes com pneumopatias crônicas, internos no Setor de Pneumologia do Hospital Geral Otávio de Freitas – PE e caracterizar os agentes quanto à patogenicidade. Foram realizadas coletas em 137 pacientes, sendo obtidas 327 (92,2%) amostras de escarro, 20 (5,6%) de lavado bronco-alveolar, quatro (1,1%) de secreção da cavidade oral e quatro (1,1%) de fragmentos de tecido pulmonar. Em 10 pacientes (7,29%), foi diagnosticada aspergilose pulmonar, em quatro, (2,9%) colonização causada por espécies de *Candida* e *Geotrichum clavatum*, em três (2,1%), colonização por leveduras associada à candidíase oral, em um, (0,7%) feohifomicose pulmonar e em um (0,7%), candidíase oral. Foram obtidos 21 isolados, sendo oito (38,09%) de *Aspergillus fumigatus*, um (4,76%) de *A. flavus*, oito (38,09%) de *C. albicans*, dois (9,54%) de *C. tropicalis*, um (4,76%) de *G. clavatum* e um fungo filamentoso demáceo, *Cladophialophora devriesii* (4,76%). As culturas apresentaram diferentes perfis em relação a capacidade elastinolítica, proteolítica e fosfolipásica, não permitindo estabelecer relação entre os danos ao hospedeiro e a detecção enzimática. O diagnóstico diferencial precoce e preciso é imprescindível para terapêutica adequada e bom prognóstico do paciente.

Palavras-chave: Aspergilose pulmonar, colonização pulmonar por leveduras, candidíase oral, feohifomicose pulmonar, perfil enzimático.

ABSTRACT

Opportunistic fungal infections have increased significantly in recent decades, and it is a major cause of morbidity and mortality. Virulence factors, such as enzyme production, contributes to the damage caused to patients. In this context, the objectives were to detect, isolate and identify the fungi occurring in clinical samples, mainly respiratory tract of patients with chronic respiratory disorders, inmates in Pneumology sector of the Hospital Geral Otávio de Freitas - PE and to characterize them in respect to pathogenicity. From the 137 patients collected, 327 (92.2%) were obtained by sputum samples, 20 (5.6%) from bronchoalveolar lavage, four (1.1%) from secretion of the oral cavity and four (1, 1%) from fragments of lung tissue. In 10 patients (7.29%), it was diagnosed pulmonary aspergillosis, in four patients (2.9%) presented a yeast colonization caused by *Candida* species and *Geotrichum clavatum*, three patients (2.1%) presented colonization by yeasts associated with oral candidiasis, one (0.7%) had pulmonary phaeohyphomycosis and one (0.7%), oral candidiasis. From 21 isolates obtained, eight (38.09%) were identified as *Aspergillus fumigatus*, one (4.76%) isolate as *A. flavus*, eight (38.09%) as *C. albicans*, two (9.54%) as *C. tropicalis*, one (4.76%) *G. clavatum* and a dematiaceous filamentous fungus, *Cladophialophora devriesii* (4.76%). The cultures presented different profiles in relation to their capacities to produce elastinolytic, proteolytic and phospholipolytic enzymes, which did not allow to establish a correlation between the host damage and enzymatic detection. The early and accurate differential diagnosis is imperative for appropriate therapy and prognosis for the patients.

Key-words: Pulmonary aspergillosis, pulmonary colonization by yeasts, oral candidiasis, pulmonary phaeohyphomycosis, enzymatic profile.

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Percentual de aspergilose pulmonar, colonização por leveduras, associação entre colonização por leveduras e candidíase oral, feohifomicose e candidíase oral em pacientes internos no Setor de Pneumologia do Hospital Geral Otávio de Freitas.....	38
Figura 2. Distribuição de acordo com o sexo de pacientes diagnosticados com aspergilose pulmonar, colonização por leveduras, associação entre colonização por leveduras e candidíase oral, feohifomicose e candidíase oral internos no Setor de Pneumologia do Hospital Geral Otávio de Freitas.....	38
Figura 3. Faixa etária de pacientes diagnosticados com aspergilose pulmonar, colonização por leveduras, associação entre colonização por leveduras e candidíase oral, feohifomicose e candidíase oral internos no Setor de Pneumologia do Hospital Geral Otávio de Freitas.....	39
Figura 4. Co-morbidades constatadas em pacientes diagnosticados com aspergilose pulmonar, colonização por leveduras, associação entre colonização por leveduras e candidíase oral, feohifomicose e candidíase oral internos no Setor de Pneumologia do Hospital Geral Otávio de Freitas.....	39
Figura 5. Exame direto clarificado com hidróxido de potássio a 20% evidenciando numerosos filamentos micelianos hialinos, septados com dicotomia (A) e grão eumicótico (B) no escarro; cabeça aspergilar (C) e numerosos filamentos micelianos hialinos, septados com dicotomia (D) em fragmentos de tecido pulmonar.....	41
Figura. 6. Cultura cotonosa de colaração cinza-esverdeada e reverso incolor (A) apresentando cabeças conidiais pequenas, conidióforos de parede lisa e conídios globosos típicos de <i>Aspergillus fumigatus</i> (B); colônias granulares, verdes, reverso incolor (C) com cabeças conidiais frouxamente radiadas, vesícula subglobosa, fiálides bisseriadas, conidióforo de parede rugosa, conídios lisos e globosos típico de <i>A. flavus</i> (D).....	42
Figura 7. Imagem broncoscópica mostrando aspecto da cavidade brônquica mostrando crescimento fúngico (↑) endobrônquico.....	43
Figura 8. Aspectos de imagem do tórax com cavidade preenchida por massa no ápice do pulmão direito compatível com aspergiloma (A) e Tomografia Computadorizada de Alta Resolução (B).....	43

Figura 9. Exame direto clarificado com KOH a 20% mostrando células de leveduras ovais e hialinas unibrotantes, pseudomicélio e micélio verdadeiro no escarro (A e B); numerosos filamentos micelianos hialinos septados e artrosporados no escarro (C); células de leveduras ovais e hialinas unibrotantes, pseudomicélio e micélio verdadeiro. Células de leveduras ovais e hialinas unibrotantes, pseudomicélio e micélio verdadeiro aderidos à célula epitelial (D) evidenciada em secreção oral sem clarificante e corante.....	48
Figura 10. Cultura de cor creme, lisa, de bordo regular (A) apresentando células de leveduras ovais e hialinas, unibrotantes, típicas de leveduras do gênero <i>Candida</i> (B). Cultura irregular, de cor creme, rugosa, típica de levedura artrosporada (C) com hifas hialinas septadas e artroconídios cilíndricos, típicos de espécies de <i>Geotrichum</i> (D).....	49
Figura 11. Aspecto clínico de lesão de cavidade oral, apresentando numerosas placas esbranquiçadas aderidas à língua e mucosa jugal (↑) sugestiva de candidíase oral.....	50
Figura 12. Exame direto de escarro clarificado com hidróxido de potássio a 20%, mostrando filamentos micelianos demáceos septados compatível com feohifomicose.....	54
Figura 13. Colônia veludosa, marrom-olivácea (A) apresentando hifas demáceas, septadas, conidióforos verticilióides, catenulados e conídios alongados típicos de <i>C. devriesii</i> (B).....	54
Figura 14. Presença de halo (↑) ao redor de colônia de <i>Candida albicans</i> indicando atividade proteásica no substrato soro de albumina bovina (BSA).....	57
Figura 15. Presença de halo (↑) ao redor de colônia de <i>Aspergillus fumigatus</i> indicando atividade elastinolítica.....	57

Lista de tabelas

	Pág.
Tabela 1. Correlação de dados clínicos e isolamento de agentes fúngicos de amostras de escarro, secreção de cavidade oral, lavado broncoalveolar e fragmentos de tecido pulmonar de pacientes internos do Setor de Pneumologia do Hospital Geral Otávio de Freitas.....	35
Tabela 2. Detecção de enzimas hidrolíticas como fatores de virulência em fungos isolados de amostras de escarro, secreção de cavidade oral, lavado broncoalveolar e fragmentos de tecido pulmonar de pacientes internos do Setor de Pneumologia do Hospital Geral Otávio de Freitas.....	58

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1. <i>Aspergillus</i> MICHELI EX LINK (1809) E ASPERGILOSE PULMONAR.....	14
2.2. COLONIZAÇÃO PULMONAR POR LEVEDURAS E CANDIDÍASE ORAL.....	17
2.3. FUNGOS DEMÁCEOS COMO AGENTES DE MICOSES PULMONARES.....	20
2.4. CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES FÚNGICAS INVASIVAS.....	22
2.5. DETERMINAÇÃO DE PATOGENICIDADE.....	23
2.5.1. Proteases.....	24
2.5.2. Fosfolipases.....	25
2.5.3. Elastases.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1. Local de coleta.....	29
3.2. Obtenção das amostras clínicas.....	29
3.3. Manipulação das amostras clínicas.....	29
3.4. Identificação dos fungos isolados.....	30
3.4.1. Características macroscópicas.....	30
3.4.2. Características microscópicas.....	30
3.4.3. Características fisiológicas.....	31
3.5. Caracterização quanto à patogenicidade.....	31
3.5.1. Preparação do inóculo.....	31
3.5.2. Detecção de atividade proteásica dos agentes etiológicos.....	31
3.5.3. Detecção de atividade fosfolipásica dos agentes etiológicos.....	32
3.5.4. Detecção de atividade elastinolítica dos agentes etiológicos.....	32

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1. Diagnóstico laboratorial micológico e dados epidemiológicos.....	34
4.2. Aspergilose pulmonar.....	40
4.3. Colonização por leveduras e candidíase oral.....	47
4.4. Feohifomicose pulmonar.....	53
4.5. Caracterização Enzimática.....	56
5. CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS.....	65
ANEXOS.....	75
Anexo 1.....	75
Anexo 2.....	76

1. INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas sistêmicas podem ser primárias ou oportunistas, e nos últimos anos tem se tornado crescente o número de infecções graves. Estas infecções ocorrem por fungos presentes no ar, superfícies inanimadas de equipamentos hospitalares e dos domicílios, nas plantas, solo, água, alimentos, animais domésticos e colonizando a pele, mucosas dos tratos gastrointestinal, genital e respiratório (Kuan-Yu Chen *et al.*, 2001; Colombo, 2007).

O risco de adquirir infecções fúngicas invasivas de caráter oportunista está associado a um crescente número de fatores que predisõem os indivíduos a essas infecções, sendo a causa principal de morbidade e mortalidade em pacientes imunossuprimidos (Ascioglu *et al.*, 2002; Castón-Osorio *et al.*, 2008; Cuenca-Estrella *et al.*, 2008; De Pauw *et al.*, 2008; De Pauw; Picazo, 2008).

A incidência de infecções fúngicas oportunistas em imunossuprimidos aumentou significativamente nas últimas décadas, e o seu crescimento está diretamente relacionado ao avanço no tratamento de diversas doenças, destacando-se o uso de agentes anti-neoplásicos, drogas imunossupressoras como corticosteróides, antibioticoterapia prolongada e a realização cada vez mais freqüente de transplante de medula óssea e órgãos sólidos. Alterações do sistema imune, como ocorrem na Síndrome da imunodeficiência adquirida (aids), permitem que os fungos causem infecções graves, agravando o prognóstico destes pacientes. O pulmão é um dos órgãos mais comumente afetados por infecção fúngica alcançando altos índices de morbidade e mortalidade em imunossuprimidos, principalmente, pacientes soropositivos ao vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Souza, 2006; Benito *et al.*, 2008; Cuenca-Estrella *et al.*, 2008; Goldenberg; Price, 2008).

A infecção fúngica pulmonar é adquirida pela inalação de estruturas fúngicas correspondentes a espécies patogênicas presentes no meio ambiente ou na microbiota normal do hospedeiro (Randhawa, 2000; Goldenberg; Price, 2008). As micoses pulmonares, ocasionalmente, aparecem agudas e fulminantes apresentando aspectos clínicos sugestivos para várias doenças pulmonares. Dessa forma, torna-se difícil o diagnóstico diferencial entre pneumopatias fúngicas e outras doenças como a tuberculose pulmonar, co-infecções pulmonares e o desencadeamento de pneumopatia fúngica pós-tuberculose pulmonar (Randhawa, 2000; Lumbreras; Gavalda, 2003).

A dificuldade diagnóstica tem conduzido “equivocos no diagnóstico”, dado que outras patologias das vias respiratórias apresentam clínica semelhante a micose broncopulmonar (Santos *et al.*, 2000; Kuan-Yu Chen *et al.*, 2001; Almeida *et al.*, 2003; Torres-Pereira *et al.*, 2007).

A capacidade dos fungos em produzir enzimas extracelulares, como proteases, fosfolipases e elastases, favorece o crescimento, a multiplicação fúngica, invasão e dano ao tecido hospedeiro condições indispensáveis para patogenicidade (Lacaz *et al.*, 2002; Nowakowska *et al.*, 2004; Koga-Ito *et al.*, 2006). A produção de tais enzimas é considerada um importante fator de virulência, uma vez que, por degradação conduzem à destruição dos constituintes de membranas celulares (Trabulsi *et al.*, 2002; Menezes *et al.*, 2005).

Situado no bairro de Tejipió, Zona Oeste do Recife, capital do Estado de Pernambuco encontra-se o Hospital Geral Otávio de Freitas, referência no tratamento de pneumopatias. Atualmente, não há o serviço de diagnóstico laboratorial micológico no referido hospital e o mesmo tem sido realizado esporadicamente no Laboratório de Micologia Médica no Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, e devido ao fato de pneumopatias fúngicas não figurarem entre as doenças de notificação obrigatória, não havendo assim dados precisos da real incidência dessas infecções (Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco, 2008).

Baseado na importância do tratamento precoce para os portadores de pneumopatias, este trabalho teve como objetivos detectar, isolar e identificar fungos em amostras clínicas, das vias respiratórias de pacientes com pneumopatias crônicas, internados no Setor de Pneumologia do Hospital Geral Otávio de Freitas, Recife – PE, delinear dados de importância epidemiológica e caracterizar os agentes quanto ao perfil enzimático relacionado à patogenicidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os pulmões são órgãos responsáveis pelas trocas gasosas, cujas unidades estruturais são os alvéolos (Rhoades; Tane, 2005). A microbiota do sistema respiratório superior é variada, sendo constituída de bactérias e fungos, dos quais se destacam espécies de *Candida* (Lacaz *et al.*, 2002). Estes fungos podem, em algum momento, passar de comensais a patógenos, dependendo do estado imunológico do hospedeiro. Casos de pneumopatias fúngicas ocorrem freqüentemente em indivíduos com o sistema imunológico comprometido como portadores do HIV, tuberculose, neoplasias malignas e aqueles submetidos a transplantes (Feldmesser, 2005; Camuset *et al.*, 2007; De Pauw; Picazo, 2008; Goldenberg; Price, 2008).

Alguns fatores contribuem para que os fungos sapróbios como as leveduras que fazem parte da microbiota normal humana e fungos de baixa patogenicidade tornem-se patógenos, causando quadros clínicos variáveis. Destaca-se como fator de patogenicidade, a produção de enzimas que podem estar envolvidas na patogênese de infecções. Enzimas como proteases, fosfolipases e elastases extracelulares são capazes de hidrolisar peptídeos, desempenhando um importante papel no crescimento, na multiplicação fúngica e na invasão dos fungos no tecido hospedeiro (Lacaz *et al.*, 2002; Macias *et al.*, 2004).

2.1. *Aspergillus* MICHELI EX LINK (1809) E ASPERGILOSE PULMONAR

O gênero *Aspergillus*, descrito por Micheli em 1809, agrega espécies encontradas no solo e vegetais em decomposição (Raper; Fennel, 1977; Klich, 2002; Lacaz *et al.*, 2002). São amplamente distribuídas na natureza e esporulam abundantemente, dispersando os conídios no ambiente, sendo relatados como dos mais frequentes agentes de doença fúngica invasiva para pacientes imunossuprimidos (Varkey; Perfect, 2008).

Várias espécies foram descritas como patógenas para humanos, sendo a principal via de infecção a pulmonar, iniciando pela invasão do tecido local e, finalmente, disseminando para outros órgãos, acarretando manifestações graves, sobretudo, em pacientes com déficit do sistema imunológico (De Valk *et al.*, 2008; Dagenais; Keller, 2009).

O estabelecimento da aspergilose é decorrente de várias condições incluindo, alterações da função dos macrófagos e neutrófilos, transplantes de medula óssea e órgãos

sólidos, neutropenia, corticoidoterapia prolongada, infecção pelo HIV e aids, doença granulomatosa crônica, sarcoidose, queimaduras severas, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), permanência hospitalar prolongada, antibioticoterapia múltipla prolongada, diabetes *mellitus*, alcoolismo, nutrição parenteral, dependência química e desnutrição (Sánchez; Viña, 2004; Zmeili; Soubani, 2007; Wheat, 2009; Goldenberg; Price, 2008).

A tuberculose pulmonar é o principal fator predisponente para o surgimento de colonização fúngica (Sánchez; Viña, 2004; Unis *et al.*, 2005). A colonização do pulmão por espécies de *Aspergillus* é relatada em pacientes com diversas patologias, sobretudo a tuberculose pulmonar. Infecção fúngica pós-tuberculose pulmonar é observada mais frequentemente em pacientes com aspergiloma (Khan *et al.*, 2003).

Dependendo do estado imunológico do hospedeiro, a aspergilose pode apresentar quatro formas clínicas: aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) causada por uma hipersensibilidade para antígenos de *Aspergillus*; aspergiloma, ou bola fúngica (*fungus ball*), onde o fungo se desenvolve em cavidade preexistente no pulmão, sendo esta a forma mais comum e melhor reconhecida de envolvimento pulmonar; aspergilose crônica semi-invasiva, também chamada de aspergilose crônica necrotizante, processo infeccioso cavitário indolor do parênquima pulmonar secundário a invasão local através de espécies de *Aspergillus*; e aspergilose invasiva, caracterizada pela proliferação das hifas no parênquima pulmonar, causando pneumonite necrotizante com invasão dos vasos pulmonares, conduzindo à hemorragias e infartos (Sánchez; Viña, 2004; Zmeili; Soubani, 2007; Goldenberg; Price, 2008).

Aspergilose invasiva é um problema crescente para pacientes com DPOC, fibrose cística e sequela de tuberculose, internados em ambiente hospitalar em razão de transplantes de medula óssea e órgãos sólidos e tratamento com corticosteróides. (De Valk *et al.*, 2008). Espécies de *Aspergillus* destacam-se como agentes de infecções fúngicas oportunistas e neste gênero, *A. fumigatus* é o mais frequente seguido de *A. flavus*, *A. terreus* e *A. niger* (Dagenais; Keller, 2009).

Há correlação entre quadro clínico e identificação do agente nas secreções brônquicas e tecido pulmonar, contudo, nem sempre é possível estabelecer esta relação. A inespecificidade dos sinais e sintomas da infecção, a dificuldade de obtenção de espécimes clínicos adequados, como fragmentos de tecidos ou líquidos assépticos para realização de exame direto e cultura e por vezes o longo tempo necessário para o isolamento do agente

etiológico são obstáculos para a realização do diagnóstico comprovado (Hummel; Buchheidt, 2007; Hao *et al.*, 2008; Wheat, 2009).

O diagnóstico de aspergilose é baseado em quadro clínico, aspectos de imagem, microscopia direta e cultura, sorologia e achados anatomopatológicos (Sánchez; Viña, 2004; Zmeili; Soubani, 2007; Goldenberg; Price, 2008; Wheat, 2009).

O uso da radiografia de tórax como ferramenta de diagnóstico por imagem não é muito útil na fase inicial da doença, devido a alta incidência de alterações inespecíficas. Os achados habituais incluem zonas de densidade arredondadas (sinal do halo), que são vistos apenas na fase inicial da doença, infiltrados pleurais sugestivos de infarto pulmonar e cavitação, geralmente localizados nos ápices pulmonares. A tomografia computadorizada de alta resolução mostra-se mais útil (Sánchez; Viña, 2004; Zmeili; Soubani, 2007).

Uma das formas clínicas de aspergilose, aspergiloma, se apresenta na imagem tomográfica como uma massa dentro de uma cavidade pulmonar, sendo separada da parede por um espaço de ar (sinal do ar crescente) e freqüentemente associada com o espessamento da parede e pleura adjacente. Aspergilose broncopulmonar alérgica é constituída principalmente por impactação mucóide e bronquiectasias, envolvendo predominantemente os brônquios segmentares e subsegmentares dos lobos superiores. Aspergilose crônica necrotizante pode se manifestar como massa endobrônquica, pneumonite obstrutiva ou colapso, ou massa hilar, nódulos centrolobulares e áreas de ramificação linear ou nodular (Franquet *et al.*, 2001).

Os resultados característicos da tomografia computadorizada em aspergilose angioinvasiva consistem de nódulos rodeados por um halo (sinal do halo) ou em base da pleura, áreas de consolidação em forma de cunha. Apesar dos achados de imagem na aspergilose pulmonar serem inespecíficos como ferramenta clínica apropriada, os achados da tomografia computadorizada podem sugerir ou mesmo ajudar a estabelecer o diagnóstico (Franquet *et al.*, 2001).

As manifestações clínicas são inespecíficas, variando de dispnéia, febre e tosse produtiva prolongada com hemoptise e dor torácica, sintomas que podem ser sugestivos de inúmeras doenças respiratórias, o que inviabiliza o diagnóstico clínico e consequentemente favorece a equívocos (Sánchez; Viña, 2004; Kant; Sanjay, 2007; Zmeili; Soubani, 2007; Goldenberg; Price, 2008; Xavier *et al.*, 2009). A visualização de hifas dicotômicas ao exame direto de material biológico é indicativa de aspergilose, mas não é conclusiva, pois

este achado também é comum a outras espécies de fungos (Lacaz *et al.*, 2002; Wheat, 2009).

Kumar (2000) relata um caso de um paciente de 45 anos, apresentando hemoptise, tosse e dispnéia durante três anos tratado com dois esquemas de terapia anti-tuberculose, sem qualquer melhora. O paciente foi diagnosticado com aspergilose bronco-pulmonar alérgica, coexistindo com aspergiloma situado em uma cavidade com fluido, constituindo uma rara associação.

Para invadir o hospedeiro, espécies de *Aspergillus* precisam aderir e penetrar os tecidos, e estudos têm buscado fatores de virulência e o seu papel na patogênese da infecção. Tolerância à temperatura, taxa de crescimento, tamanho dos conídios, adesinas, produção de pigmentos, metabólitos tóxicos e enzimas extracelulares são fatores de virulência de espécies de *Aspergillus* e outros fungos (Tomee *et al.*, 1994; Al-Alawi *et al.*, 2005; Okumura *et al.*, 2004; Alp; Arikan, 2008).

2.2. COLONIZAÇÃO PULMONAR POR LEVEDURAS E CANDIDÍASE ORAL

O gênero *Candida*, descrito por Berckhout em 1923, congrega espécies que podem fazer parte da pele e mucosas de humanos e outros animais, porém, sob determinadas circunstâncias, estas espécies podem portar-se como patógenas (Lacaz *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2009).

Espécies de *Candida*, consideradas patógenas oportunistas, apresentaram na última década um aumento significativo, como agentes de infecções graves e disseminadas, as quais resultam em sérios problemas de saúde pública. *C. albicans* e não-*albicans* encontram-se entre as principais causas de infecções nosocomiais, e embora *C. albicans* ainda permaneça como uma das espécies mais frequentemente isoladas, ultimamente tem sido constatada a emergência de outras, como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii* (Kumar *et al.*, 2009; Mímica *et al.*, 2009; Vidigal; Svidzinski, 2009).

Devido ao fato de que leveduras colonizam as vias áreas, até o momento não há uma adequada valorização dos achados de *Candida* a partir de espécimes biológicos do trato respiratório, exceto de fragmento do tecido pulmonar (Vidigal; Svidzinski, 2009).

Segundo Pittet *et al.* (1994), a colonização foi definida como a presença de espécies de *Candida* em três ou mais amostras obtidas dos mesmos ou diferentes sítios corpóreos

em pelo menos dois dias consecutivos de triagem; León *et al.* (2009) definem este processo como a presença de espécies de *Candida* em amostras de controle e vigilância obtidos a partir da urina, secreção traqueal, orofaringe, estômago ou fezes. Já Troughton *et al.* (2010) consideram a colonização por *Candida* como crescimento de pelo menos cinco unidades formadoras de colônia a partir de um sítio não-estéril (Troughton *et al.*, 2010).

Segundo Vidigal e Svidzinski, (2009), a colonização do trato respiratório, desencadeada por espécies de *Candida*, comumente ocorre em pacientes que necessitam de ventilação mecânica por um período superior a dois dias. Isto ocorre em virtude da disseminação hematogênica pulmonar ou pela aspiração de conteúdos colonizados de origem orofaríngea ou gástrica. Para os referidos pesquisadores, um dilema comum enfrentado por clínicos consiste na determinação, quando na presença de leveduras em amostras pulmonares, se isto de fato representa uma infecção ou se apenas resume-se a uma colonização ou, ainda, a uma contaminação.

Atualmente, não há protocolos padronizados reconhecidos que possam oferecer subsídios capazes de prever precocemente o risco de leveduras detectadas em amostras provenientes do trato respiratório, mesmo considerando-se a probabilidade de uma colonização evoluir para infecções de alta morbidade e mortalidade em determinados casos clínicos. A colonização do trato respiratório por *Candida* está associada a mau prognóstico e aumento da mortalidade hospitalar (Delisle *et al.*, 2008; Magill *et al.*, 2006), e isto é elucidado pelo fato da patogênese da infecção causada por este agente infeccioso evoluir progressivamente a partir da colonização local, acarretando em ampla disseminação e, conseqüentemente, invasão (Vidigal; Svidzinski, 2009).

O grande problema no diagnóstico de candidíases pulmonares é saber até quando essa levedura se encontra como sapróbia ou patógena e como pode tornar-se virulenta para o hospedeiro (Kuan-Yu Chen *et al.*, 2001; Vidigal; Svidzinski, 2009). Deve-se considerar que a diminuição da resistência, como nos casos de imunossupressão, radioterapia e quimioterapia, uso de drogas imunossupressoras, corticóides, antibióticos de largo espectro, ventilação artificial, uso de cateteres venosos, intervenções cirúrgicas, internamentos de longa duração e desordens metabólicas, entre outros fatores, favorece indiscutivelmente a ação patogênica de espécies de *Candida* (Vidigal; Svidzinski, 2009).

Além destes fatores, é preciso ainda considerar a capacidade de aderência e a produção de enzimas proteolíticas, como proteases e fosfolipases, que estão diretamente

envolvidas no processo de fixação e penetração desta levedura (Koga-Ito *et al.*, 2006; Oksuz *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2009; Vidigal; Svidzinski, 2009).

De acordo com Ricard e Roux (2009), infecção pulmonar por espécies de *Candida* é muito rara e a evidência da levedura em amostras respiratórias não deve ser tratada, a menos que haja evidência histológica confirmando a infecção. Como a avaliação histológica do pulmão é raramente executada (quer seja durante a biópsia do pulmão ou em necrópsia), é possível que a pneumonia por *Candida* continue a não ser reconhecida e, portanto, sub-diagnosticada.

Kumar *et al.* (2009) relatam o isolamento de *Candida* de amostras clínicas de pacientes com tuberculose pulmonar e as culturas mostraram atividade fosfolipásica e proteásica significativa determinando a patogenicidade dos isolados de *Candida* e correlacionando esta característica ao estado imunológico do hospedeiro e condições locais dos sítios de infecção.

Embora o isolamento de espécies de *Candida* a partir de amostras de trato respiratório seja comum, pneumonia primária por *Candida* é uma ocorrência extremamente rara, e foi descrita apenas em pacientes com formas graves de imunossupressão (Falcone *et al.*, 2010).

Colonização anterior do trato respiratório por espécies de *Candida* é relatada como o mais forte fator preditivo de candidíase invasiva subsequente, e por isso é aceita como indicação para o tratamento precoce em doentes de risco (Troughton *et al.*, 2010).

Além das espécies de *Candida*, outros gêneros de leveduras como *Geotrichum* e *Trichosporon* colonizam o trato respiratório e, em condições favoráveis, são capazes de atuar como agentes de micose invasiva (Lacroix; De Chauvin, 2005; Castón-Osório *et al.*, 2008; Bonifaz *et al.*, 2010). *Geotrichum* é um gênero que comporta espécies de leveduras artrosporadas, distinguidas por hifas septadas e artroconídios (Lacaz *et al.*, 2002; De Hoog; Smith, 2004; Bonifaz *et al.*, 2010).

As espécies desta levedura são geralmente diferenciadas por padrões de assimilação de carboidratos e propriedades bioquímicas (Girmenia *et al.*, 2005). Espécies de *Geotrichum* apresentam distribuição cosmopolita, fazem parte da microbiota da pele, cavidade oral e trato gastrointestinal e também são isoladas de frutas, vegetais, solo, plantas e como contaminantes de culturas de laboratório (Lacroix; De Chauvin, 2005; Bonifaz *et al.*, 2010).

Estas leveduras podem atuar como agentes de micoses oportunistas, acometendo desde a cavidade oral, pele e unhas até os brônquios, pulmões e intestino. Dentre as espécies envolvidas em processos sistêmicos, *G.candidum*, *G. capitatum* e *G. clavatum* foram relatadas como agentes de micoses pulmonares (Lacroix; De Chauvin, 2005; Muzyka, 2005; Bonifaz *et al.*, 2010).

Bonifaz *et al.* (2010), citam *Geotrichum* como leveduras isoladas em aproximadamente 18 a 31% de amostras de esputo, fezes, urina e secreção vaginal de pacientes imunossuprimidos.

2.3. FUNGOS DEMÁCEOS COMO AGENTES DE MICOSES PULMONARES

Os fungos demáceos são um grande e heterogêneo grupo de fungos assim denominado por suas hifas apresentarem cor marrom ou negra. Esta cor característica das hifas está relacionada à presença de melanina na parede celular dos fungos, e acredita-se que este pigmento pode desempenhar um papel importante na patogênese da infecção (Revankar, 2006; Naggie; Perfect, 2009).

Este grupo de fungos é muito comum e amplamente distribuído em países de clima temperado e tropical, tendo como habitat natural o solo e o reino vegetal onde são encontrados em saprobiose. No entanto, estes substratos podem servir como fontes de infecção para homens e animais a partir de processos traumáticos ou inalação. Os conídios são comumente encontrados dispersos no ar e as gotas d'água contribuem para o transporte e disseminação (Lacaz *et al.*, 2002).

Segundo Caligiorne (2007), as espécies de fungos negros, patógenos humanos, anteriormente classificados como dematiáceos, passaram a pertencer à família Herpotrichiellaceae; assim a família Dematiaceae deixa de existir, permanecendo o termo de forma ilustrativa.

Fungos demáceos são responsáveis por uma grande variedade de síndromes infecciosas, e nos últimos anos, têm sido cada vez mais reconhecidos como importantes patógenos. O espectro de doenças a que estão associados também foi ampliado e inclui infecções locais superficiais e profundas, doença alérgica, pneumonia, abscesso cerebral e infecção generalizada. Para algumas infecções em indivíduos imunossuprimidos, como abscessos, sinusite fúngica alérgica e cérebro, estes fungos estão entre os mais comuns agentes etiológicos (Revankar *et al.*, 2002; Revankar, 2006; Shigemura *et al.*, 2009).

Feohifomicose é um termo abrangente que define as síndromes clínicas causadas por fungos demáceos, sendo utilizado pela primeira vez por Ajello e colaboradores em 1974 (Revankar, 2006; Kumar; Hallikeri, 2008; Naggie; Perfect, 2009).

Embora infecção cerebral seja uma forma comum de feohifomicose sistêmica, outras formas profundas e localizadas da doença, como artrites, e endocardites, foram relatadas, porém feohifomicose cerebral é mais comumente constatada em indivíduos imunocompetentes sem evidência de fatores de risco (Brandt, Warnock, 2003; Shigemura *et al.*, 2009).

Mais de 100 espécies e 60 gêneros de fungos demáceos têm sido reportados como patógenos humanos. Como o número de pacientes imunossuprimidos por doenças e tratamentos médicos, outras espécies estão sendo relatadas como causas de micoses humanas, ampliando uma longa lista de potenciais agentes patogênicos (Revankar, 2006).

Dentre os gêneros envolvidos em infecções humanas estão *Wangiella*, *Phialophora*, *Bipolaris*, *Alternaria*, *Exophiala*, *Curvularia*, *Dactylaria* e *Cladophialophora* (Procop; Roberts, 2004; Costa; Alexander, 2005; Revankar, 2006; Lastoria *et al.*, 2009; Li Yang Hsu *et al.*, 2010). Representantes do gênero *Cladophialophora*, particularmente *C. bantiana* têm sido reportados como tendo predileção pelos tecidos cerebrais (Levin *et al.*, 2004), porém outras espécies aparecem relatadas em infecções subcutâneas e invasivas (Shigemura *et al.*, 2009).

Em 1984, Gonzalez e colaboradores descreveram um caso de micose subcutânea em uma mulher de 26 anos, proveniente das Ilhas Gran Cayman, na América Central, com lesão em mama, presumidamente diagnosticada como carcinoma. O exame histológico do fragmento de tecido evidenciou extensa inflamação granulomatosa, necrose, hifas demáceas septadas, ramificadas no ducto intralobular, bem como nos tecidos adjacentes. A paciente foi tratada, porém não apresentou resposta terapêutica, falecendo após seis anos, e a necropsia confirmou o primeiro relato de feohifomicose disseminada (Mitchell *et al.*, 1990).

Padhye e Ajello descreveram o agente etiológico como uma nova espécie de fungo demáceo, *Cladosporium devriesii*, sinônimo de *Cladophialophora devriesii*, descrita em 1995. Howard *et al.* (2006) relatam um caso de feohifomicose subcutânea em homem diabético, 83 anos, recebendo corticosteróides, que apresentou uma lesão no antebraço. No exame histopatológico, foi confirmada feohifomicose associada à inflamação granulomatosa. O fungo isolado foi identificado como *C. devriesii*. Os autores consideram

este o segundo relato, sendo o primeiro em residente do Reino Unido. Revankar *et al.* (2002) afirmam que o número de relatos de casos de feohifomicose têm aumentado na última década e que as taxas de mortalidade são altas, independente do estado imunológico do paciente.

Os fungos demáceos são considerados como dotados de mecanismos patogênicos únicos, devido à presença de melanina na parede celular, bem como a produção de enzimas (Costa; Alexander, 2005; Revankar, 2006; Li Yang Hsu *et al.*, 2010).

2.4. CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES FÚNGICAS INVASIVAS

Um consenso da organização europeia para pesquisa e tratamento de câncer (EORTC/MSG) revisou as definições de infecção fúngica invasiva, atribuindo três níveis de probabilidade para o diagnóstico de infecção invasiva por fungos que acometem pacientes imunossuprimidos: comprovada, provável e possível infecção fúngica invasiva. Os critérios diagnósticos de doença fúngica invasiva requerem o somatório de dados clínicos, aspectos radiológicos, exame micológico direto, cultura de amostras clínicas, provas sorológicas e os achados histopatológicos. Estes dados auxiliam na definição de micose invasiva como: comprovada, quando existe a demonstração de estruturas fúngicas nos tecidos; possível, quando o somatório de fatores do paciente, história clínica, imagem e exames micológicos corroboram o diagnóstico; e provável, quando fatores do paciente, história clínica e imagem indicam micose, mas não há observação de estruturas fúngicas típicas ao exame direto e isolamento do agente etiológico. Estes fatores vão definir as estratégias de manejo clínico e terapia antifúngica adequada (De Pauw *et al.*, 2008).

De acordo com De Pauw *et al.* (2008), considerando a discussão apresentada para definição do diagnóstico de infecção fúngica invasiva comprovada por espécies de *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium*, *Scedosporium apiospermum* e outros fungos, se faz necessário que o procedimento laboratorial micológico seja realizado a partir de amostras clínicas estéreis ou fragmentos de tecidos. Vale salientar que esses critérios não são adotados para micoses causadas por fungos dimórficos endêmicos como *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* e *Blastomyces dermatitidis*.

Wheat (2009), afirma que espécies de *Aspergillus* estão amplamente distribuídas na natureza e seus esporos são abundantemente dispersos pelas correntes aéreas. Por serem encontrados como possíveis contaminantes de culturas de laboratório e especialmente

quando o material analisado não for proveniente de sítio estéril, se faz necessária a repetição das coletas, com um mínimo de três, e o semeio em meio de cultura em duplicata incubado em temperatura de 28°C e a 37°C. Assim, quando ocorrer o isolamento da mesma espécie fúngica pode-se afirmar que a referida cultura é o agente etiológico e não um contaminante.

Para o diagnóstico micológico de levedurose pulmonar faz-se necessário a demonstração de estruturas fúngicas em parasitismo em espécimes clínicos estéreis ou fragmento de tecido pulmonar, com obtenção de cultura compatível para este grupo de fungos, devido ao fato de que leveduras podem colonizar o trato respiratório superior. Quando o material clínico a ser manipulado para diagnóstico não é um dos referidos, o achado deve ser tratado como possível infecção fúngica invasiva (De Pauw *et al.*, 2008; Campos; Otero, 2010) ou colonização fúngica (Vidigal; Svidzinski, 2009).

O diagnóstico de feohifomicose pode ser difícil, visto que os fungos demáceos são encontrados no solo e podem ser considerados contaminantes de culturas, como qualquer fungo patógeno oportunista. Assim, são empregados os critérios diagnósticos para fungos oportunistas. As estruturas visualizadas em parasitismo são filamentos micelianos demáceos, espessos e tortuosos (Revankar *et al.*, 2002).

2.5. DETERMINAÇÃO DE PATOGENICIDADE

Fatores de virulência são os mecanismos que permitem a invasão dos fungos na célula hospedeira com posterior dano superficial ou profundo. A habilidade de um fungo crescer a 37°C e nas variações do pH fisiológico são fatores de virulência para fungos que invadem tecidos profundos, e a transição para a forma parasitária é essencial para a patogenicidade dos fungos dimórficos. Além disso, tamanho compatível com o alvéolo é outro fator para fungos adquiridos por inalação de esporos transportados pela corrente aérea. Dentre outros fatores, a produção de toxinas e de enzimas extracelulares constitui importante fator de virulência (Hogan *et al.*, 1996).

Existem diferentes enzimas e cada uma possui a capacidade de catalisar um diferente tipo de reação química. As enzimas são as proteínas com maior variedade e especificidade de atividade catalítica. (Lehninger *et al.*, 2002). A secreção de enzimas extracelulares pode ser um importante mecanismo adaptativo durante o ciclo de vida dos fungos (Serda; Yucel, 2002; Trabulsi *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2009).

Estudos de atividades enzimáticas em fungos visam estabelecer o papel das enzimas na patogenicidade de fungos, bem como a capacidade de induzir reações inflamatórias nos hospedeiros. Estas enzimas podem agir facilitando a invasão dos tecidos, como também participando da infecção, eliminando alguns mecanismos de defesa imunológica ou contribuindo na obtenção de nutrientes, causando lesões no hospedeiro humano (Souza *et al.*, 2008).

Estudos vêm demonstrando que a patogenicidade dos fungos pode estar diretamente relacionada às enzimas que os mesmos produzem. Estas enzimas hidrolíticas acabam causando danos ao hospedeiro devido à participação ativa na invasão celular (Serda; Yucel, 2002; Trabulsi *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2009).

Estudos de microscopia eletrônica revelam que enzimas estão diretamente relacionadas ao processo de crescimento, tanto na filamentação quanto na penetração através da membrana celular do hospedeiro (Mayser *et al.*, 1996; Serda; Yucel, 2002).

Alguns autores afirmam que enzimas como proteases, fosfolipases e elastases são consideradas importantes fatores de virulência (Trabulsi *et al.*, 2002; Menezes *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2009; Macêdo *et al.*, 2009).

Proteases e fosfolipases desempenham um papel significativo no dano às membranas celulares, as quais são compostas de lipídios e proteínas; e elastases atuam degradando fibras de colágeno e elastina. Devido à incidência crescente de infecções invasivas por fungos, há um grande interesse em fatores de virulência, como a secreção de tais enzimas, a fim de estabelecer estratégias para controle e prevenção de micoses e também como um possível objetivo de intervenções terapêuticas modernas (Serda; Yucel, 2002; Al-Alawi *et al.*, 2005; Okumura *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2009).

2.5.1. Proteases

As enzimas proteolíticas pertencem ao grupo das hidrolases, as quais têm em comum o envolvimento da água na formação do produto. As proteases incluem todas as enzimas que catalisam a reação hidrolítica das ligações peptídicas das proteínas, digerindo-as em peptídeos ou aminoácidos livres (Monoda *et al.*, 2002), ocorrendo a transferência de componentes do substrato para a água (Romero *et al.*, 2001).

As proteases são normalmente detectadas qualitativamente, utilizando-se como substratos meios contendo hemoglobina, caseína, gelatina e outras fontes protéicas. A

caseína, quando hidrolisada por uma enzima extracelular, é transformada em produtos solúveis pelo processo de peptonização. A presença dessa enzima é evidenciada facilmente pela inoculação do micro-organismo na superfície do ágar-leite, visualizando, ao redor das colônias zonas hialinas, em contraste com o restante do meio que continua turvo (Neder, 1992).

Podem ser utilizados vários substratos para detecção de protease e a interpretação dos testes depende do método empregado. Segundo Aunstrup (1974), o halo que compõe a zona de hidrólise, observada em torno das colônias em contato com o substrato protéico, indica atividade proteolítica.

De acordo com Lacaz *et al.* (2002), se o substrato utilizado for leite, para confirmação se o halo origina-se realmente de ação proteásica adiciona-se solução acidificada de cloreto de mercúrio a cultura, caso o halo seja originado pela ação de produtos metabólicos ácidos ou alcalinos contidos no leite, o mesmo desaparecerá.

Proteases secretadas pelos fungos podem causar morte no tecido hospedeiro, assim como iniciar infecções no organismo pela aderência no tecido epitelial respiratório ou nas células gliais do cérebro em cobaias (Lacaz *et al.*, 2002).

2.5.2. Fosfolipases

Fosfolipases são enzimas hidrolíticas de caráter patogênico, por possuírem a propriedade de atingir especificamente os fosfolipídios das membranas celulares dos hospedeiros, causando lesões teciduais que podem variar de leves a severas, dependendo do micro-organismo e do tecido invadido (Price *et al.*, 1977; Hanel *et al.*, 1995; Ibrahim *et al.*, 1995; Mayser *et al.*, 1996; Serda; Yucel, 2002; Kumar *et al.*, 2009).

A existência de fosfolipase em fungos patogênicos foi relatada desde 1981 (Hanel *et al.*, 1995). O termo fosfolipase refere-se a um grupo heterogêneo de enzimas que compartilham a habilidade de hidrolisar uma ou mais ligações ésteres de glicofosfolipídios (Ghannoum, 2000). O método de Plate (Price *et al.*, 1977), permite a determinação semiquantitativa da atividade desta enzima em grande número de diferentes amostras de fungos em meio contendo lecitina e cálcio.

Mayser *et al.* (1996) concluíram que fosfolipases são capazes de invadir e danificar a membrana do hospedeiro, bem como de manter uma relação com alta taxa de mortalidade em experimentos animais apresentando determinantes de patogenicidade.

Kumar *et al.* (2006), testaram isolados clínicos de *Candida* quanto à produção de fosfolipase e protease, verificando que todos os 14 isolados de *C. albicans* provenientes de cavidade oral produziram estas enzimas. Entre os 21 isolados de *C. albicans* do trato respiratório testados, 100% demonstraram atividade fosfolipásica e 83,3% atividade proteásica, enquanto que isolados de *C. tropicalis* apresentaram apenas 14,3% de atividade fosfolipásica, embora tenham apresentado 71,4% de atividade proteásica.

Kumar *et al.* (2009) isolaram espécies de *Candida* a partir de amostras de cavidade oral e detectaram fosfolipase, protease e atividade hemolítica em *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* de 37 pacientes portadores de tuberculose pulmonar e 25 saudáveis. Os isolados de pacientes com tuberculose pulmonar demonstraram alta atividade enzimática de fosfolipase, com destaque para *C. glabrata*. Estes achados indicam que a infecção da cavidade oral por espécies de *Candida* favorece o estabelecimento de infecções oportunistas e contribui para a progressão da tuberculose pulmonar.

Birch *et al.* (2004) após desenvolverem um estudo comparativo entre isolados clínicos e ambientais de *A. fumigatus*, sugerem que a fosfolipase desempenha função mais importante na patogenicidade quando comparada a protease. Shen *et al.* (2004), afirmam que a atividade fosfolipásica em *A. fumigatus* é um fator de virulência, podendo causar danos ao hospedeiro. Para Mellon (2007), a capacidade de expressar atividade elastinolítica em *A. flavus* está fortemente associada ao estabelecimento da aspergilose invasiva no homem.

Souza *et al.* (2008), com o objetivo de caracterizar o perfil enzimático testaram a atividade de DNase, urease, lipase, fosfolipase e gelatinase de seis isolados de *Fonsecaea pedrosoi* e um isolado de cada espécie de *F. compacta*, *Phialophora verrucosa*, *Cladosporium carrionii*, *Cladophialophora bantiana* e *Exophiala jeanselmei*, todos agentes de cromoblastomicose. Em todas as espécies foram detectadas lipase, urease e gelatinase, e apenas uma amostra de *F. pedrosoi* não produziu fosfolipase.

2.5.3 Elastases

A elastina é uma proteína estrutural insolúvel em água que proporciona elasticidade aos tecidos e órgãos. Apesar de sua natureza hidrofóbica e altamente reticulada, tornando-se um polímero muito resistente, a degradação da elastina por enzimas em várias condições

patológicas, tais como enfisema pulmonar e infecções, tem sido documentada (Barroso *et al.*, 2006).

Estudos afirmam que a secreção de elastases em culturas de *Aspergillus* é considerada um fator de virulência, visto que a inibição da secreção de elastase diminui consideravelmente o dano tecidual ao hospedeiro (Al-Alawi *et al.*, 2005; Okumura *et al.*, 2004).

A presença de atividade de elastase é considerada particularmente relevante, pois a elastina constitui uma proporção significativa das proteínas totais do pulmão (Blanco *et al.*, 2002).

Kothary *et al.* (1984), testaram 75 isolados de *A. fumigatus* para produção de elastase em meio líquido e sólido. Dos 71 isolados que mostraram halo de degradação da elastina em meio sólido, 33 produziram elastase em meio líquido. Foram selecionados seis isolados produtores e quatro não produtores de elastase para ensaios *in vivo* com relação a capacidades em causar aspergilose invasiva em ratos imunossuprimidos. Todos os 36 ratos infectados com conídios dos isolados produtores de elastase morreram dentro de 48 a 96 horas e o exame do tecido pulmonar destes ratos mostrou hifas e necrose dos alvéolos, ao contrário, os fragmentos de tecido pulmonar dos ratos expostos a esporos de isolados não produtores de elastase mostraram poucos esporos germinados e nenhuma destruição dos alvéolos. Os autores concluíram que a produção de elastase pode ser significativa no processo de invasão.

Blanco *et al.* (2002) analisaram atividade elastinolítica em meio sólido, em 198 cepas de *A. fumigatus* isoladas de amostras clínicas e ambientais. Os quadros clínicos diagnosticados foram aspergilose invasiva em 32 pacientes transplantados, aspergiloma pulmonar em seis, e colonização em 18 diferentes pacientes. As demais 142 amostras foram ambientais. 54 dos 198 isolados não cresceram em meio de elastina e, conseqüentemente, não apresentaram elastase; estes isolados não correspondiam a pacientes com aspergilose invasiva. 44 isolados ambientais, 31 isolados provenientes de aspergilose invasiva e quatro isolados de colonização mostraram atividade elastinolítica maior que 1cm.

Em estudo, Alp e Arikan (2008) testaram isolados clínicos de *Aspergillus* agentes de doenças invasivas e não invasivas, referindo que dos 45 isolados de *A. fumigatus* testados, 43 (95,6%), apresentaram atividade elastinolítica, e de 23 isolados de *A. flavus*, 19 (82,6%) apresentaram atividade elastinolítica. Todos os isolados de *A. fumigatus* foram

capazes de produzir fosfolipase e 20 isolados mostraram atividade proteásica em BSA. Nenhum isolado de *A. flavus* apresentou atividade fosfolipásica ou proteásica, também não foi constatada correlação entre a existência de elastase ou protease e o desenvolvimento de doença invasiva. Apesar de que nem todos os isolados de *A. fumigatus* provenientes de doença invasiva apresentarem forte atividade fosfolipásica, os resultados obtidos sugerem que há uma correlação significativa entre a atividade fosfolipásica e o desenvolvimento de doença invasiva e reforçam ainda mais o impacto multifatorial da virulência.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de coleta

As amostras clínicas foram obtidas de acordo com a solicitação médica de pacientes internos no Setor de Pneumologia do Hospital Geral Otávio de Freitas, Recife, Pernambuco, no período de setembro de 2009 a agosto de 2010. A coleta das amostras e o acesso aos prontuários dos pacientes para obtenção de dados clínicos, radiológicos e epidemiológicos como sexo, idade, ocupação, co-morbidades e outros ocorreram a partir da aprovação do projeto pelo comitê de ética do referido hospital, sob identificação CAAE - 0010.0.344.000-09.

3.2. Obtenção das amostras clínicas

O procedimento para obtenção das amostras foi realizado de acordo com o espécime clínico, em triplicata, para espécimes como escarro e uma única coleta para espécimes como lavado bronco-alveolar (LBA) e amostras de secreção da cavidade oral.

As amostras de escarro, em triplicata, foram colhidas em jejum após higienização da cavidade oral. LBA e fragmentos de tecido foram obtidos por profissionais habilitados do referido hospital. As secreções da cavidade oral foram coletadas com auxílio de swab e acondicionadas em frasco contendo água destilada adicionada de 50 mg/L cloranfenicol. Posteriormente, os espécimes foram transportadas para o Laboratório de Micologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco, para realização do diagnóstico laboratorial micológico e o tempo entre coleta e manipulação não ultrapassou duas horas.

3.3. Manipulação das amostras clínicas

As amostras clínicas foram manipuladas para preparação das lâminas para realização do exame direto, realizado a fresco (sem adição de clarificante ou corante) e, quando necessário, clarificado com solução aquosa a 20% de hidróxido de potássio de acordo com o tipo de amostra. Paralelamente, as amostras foram semeadas, em duplicata, na superfície do meio ágar Sabouraud adicionado de 50 mg/L de cloranfenicol, contidos

em placas de Petri e mantidas à temperatura de 30° C e 37° C por até 30 dias. Após o crescimento as colônias foram purificadas.

Para fungos filamentosos, foi retirado um fragmento da colônia, que então foi semeado por meio de estrias na superfície do ágar Sabouraud acrescido de 50mg/L de cloranfenicol. Posteriormente, uma unidade formadora de colônia (UFC) foi semeada em meio específico contido em tubo de ensaio. Para leveduras, foi realizada suspensão em água destilada esterilizada adicionada de 50mg/ L de cloranfenicol, retirada 0,2 mL e semeada por estrias na superfície do meio ágar Sabouraud contidos em placa de Petri. As colônias fúngicas obtidas foram repicadas em tubos de ensaio contendo meio ágar Sabouraud.

Após a obtenção de cultura pura, estas foram identificadas de acordo com as características macroscópicas, microscópicas e, quando necessário, fisiológicas.

3.4. Identificação dos fungos isolados

3.4.1. Características macroscópicas

Fragmentos da cultura foram transferidos para o centro de meios específicos: ágar Sabouraud, ágar Czapek, ágar extrato de malte ou batata dextrose ágar (BDA) (Lacaz *et al.*, 2002) contidos em placas de Petri de acordo com o fungo em estudo. As placas foram mantidas a 30°C e a 37°C por até 15 dias e após este período, foram realizadas as diferentes análises fenotípicas como diâmetro, bordas, textura e coloração do verso e reverso das colônias, produção de pigmentos e tempo de crescimento (Rapper; Fennel, 1977; Barnett *et al.*, 2000; De Hoog *et al.*, 2000; Klich, 2002).

3.4.2. Características microscópicas

A verificação das microestruturas somáticas e reprodutivas foi realizada pela técnica de Dalmau (1929), através de microcultivos (cultivo sob lamínula), onde fragmentos das colônias foram semeados em dois pontos equidistantes da placa contendo o meio de cultura específico para cada grupo de fungos, e sobre estes colocadas lamínulas previamente esterilizadas. A preparação permaneceu a temperatura de 37°C por aproximadamente sete a 15 dias conforme espécie em estudo. As lamínulas do cultivo

foram então retiradas e invertidas sobre uma lâmina de vidro, contendo 40 µL de Azul de Amann (Carranza, 1949), para posterior observação microscópica.

3.4.3. Características fisiológicas

As análises fisiológicas e bioquímicas constaram de testes quanto à fermentação pela utilização de compostos de carbono, assimilação pela utilização de compostos de carbono e nitrogênio (Barnett *et al.*, 2000; De Hoog *et al.*, 2000), produção de urease (Lacaz *et al.*, 2002) e produção de ácido acético (Barnett *et al.*, 2000; Lacaz *et al.*, 2002).

3.5. Caracterização quanto à patogenicidade

3.5.1. Preparação do inóculo

Os isolados foram repicados em meio específico (ágar extrato de malte, BDA e ágar Sabouraud acrescido de extrato de levedura) para crescimento durante cinco dias a 37°C. Após o crescimento, foram preparadas suspensões de esporos em ágar-água na concentração de 2%, acrescido de Tween 80 (0,2%), contendo 10^7 esporos por mL⁻¹. Foram retiradas alíquotas de 2µL e inoculadas no centro de meio teste específico, em triplicata (Kothary *et al.*, 1984).

3.5.2. Detecção de atividade proteásica dos agentes etiológicos

A atividade proteásica foi detectada de acordo com Aoki *et al.* (1990) utilizando-se soro de albumina bovina, e Lacaz *et al.* (2002), utilizando-se caseína do leite e gelatina como substratos, contidos em placas de Petri mantidas a temperatura de 37°C. A atividade enzimática foi verificada através de cálculo da medição do halo.

Após o tempo de crescimento adequado da cultura em meio contendo o substrato específico, contido em placa de Petri, foi observado se havia formação de halo em torno da colônia; no caso do substrato caseína do leite, para diferenciar a proteólise verdadeira da produção de metabólitos ácidos e alcalinos contidos no leite, adicionou-se solução acidificada de cloreto de mercúrio. A Zona de atividade (ZA) foi calculada de acordo com a metodologia proposta por Serda e Yucel (2002), através da fórmula a seguir:

$$ZA = \frac{\text{Ø da colônia}}{\text{Ø da colônia} + \text{Zona de Precipitação}}$$

Onde:

ZA = Zona de Atividade

Ø da colônia = Diâmetro da Colônia

Zona de precipitação = Halo Formado

Interpretação:

- ZA entre 0,9 – 1,0cm = + (muito fraca)
- ZA entre 0,89 – 0,80cm = ++ (fraca)
- ZA entre 0,79 – 0,70cm = +++ (forte)
- ZA < 0,69cm = ++++ (muito forte)

Para o meio de gelatina em tubo de ensaio observou-se a liquefação ou não da gelatina. Após 7 a 15 dias de crescimento, cultura teste e controle negativo (tubo sem inóculo da cultura) foram colocados na geladeira; sendo o teste interpretado como meio permanecendo liquefeito indicou atividade enzimática e meio não liquefeito indica não atividade enzimática.

3.5.3. Detecção de atividade fosfolipásica dos agentes etiológicos

Para verificação de atividade fosfolipásica, foram adotados os métodos de Price e Cawson (1977) utilizando meio ágar Sabouraud e sais adicionado de lecitina de soja como substrato e Price *et al.* (1982) modificado, substituindo-se o “egg yolk” da Difco Laboratories por gema de ovo natural como substrato, mantidas a temperatura de 37°C, contidos em placas de Petri. A observação foi realizada no 15º dia, com a medição de um halo opaco formado ao redor da colônia. O cálculo da zona de atividade e sua interpretação foram realizados como descrito anteriormente.

3.5.4. Detecção de atividade elastinolítica dos agentes etiológicos

Para detecção da atividade elastinolítica, foi adotado o método de Kothary (1984), utilizando ágar acrescido de elastina a 2% como substrato, contido em placas de Petri

mantidas à temperatura de 37°C por 15 dias, quando foi feita a observação da presença de halo claro ao redor da colônia. O cálculo da zona de atividade e sua interpretação foram realizados como descrito anteriormente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Diagnóstico laboratorial micológico e dados epidemiológicos

No período de setembro de 2009 a agosto de 2010 foram realizadas coletas em 137 pacientes, sendo 110 (80,29%) do sexo masculino e 27 (19,71%) do sexo feminino, internos do Setor de Pneumologia do Hospital Geral Otávio de Freitas, Recife-PE. Destes pacientes foram obtidas 327 amostras de escarro (92,2%), 20 de LBA (5,6%), quatro amostras de secreção da cavidade oral (1,1%), e quatro de fragmentos de tecido pulmonar (1,1%), totalizando 355 amostras.

Dos 137 pacientes, em 10 (7,29%) foi diagnosticada através de exame direto e/ou cultura aspergilose pulmonar, em quatro (2,9%) ocorreu colonização por leveduras, em três (2,1%) colonização pulmonar por leveduras associada à candidíase oral, um (0,7%) feohifomicose pulmonar e em outro (0,7%), candidíase oral (Tabela 1, Figura1).

Dos 19 pacientes com micose ou colonização fúngica, 14 (74%) foram do sexo masculino e cinco (26%) do feminino (Figura 2). A predominância de envolvimento pulmonar no sexo masculino constatada neste trabalho está corroborada por Tomee e Van Der Werf (2001), Gomes e Faresin (2007) e Hae-Seong Nam *et al.* (2010).

A principal faixa etária predominante dos pacientes com micose ou colonização fúngica foi de 61 a 70 anos, sendo o mais jovem com 29 e o mais idoso com 74 anos (Figura 3), sendo constatado que micose ou colonização pode acometer indivíduo em qualquer idade, o que está de acordo com os dados obtidos em literatura, onde jovens e idosos são acometidos a depender do grau de imunossupressão e quantidade de inóculo (Tomee; Van Der Werf, 2001; Hae-Seong Nam *et al.*, 2010). Dentre as co-morbidades, a seqüela de tuberculose pulmonar aparece como principal fator associado ao desenvolvimento de pneumopatias fúngicas, representando 57,8%, em especial, aspergilose pulmonar, o que corrobora com dados obtidos em outras pesquisas (Khan *et al.*, 2003; Kuan-Yu Chen *et al.*, 2001, Hae-Seong Nam *et al.*, 2010). DPOC e tuberculose multidroga resistente (MDR) também aparecem associadas à pneumopatias fúngicas (Figura 4).

Os pacientes que apresentaram diagnóstico de micose ou colonização fúngica mencionaram ocupações diversas, não sendo possível estabelecer nenhuma correlação entre o diagnóstico e a ocupação exercida. A correlação entre os dados epidemiológicos, clínicos e diagnósticos dos pacientes está disposta na Tabela 1.

Tabela 1. Correlação de dados clínicos e isolamento de agentes fúngicos de amostras de escarro, secreção de cavidade oral, lavado broncoalveolar e fragmentos de tecido pulmonar de pacientes internos do Setor de Pneumologia do Hospital Geral Otávio de Freitas.

Paciente	Sexo	Idade	Ocupação	Achados radiológicos	Sintomas	Co-morbidades	Amostras clínicas	Isolados	Diagnóstico
1	M	67	Aposentado	Bronquiectasias	Dispnéia, tosse, expectoração, dispnéia	Diabetes/DPOC/Tabagismo	Escarro	<i>Aspergillus fumigatus</i> associado a <i>A. flavus</i>	Provável aspergilose
2	M	27	Desempregado	Bronquiectasias	Dor à inspiração, dispnéia, febre, perda de peso, tosse produtiva, hemoptise	Seqüela de tuberculose pulmonar	Escarro	<i>A. fumigatus</i>	Provável aspergilose
3	M	74	Aposentado	Cavidades, bronquiectasias	Dispnéia e hemoptise	Seqüela de tuberculose pulmonar	LBA	<i>A. fumigatus</i>	Provável aspergilose
4	F	56	Aposentada	Bronquiectasias	Tosse produtiva, expectoração, hemoptise, dispnéia e febre	Seqüela de tuberculose pulmonar	Escarro	<i>A. fumigatus</i>	Provável aspergilose
5	M	29	Agricultor	Lesão cavitária preenchida por massa	Febre, tosse produtiva, hemoptise, dor torácica, dispnéia	Seqüela de tuberculose pulmonar	A) LBA B) Fragmento de tecido vegetante	A) e B) <i>A. fumigatus</i>	Aspergilose comprovada
6	M	33	Carvoeiro	Fibrose, bronquiectasias	Tosse, dispnéia, febre, expectoração, perda de peso	Seqüela de tuberculose pulmonar/ DPOC	Escarro	<i>A. fumigatus</i>	Provável aspergilose

Legendas: Tuberculose MDR: Tuberculose multidroga resistente

LBA: Lavado bronco-alveolar

DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica

Continuação da Tabela 1.

Paciente	Sexo	Idade	Ocupação	Achados radiológicos	Sintomas	Co-morbidades	Amostras clínicas	Isolados	Diagnóstico
7	M	33	Desempregado	Infiltrado pulmonar difuso	Tosse, dispnéia, febre, expectoração	-	Escarro	<i>A. fumigatus</i>	Provável aspergilose
8	M	32	Desempregado	Lesão cavitária preenchida por massa	Tosse, dispnéia, febre, expectoração, hemoptise	Seqüela de tuberculose pulmonar Seqüela de tuberculose pulmonar	A) LBA B) Escovado bronco-alveolar C) Escova endobrônquico	C) <i>A. fumigatus</i>	Provável aspergilose
9	M	44	Autônomo	Bronquiectasias	Expectoração, hemoptise, febre e dor torácica	Diabetes, alcoolismo, seqüela de tuberculose pulmonar, nefrolitíase bilateral	Escarro	NHD	Provável aspergilose
10	M	45	Biscateiro	Bronquiectasias	Tosse produtiva, expectoração	Seqüela de tuberculose pulmonar	A) Escarro B) LBA C) Fragmento de lobo pulmonar	A), B) e C) NHD	Aspergilose comprovada
11	M	63	Desempregado	Infiltrado pulmonar, fibrose	Tosse produtiva, dispnéia, expectoração	DPOC	Escarro	<i>C. albicans</i>	Colonização por <i>Candida</i>
12	F	56	Cozinheira	Bronquiectasia	Dispnéia, tosse produtiva, expectoração	DPOC/ Seqüela de tuberculose pulmonar	Escarro	<i>C. albicans</i>	Colonização por <i>Candida</i>
13	F	65	Do lar	Fibrose pulmonar extensa com comprometimento do parênquima de forma difusa bilateral	Dispnéia, expectoração	Fibrose pulmonar	Escarro	<i>C. tropicalis</i>	Colonização por <i>Candida</i>

Legendas: Tuberculose MDR: Tuberculose multidroga resistente

LBA: Lavado bronco-alveolar

DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica

NHD: Não houve desenvolvimento

-: Sem co-morbidade relatada.

Continuação da Tabela 1.

Paciente	Sexo	Idade	Ocupação	Achados radiológicos	Sintomas	Co-morbidades	Amostras clínicas	Isolados	Diagnóstico
14	M	40	Pedreiro	Infiltrado pulmonar	Tosse, expectoração	Alcoolismo/tabagismo	Escarro	<i>Geotrichum clavatum</i>	Colonização por <i>Geotrichum</i>
15	F	55	Do lar	Infiltrado pulmonar difuso bilateral	Dispnéia, tosse produtiva, hemoptise	Seqüela de tuberculose pulmonar/Tuberculose pulmonar recidivada	A) Escarro B) Secreção de cavidade oral	A) e B) <i>Candida albicans</i>	Associação entre colonização e candidíase oral
16	M	67	Funcionário público	Infiltrado pulmonar	Tosse, febre, dispnéia, expectoração	Neoplasia de próstata com metástase pulmonar	A) Escarro B) Secreção de cavidade oral	A) <i>C. albicans</i> e B) <i>C. tropicalis</i>	Associação entre colonização e candidíase oral
17	F	43	Desempregada	Bronquiectasias	Tosse, febre, dispnéia, expectoração	Tuberculose MDR	A) Escarro B) Secreção de cavidade oral	A) e B) <i>C. albicans</i>	Associação entre colonização e candidíase oral
18	M	58	Pedreiro	Infiltrado pulmonar, fibrose	Tosse produtiva, expectoração	DPOC	A) Escarro B) LBA C) Secreção de cavidade oral	A e B) NHD C) <i>C. albicans</i>	Candidíase oral
19	M	64	Aposentado	Extensa destruição do parênquima pulmonar	Dispnéia e Hemoptise freqüente	Seqüela de tuberculose pulmonar	Escarro	<i>Cladophialophora devriesii</i>	Provável feohifomicose

Legendas: Tuberculose MDR: Tuberculose multidroga resistente

LBA: Lavado bronco-alveolar

DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica

NHD: Não houve desenvolvimento

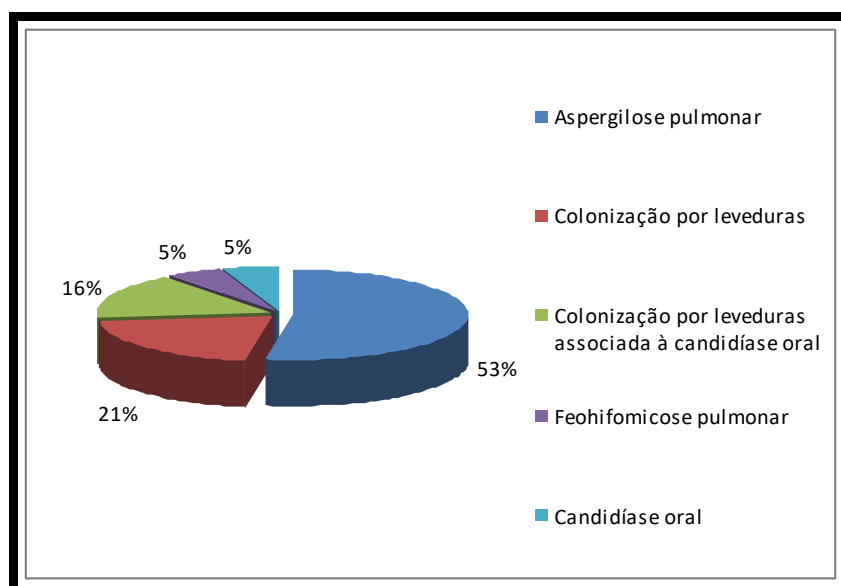


Figura 1. Percentual de aspergilose pulmonar, colonização por leveduras, associação entre colonização pulmonar por leveduras e candidíase oral, feohifomicose e candidíase oral em pacientes internos no Setor de Pneumologia do Hospital Geral Otávio de Freitas.

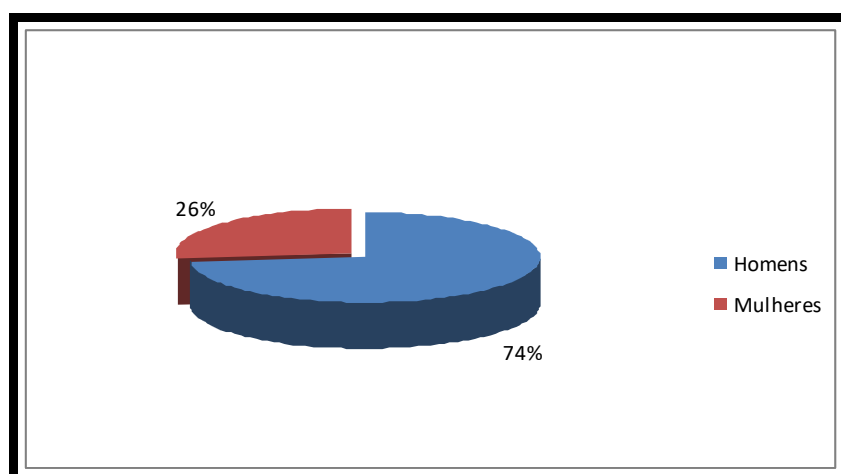


Figura 2. Distribuição de acordo com o sexo de pacientes diagnosticados com aspergilose pulmonar, colonização por leveduras, associação entre colonização por leveduras e candidíase oral, feohifomicose e candidíase oral internos no Setor de Pneumologia do Hospital Geral Otávio de Freitas.

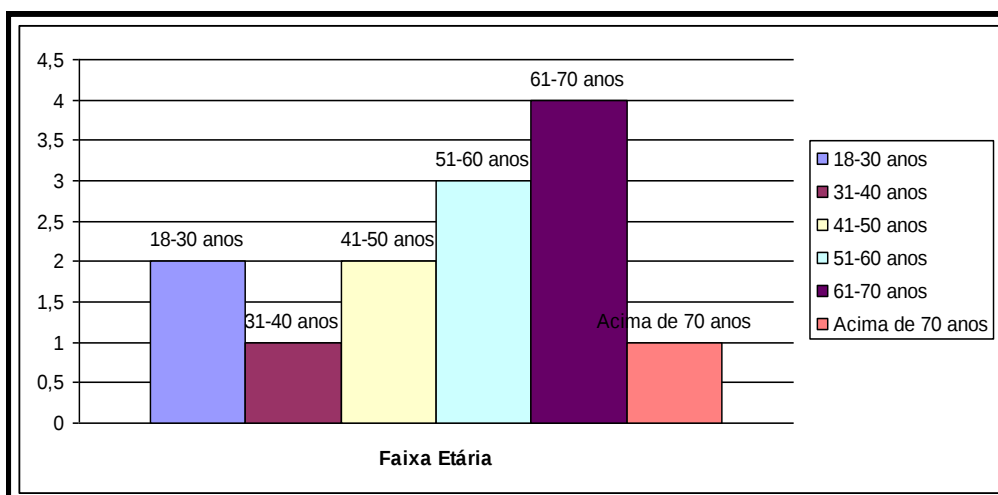


Figura 3. Faixa etária de pacientes diagnosticados com aspergilose pulmonar, colonização por leveduras, associação entre colonização por leveduras e candidíase oral, feohifomicose e candidíase oral internos no Setor de Pneumologia do Hospital Geral Otávio de Freitas.

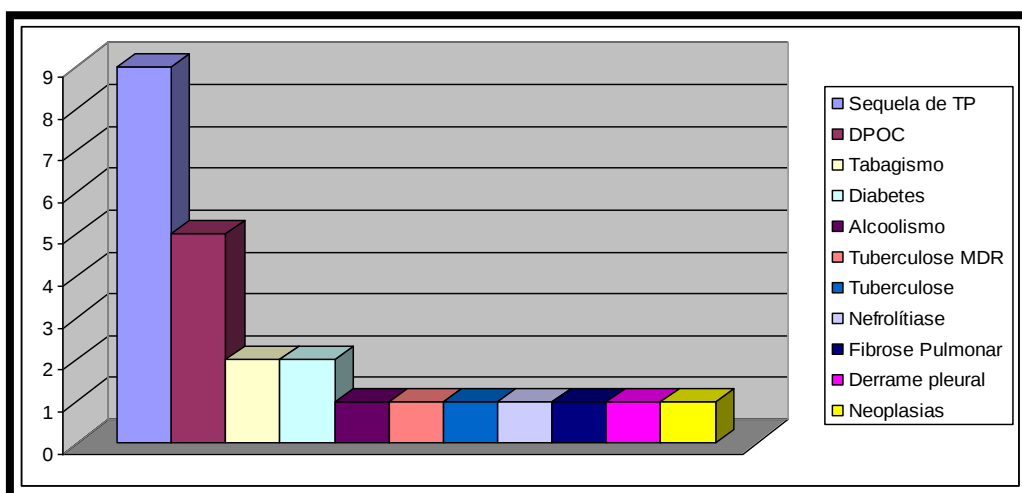


Figura 4. Co-morbidades constatadas em pacientes diagnosticados com aspergilose pulmonar, colonização por leveduras, associação entre colonização por leveduras e candidíase oral, feohifomicose e candidíase oral internos no Setor de Pneumologia do Hospital Geral Otávio de Freitas.

4.2. Aspergilose pulmonar

O diagnóstico micológico de aspergilose foi baseado na observação de filamentos micelianos hialinos, septados com e sem dicotomia, grão eumicótico e cabeça aspergilar (Figura 5A, B, C e D), em espécimes clínicos de escarro, lavado bronco-alveolar e fragmentos de tecido pulmonar, bem como obtenção do agente etiológico em cultura, sendo identificado em oito casos *A. fumigatus* apresentando colônias cotonosas com pontos granulares, cinza-esverdeada e reverso incolor (Figura 6A) e microscopicamente cabeças conidiais pequenas e colunares, vesículas, conidióforos de parede lisa e conídios globosos (Figura 6B), sendo um episódio associado a *A. flavus* com colônias granulares, verdes, de reverso incolor (Figura 6C) e na microscopia cabeças conidiais frouxamente radiadas, vesícula subglobosa, fiálides bisseriadas, conidióforo de parede rugosa, conídios lisos e globosos (Figura 6D).

Nos 10 casos de aspergilose, foram observadas estruturas fúngicas em parasitismo, não sendo obtida a cultura em apenas dois casos. As estruturas fúngicas observadas em parasitismo são compatíveis às descritas para aspergilose de acordo com Lacaz *et al.* (2002) e Sales (2009). A não obtenção do agente etiológico está provavelmente relacionada principalmente a tratamento prévio com antifúngicos, mesmo no caso da obtenção de fragmentos de tecido, pois ainda que existam estruturas fúngicas, estas se tornam inviáveis em meio de cultura, o que não representa necessariamente a cura do paciente (Lacaz *et al.*, 2002).

A predominância de *A. fumigatus* como agente etiológico de aspergilose verificada neste estudo está de acordo com Latgé, (2003), Stanzani (2005), Al-Alawi *et al.* (2005), Hohl e Feldmesser (2007), Dagenais e Keller (2009) e Abad *et al.* (2010).

Neste trabalho foi constatado um caso de associação entre *A. fumigatus* e *A. flavus*. Este achado é raramente relatado e geralmente associado ao grau de imunossupressão (Binder e Ruchel, 2000). Segundo Wong *et al.* (2001) e Xavier *et al.* (2008), o isolamento de duas espécies de fungos filamentosos pertencentes ao mesmo gênero é particularmente incomum, como constatado neste trabalho.

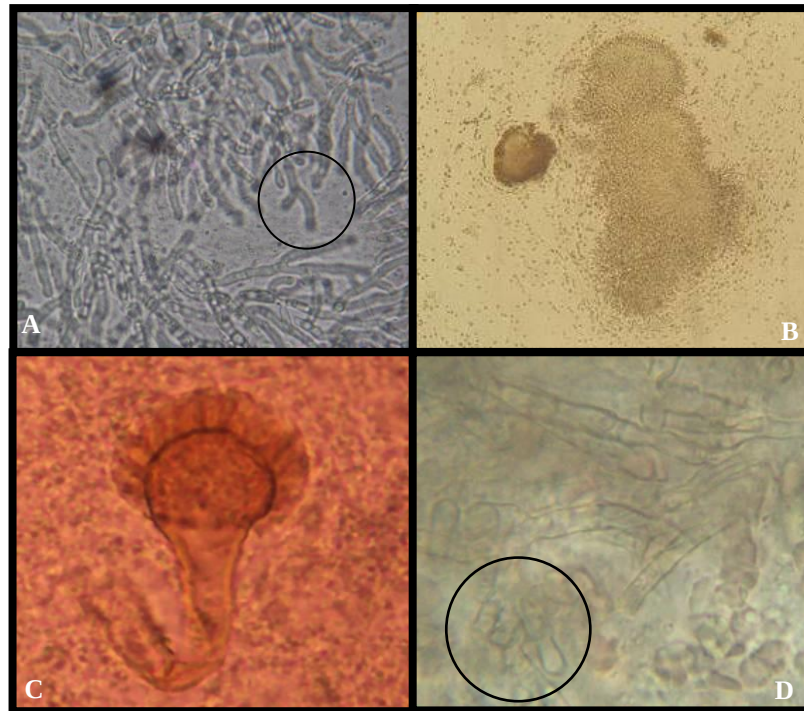


Figura 5. Exame direto clarificado com hidróxido de potássio a 20% evidenciando numerosos filamentos micelianos hialinos, septados com dicotomia (A) e grão eumicótico (B) no escarro; cabeça aspergilar (C) e numerosos filamentos micelianos hialinos, septados com dicotomia (D) em fragmentos de tecido pulmonar.

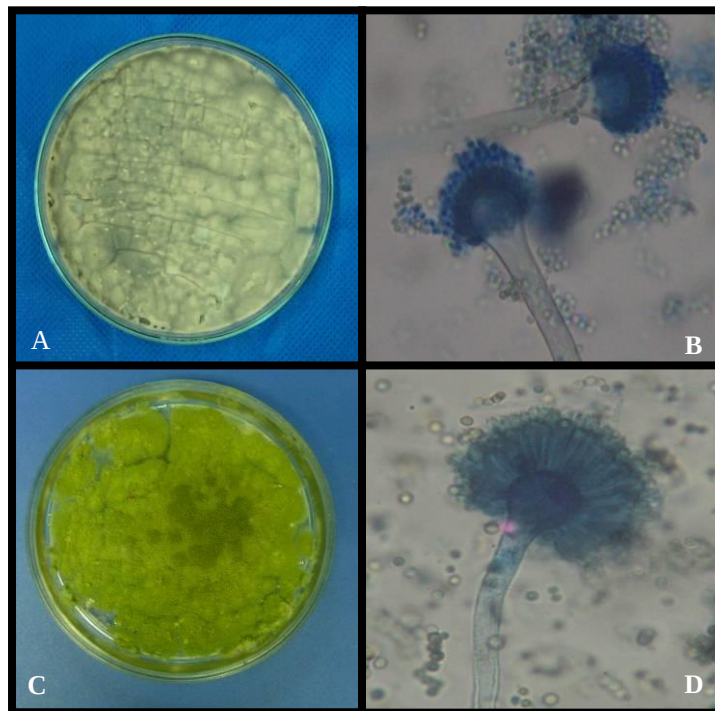


Figura. 6. Cultura cotonosa de coloração cinza-esverdeada e reverso incolor (A) apresentando cabeças conidiais pequenas, conidióforos de parede lisa e conídios globosos típicos de *Aspergillus fumigatus* (B); colônias granulares, verdes, reverso incolor (C) com cabeças conidiais frouxamente radiadas, vesícula subglobosa, fiálides bisseriadas, conidióforo de parede rugosa, conídios lisos e globosos típico de *A. flavus* (D).

Das formas clínicas de aspergilose pulmonar, foram constatados sete casos de aspergilose semi-invasiva, dois de aspergiloma e um de micetoma pulmonar. Os critérios de diagnóstico foram baseados em dados clínicos como colonização endobrônquica visualizada através de videobroncoscopia (Figura 7), de imagem de raios x do tórax evidenciando cavidades preenchidas por massa no ápice do pulmão direito (Figura 8A) ou tomografia computadorizada de alta resolução confirmando o achado de raio X (Figura 8B), imunossupressão e achados laboratoriais através de exame direto e cultura (Tabela 1).

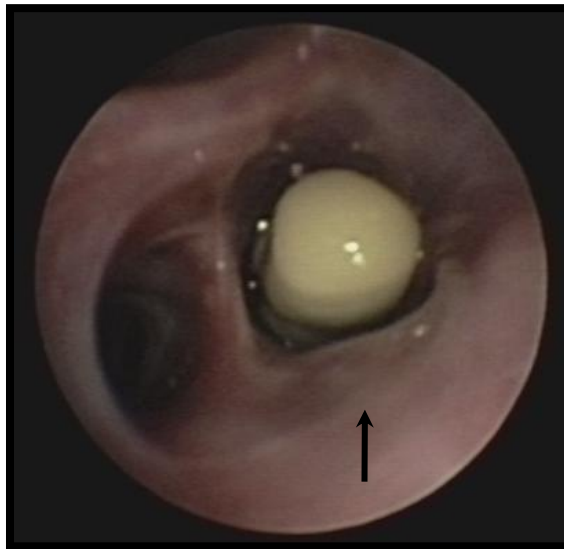


Figura 7. Imagem bronoscópica mostrando aspecto da cavidade brônquica mostrando crescimento fúngico (↑) endobrônquico.

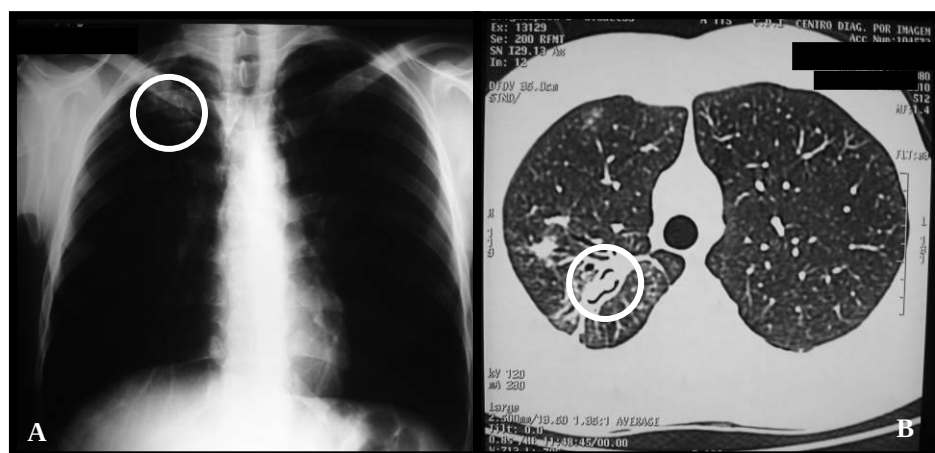


Figura 8. Aspectos de imagem do tórax com cavidade preenchida por massa no ápice do pulmão direito compatível com aspergiloma (A) e Tomografia Computadorizada de Alta Resolução (B).

Gefter *et al.* (1981) foram os primeiros a descrever aspergilose pulmonar semi-invasiva como uma forma intermediária entre aspergiloma e aspergilose invasiva. Segundo Sales (2009), esta forma vem sendo frequentemente relatada nos últimos anos, como constatado neste trabalho. Tal forma clínica é rara, sendo descrita apenas em relatos esporádicos (Marshall *et al.*, 2010).

Outra forma clínica diagnosticada foi aspergiloma ou bola fúngica, a qual representa a forma não-invasiva onde o fungo se desenvolve em cavidade pré-existente no parênquima pulmonar (Camuset *et al.*, 2007).

Frequentemente, pneumologistas se referem ao aspergiloma como micetoma, no entanto, esta terminologia não é adequada para designar aspergiloma por representarem processos diferentes (Welsh *et al.*, 2007; Ameen; Arenas, 2009). Micetoma é uma infecção causada por espécies de fungos (eumicetoma), bactérias filamentosas (actinomicetoma) ou bactérias cocóides (botriomicose) caracterizado pela formação de grãos constituídos por filamentos fúngicos, filamentos bacterianos ou cocos, respectivamente (Lacaz *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2010).

Os sinais e sintomas apresentados pelos pacientes incluíram tosse, expectoração, febre, perda de peso, dispnéia, dor torácica e hemoptise, sendo este o mais frequentemente constatado em seis casos. Espécies de *Aspergillus* possuem uma predileção pelos vasos sanguíneos; penetrando no sistema respiratório são capazes de aderir e invadir o tecido pulmonar, pela digestão de seus componentes. A angioinvasão é muitas vezes o primeiro passo para a disseminação por via hematogênica para outros sítios (Hohl; Feldmesser, 2007; Amchentsev *et al.*, 2008; Dagenais; Keller, 2009).

Aspergilose pulmonar é a causa mais comum de hemoptise em pacientes não neutropênicos, de acordo com Zmeili e Soubani (2007) e Amchentsev *et al.* (2008). Riscili e Wood (2009) relatam que hemoptise e tosse crônica são os sintomas mais comuns e que os episódios de hemoptise podem ser muitas vezes severos em pacientes que desenvolvem a forma clínica de aspergiloma. Neste trabalho, hemoptise foi observada em 63,6% dos pacientes (Tabela 1), e segundo Sagan *et al.* (2010) hemoptise maciça de lesão intrapulmonar ocorre em até 83% dos pacientes e pode ser fatal.

Os achados radiológicos incluem cavidades pré-existentes, localizadas principalmente no lobo superior do pulmão, infiltrado pulmonar e bronquiectasias, sendo este último apresentado por todos os pacientes como consequência de sequela de tuberculose ou DPOC. Bronquiectasia é citada como um dos principais fatores

predisponentes para o desenvolvimento de aspergilose (Amchentsev *et al.*, 2008, Sagan *et al.*, 2010). É definida como a dilatação brônquica irreversível, levando a tosse crônica, formação de muco e infecções recorrentes. A maioria das bronquiectasias é idiopática ou resultado de infecções ou condições anteriores, como fibrose cística, bronquiectasias tratadas causadas por tuberculose prévia, sarcoidose, silicose com fibrose maciça progressiva e a própria aspergilose pulmonar. Estas condições causam bronquiectasia distribuída no lobo superior do pulmão (Javidan-Nejad; Bhalla, 2010).

Dos 10 casos de aspergilose, três foram previamente diagnosticados como infecção respiratória bacteriana inespecífica, sendo submetidos a terapia antibacteriana de amplo espectro e um foi tratado para tuberculose pulmonar recidivada, mesmo com a pesquisa do bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) negativa.

Devido a inespecificidade de sinais, sintomas e achados radiológicos, equívocos de diagnóstico são bem relatados, com ênfase para aqueles em que aspergilose é equivocadamente diagnosticada e tratada como tuberculose pulmonar. Sintomas como hemoptise, tosse e febre são atribuídos a tuberculose ativa e tratados de forma incorreta; a falha no diagnóstico atrasa o início da terapêutica adequada e pode prejudicar o prognóstico do paciente. Quase metades dos casos de ABPA são erroneamente diagnosticados como tuberculose pulmonar (Kumar, 2000; Al-Moudi, 2001; Kant; Sanjay, 2007).

As co-morbididades encontradas foram diabetes, DPOC, tabagismo, etilismo, seqüela de tuberculose pulmonar e nefrolitíase. Em um paciente não foi documentado co-morbididade (Tabela 1). Espécies de *Aspergillus* comumente colonizam lesões pulmonares cavitárias (Al-Alawi *et al.*, 2005). Avaliação de pacientes com doença cavitária preexistente, proveniente de tuberculose pulmonar prévia, mostrou que 11% a 25% tinham evidência de colonização por *Aspergillus* (Riscili; Wood, 2009).

Sequela de tuberculose é indiscutivelmente o fator mais citado como predisponente ao desenvolvimento de formas clínicas de aspergilose, porém graus leves de imunossupressão também podem conduzir a formas crônicas da aspergilose pulmonar, como exemplo doença pulmonar de base ou condições sistêmicas como a DPOC, diabetes *mellitus*, uso crônico de esteróides, HIV, abuso de álcool ou idade avançada (Al-Alawi *et al.*, 2005, Riscili; Wood, 2009).

Dos dez casos de aspergilose pulmonar, nove ocorreram no sexo masculino e um do sexo feminino, assim, nos nossos achados, o indivíduo do sexo masculino apresentou nove

vezes maior probabilidade de desenvolver aspergilose pulmonar, provavelmente devido à maior exposição aos fatores predisponentes, conforme constatado por Tomee e Van Der Werf (2001) e Hae-Seong Nam *et al.* (2010).

A idade dos pacientes variou de 29 a 74 anos, sendo constatada a predominância em pacientes jovens, isto é, abaixo de 50 anos. Os pacientes atendidos apresentaram ocupações variadas, não sendo observado nenhum padrão.

Neste trabalho, foram diagnosticados dois casos de aspergilose pulmonar comprovada. Em um deles não foi obtido o agente etiológico, contudo neste caso, as estruturas fúngicas observadas em parasitismo, filamentos micelianos hialinos e septados com e sem dicotomia bem como cabeça aspergilar concluíram o diagnóstico. Os demais casos foram classificados como possível aspergilose pulmonar, baseado nos critérios propostos por De Pauw *et al.* (2008).

A necessidade de realização de biópsia pulmonar como forma de diagnóstico conclusivo de aspergilose pulmonar representa um dilema para os profissionais da área de saúde. Aqueles que não defendem a realização de biópsia argumentam que históricos clínicos e radiológicos dos pacientes são critérios suficientes para diagnóstico em 55% dos casos, ficando a biópsia para casos duvidosos. Os defensores da biópsia afirmam que esta permite diagnóstico conclusivo e exclusão de outras patologias (Segal, 2009; Xavier *et al.*, 2009).

O tratamento empregado em todos os casos foi Itraconazol em dose diária de 200 mg a 600 mg por um período mínimo de seis meses, o que consiste com o recomendado em literatura (Hae-Seong Nam *et al.*, 2010), não foi constatado óbito em nenhum dos pacientes, contudo, abandono do tratamento, bem como recidiva levou os mesmos a retornarem ao serviço. Em um estudo com pacientes não neutropênicos, Itraconazol alcançou taxa de eficiência de 57%, porém aumenta a concentração de ciclosporina e tacrolimus. Anfotericina B também foi utilizada por alguns pacientes por período reduzido, devido a toxicidade. Na literatura, este fármaco não é recomendado, em vista do risco de toxicidade renal relatada em altas doses e por tempo prolongado de tratamento, sendo preferível a utilização de fórmulas lipossomais. Voriconazol e Posaconazol mostraram resultados superiores à Anfotericina B, porém de custo mais elevado que o do Itraconazol (Gangneux *et al.*, 2010).

4.3. Colonização por leveduras e candidíase oral

O diagnóstico micológico de colonização por leveduras e candidíase oral foi baseado na observação de células de leveduras ovais e hialinas unbrotantes, pseudomicélio e micélio verdadeiro e/ou filamentos micelianos hialinos septados e artrosporados em espécimes clínicos de escarro e secreção de cavidade oral (Figura 9) e obtenção do agente etiológico em cultura (Figura 10), sendo identificados oito (72,7%) isolados de *C. albicans*, dois (18,2%) de *C. tropicalis* e um (9,1%) de *Geotrichum clavatum*. As estruturas fúngicas observadas em parasitismo, células de leveduras ovais e hialinas unbrotantes, pseudomicélio e micélio verdadeiro são compatíveis com a colonização por *Candida* e candidíase oral de acordo com Vidigal e Svidzinski, (2009) e Campos e Otero (2010). A presença de filamentos micelianos hialinos septados e artrosporados associado à identificação de *G. clavatum* é compatível à descrição em literatura para colonização por *Geotrichum* de acordo com De Hoog e Smith (2004) e Bonifaz *et al.* (2010).

Neste trabalho, colonização fúngica foi definida como a presença de numerosas estruturas fúngicas em no mínimo três amostras de escarro e obtenção de cultura, sem evidência clínica de comprometimento orofaríngeo; colonização associada à candidíase oral quando além das considerações anteriores, existia evidência clínica e laboratorial de comprometimento orofaríngeo, compatível com levedurose, e candidíase oral, quando havia evidência clínica e laboratorial de comprometimento orofaríngeo, contudo na amostra de escarro são observadas raras estruturas fúngicas.

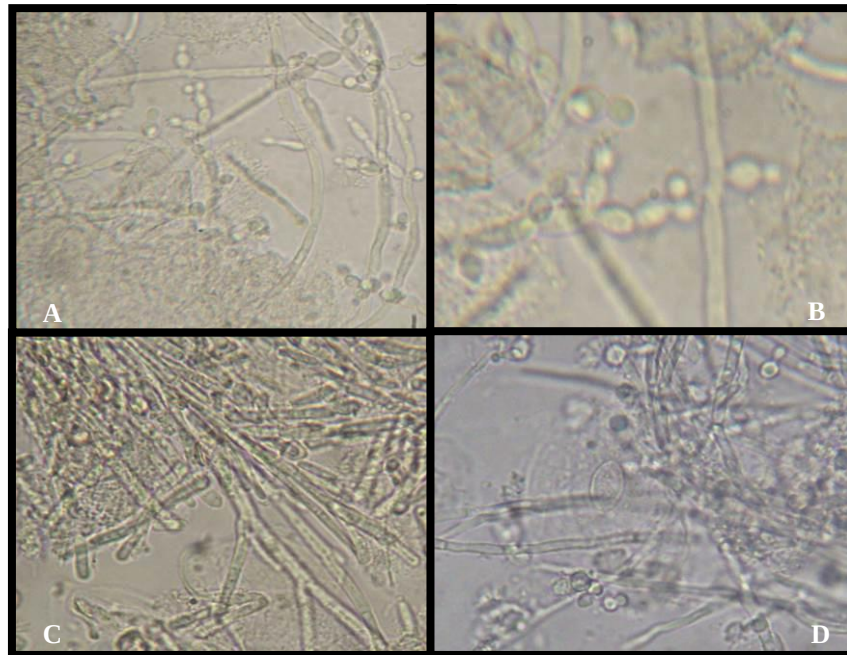


Figura 9. Exame direto clarificado com KOH a 20% mostrando células de leveduras ovais e hialinas unibrotantes, pseudomicélio e micélio verdadeiro no escarro (A e B); numerosos filamentos micelianos hialinos septados e artrosporados no escarro (C); células de leveduras ovais e hialinas unibrotantes, pseudomicélio e micélio verdadeiro aderidos à célula epitelial (D) evidenciada em secreção oral sem clarificante e corante.

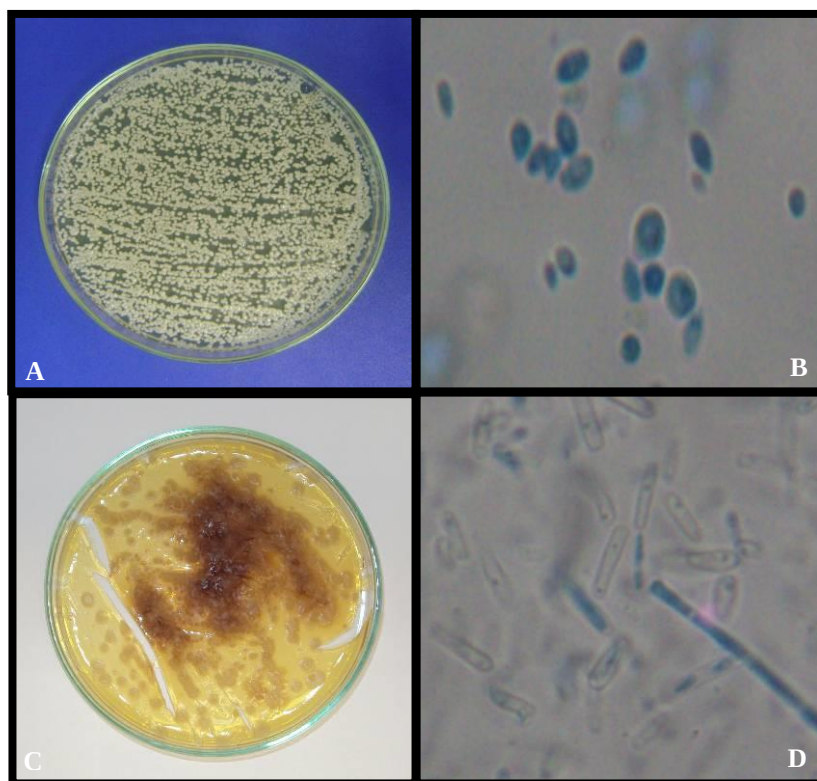


Figura 10. Cultura de cor creme, lisa, de bordo regular (A) apresentando células de leveduras ovais e hialinas, unibrotantes, típicas de leveduras do gênero *Candida* (B). Cultura irregular, de cor creme, rugosa, típica de levedura artrosporada (C) com hifas hialinas septadas e artroconídios cilíndricos, típicos de espécies de *Geotrichum* (D).

Dos casos de colonização, foram constatados dois casos de colonização pulmonar causada por *C. albicans*, um por *C. tropicalis* e um por *G. clavatum*; três casos de colonização pulmonar por *C. albicans* associada a candidíase oral, sendo em apenas um episódio constatada associação de *C. albicans* e *C. tropicalis*, e um caso de candidíase oral por *C. albicans*. O diagnóstico foi baseado em critérios clínicos, de imagem, grau de imunossupressão e achados laboratoriais (Figura 11 e Tabela 1).

A predominância de *C. albicans* como agente etiológico de colonização e candidíase oral neste trabalho está de acordo com Kumar *et al.* (2009); Vidigal e Svidzinski, (2009); Campos e Otero (2010).

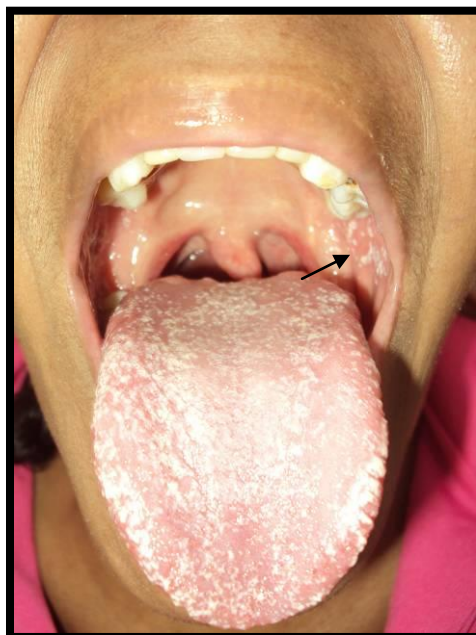


Figura 11. Aspecto clínico de lesão de cavidade oral, apresentando numerosas placas esbranquiçadas aderidas à língua e mucosa jugal (↑) sugestiva de candidíase oral.

O diagnóstico de candidíase pulmonar ainda é controverso, podendo ser adquirida por disseminação hematogênica ou por aspiração de fungos presentes nas vias aéreas. O isolamento de espécies de *Candida* a partir da biópsia pulmonar de pacientes não neutropênicos submetidos a ventilação mecânica em estado grave, tem conduzido alto (40%) percentual de óbito. No entanto, a incidência de pneumonia por espécies de *Candida* é baixa (8%). A colonização por *Candida* é homogênea em regiões diferentes do pulmão, e a presença de *Candida* em amostras respiratórias, independentemente da cultura, não é um bom indício para pacientes em estado crítico (Vidigal; Svidzinski, 2009).

Na maioria dos indivíduos saudáveis colonizados por *Candida*, a microbiota normal da pele, trato gastrointestinal e trato genital feminino limita a proliferação fúngica, auxiliando na prevenção de infecções. A mudança no comportamento de espécies de *Candida* de sapróbio para fungo oportunista com capacidade de invasão ocorre como resultado de um desequilíbrio na relação hospedeiro-micro-organismo (Kumar *et al.*, 2006; Vidigal; Svidzinski, 2009). Apesar da presença de *Candida* na orofaringe e trato

respiratório ser bastante comum, pneumonia primária raramente se desenvolve, sendo normalmente diagnosticados por biópsia (Vidigal; Svidzinski, 2009).

A associação entre colonização pulmonar por espécies de *Candida* e candidíase oral constatada neste trabalho também foi relatada como um fator de risco para o desenvolvimento de infecções fúngicas localizadas ou sistêmicas (Kemmelmeyer *et al.*, 2008; Dongari-Bagtzoglou *et al.*, 2009).

A colonização prévia da boca por leveduras do gênero *Candida* está associada ao risco elevado de infecções, tanto localizadas como sistêmicas, estas últimas com elevado índice de mortalidade (30 a 40%) (Kemmelmeyer *et al.*, 2008; Dongari-Bagtzoglou *et al.*, 2009).

A candidíase oral é freqüente no idoso e pode exacerbar o estado nutricional precário em pacientes hospitalizados. Se a frequência de candidíase oral reflete apenas a colonização, ou se precede o início de infecção superficial ou disseminada ainda é um assunto em discussão (Fanello *et al.*, 2006).

Para leveduroses, é freqüente o isolamento de mais de uma espécie. Quando comparado a fungos filamentosos, sendo mais frequente em pacientes portadores de mais de uma doença de base, consistindo em marcada imunossupressão. Este achado está relacionado à severa morbidade e mortalidade (Boktour *et al.*, 2004; Jensen *et al.*, 2007). A associação de diferentes espécies em infecções fúngicas pode ser uma causa de falha no tratamento quando, por exemplo, um dos agentes apresenta resistência a qualquer droga antifúngica em particular (Xavier *et al.*, 2008).

No único caso de candidíase oral, para o qual a suspeita clínica era de aspergilose pulmonar, foram observadas raras estruturas fúngicas compatíveis com levedurose em uma amostra de escarro, o que motivou a busca por lesões em cavidade oral. Os achados clínicos e laboratoriais foram compatíveis apenas para candidíase oral, de acordo com Vidigal; Svidzinski, (2009); Campos e Otero (2010).

Neste trabalho, foi diagnosticado um caso de candidíase oral em paciente com DPOC, sendo esta forma clínica relatada em indivíduos que fazem uso prolongado de antibióticos, corticóides, tratamento antineoplásico e outros (Avrella; Goulart, 2008; Stramandinoli *et al.*, 2010). Bonifaz *et al.* (2010) enfatizam a ocorrência cada vez mais freqüente do isolamento de espécies de *Geotrichum* como agente de lesão oral, salientando a relevância da realização de exames laboratoriais para confirmação diagnóstica de candidíase ou geotricose oral.

O caso diagnosticado neste trabalho baseou-se em dados clínicos e achados laboratoriais como recomendados por Lacaz *et al.* (2002) e Bonifaz *et al.* (2010).

O isolamento de *Candida* em cultura de escarro, aspirado traqueal, lavado bronco-alveolar ou punção aspirativa por agulha percutânea pode representar apenas colonização da árvore traqueobrônquica. Futuras pesquisas sobre a importância do isolamento antemortem de *Candida* em amostras respiratórias são necessárias, podendo estes achados serem indicativos de pneumonia por *Candida* (Vidigal; Svidzinski, 2009).

Os sinais e sintomas apresentados pelos pacientes incluíram tosse, expectoração, dispnéia, como os mais freqüentes, e febre, perda de peso, e hemoptise, mais esporadicamente. Nos achados radiológicos pode ser evidenciado infiltrado pulmonar, bronquiectasias, fibrose pulmonar e mais raramente, cavidades pré-existentes. As comorbidades encontradas foram, tuberculose pulmonar, tuberculose multidroga resistente, seqüela de tuberculose pulmonar, fibrose pulmonar, neoplasia de próstata com metástase pulmonar e DPOC, sendo as formas clínicas de tuberculose e suas sequelas as comorbidades mais frequentes.

A co-morbidade mais freqüente neste trabalho foi tuberculose pulmonar, presente em todos os casos de colonização associada à candidíase oral. Kumar *et al.* (2009) relatam que a incidência de candidíase oral é acentuada em pacientes com tuberculose pulmonar, devido a utilização de antimicrobianos por um período prolongado.

Dos oito pacientes com levedurose, quatro foram do sexo masculino e quatro feminino, não havendo prevalência por sexo. A idade dos pacientes variou de 40 a 67 anos, sendo constatada a predominância em pacientes acima de 50 anos. Os pacientes atendidos apresentaram ocupações variadas, não sendo observado nenhum padrão.

Pacientes imunossuprimidos, principalmente aqueles portadores de neoplasias hematológicas e neutropenia grave muitas vezes são susceptíveis à infecções fúngicas invasivas. A maioria dessas micoses é causada por espécies de *Candida* e *Aspergillus*, porém outros fungos oportunistas, como espécies de *Geotrichum*, têm sido ocasionalmente relatados em pacientes imunossuprimidos, especialmente aqueles com leucemia aguda (El Omri *et al.*, 2005).

Geotricose é uma micose oportunista emergente causada por leveduras, tem sido reportada por afetar patologicamente brônquios, pulmões e intestino, e raramente, boca, pele e unhas. As principais espécies envolvidas são *G. candidum*, *G. capitatum* e *G. clavatum* (El Omri *et al.*, 2005; Bonifaz *et al.* 2010).

Tratos digestivo e respiratório têm sido relatados como possíveis portas de entrada, e quadros clínicos de infecção sistêmica por *Geotrichum* muitas vezes são indistinguíveis de candidíase sistêmica e aspergilose invasiva. A colonização fúngica do trato respiratório, urogenital ou gastrointestinal muitas vezes precede a infecção sistêmica, sendo um achado comum a todas as infecções causadas por *Geotrichum*, que é um componente em potencial da microbiota normal dos tratos respiratório e digestivo humano, sendo difícil distinguir entre colonização e infecção (El Omri *et al.*, 2005).

Alguns autores demonstram que o isolamento destas leveduras de sítios superficiais é significativo e correlacionado com o desenvolvimento de infecções invasivas. A doença tem sido associada a um prognóstico desfavorável, apresentando uma taxa de mortalidade superior a 50% (El Omri *et al.*, 2005).

De acordo com De Pauw (2008), neste trabalho não foi possível diagnosticar levedurose pulmonar comprovada, devido a não obtenção de amostras de tecido, sendo os casos classificados como possível candidíase e geotricose pulmonar invasiva. Porém, de acordo Vidigal e Svidzinski (2009), o termo adequado para estes casos é colonização por leveduras.

Segundo Vidigal e Svidzinski, (2009), para pacientes críticos, portadores de neoplasias hematológicas malignas e internos em unidade de terapia intensiva, é recomendado o tratamento como profilaxia, pois este fungo pode causar invasão tecidual devido a um desequilíbrio. Em outros casos, o tratamento fica a critério médico.

4.4. Feohifomicose pulmonar

O diagnóstico micológico de feohifomicose pulmonar foi baseado na observação de filamentos micelianos demáceos (Figura 12) em espécimes clínicos de escarro e obtenção do agente etiológico em cultura (Figura 13), sendo identificado *Cladophialophora devriesii*, um fungo filamentoso demáceo.

As estruturas fúngicas observadas em parasitismo e a identificação do agente etiológico são compatíveis à descrição em literatura para feohifomicose, de acordo com Gonzalez *et al.* (1984), Mitchell *et al.* (1990) e Levin *et al.* (2004).



Figura 12. Exame direto de escarro clarificado com hidróxido de potássio a 20%, mostrando filamentos micelianos demáceos septados compatível com feohifomicose.

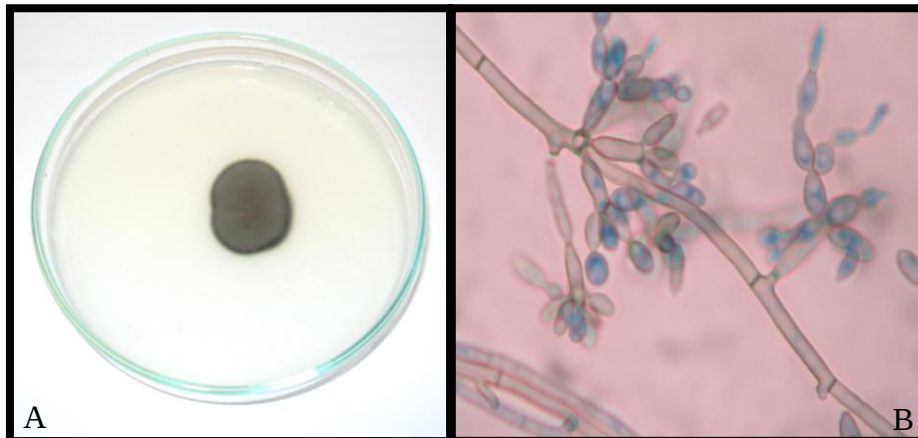


Figura 13. Colônia veludosa, marrom-olivácea (A) apresentando hifas demáceas, septadas, conidióforos verticilióides, catenulados e conídios alongados típicos de *Cladophialophora devriesii* (B).

Os sinais e sintomas apresentados pelo paciente do sexo masculino com 64 anos de idade foram dispnéia e hemoptise maciça freqüente, e a aparência radiológica mostrava extensa seqüela de tuberculose pulmonar, quadro que motivou a suspeita de aspergilose pulmonar.

A partir dos sinais clínicos, sintomas e achados radiológicos, foi realizado o diagnóstico clínico de aspergilose pulmonar e iniciado o tratamento com Itraconazol em doses de 200mg/dia. Amostras clínicas de escarro foram colhidas e o diagnóstico laboratorial micológico revelou estruturas fúngicas compatíveis com feohifomicose pulmonar como filamentos micelianos demáceos tortuosos, e em cultura foi obtido *Cladophialophora devriesii*. Ao tratamento com Itraconazol foi associada a administração de Anfotericina B na dosagem de 0,5 mg por kilo, porém o paciente foi a óbito por parada cardiorrespiratória uma semana após a confirmação do diagnóstico.

Fungos demáceos são responsáveis por uma grande variedade de síndromes infecciosas. São frequentemente encontrados no solo e, geralmente, distribuídos em todo o mundo. Isto sugere que a maioria dos indivíduos é exposto presumivelmente por inalação ou trauma (Revankar, 2006; Lastoria *et al.*, 2009; Li Yang Hsu *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, estes fungos têm sido cada vez mais reconhecidos como importantes patógenos. O espectro de doenças que estão implicados ampliou-se e inclui infecções locais superficiais e profundas, doença alérgica, pneumonia, abscesso cerebral e infecção generalizada. Para algumas infecções em indivíduos imunocompetentes, como sinusite fúngica alérgica e abscesso cerebral, estão entre os agentes etiológicos mais comuns (Costa; Alexander, 2005; Revankar, 2006; Li Yang Hsu *et al.*, 2010).

Esses fungos têm mecanismos patogênicos únicos devido à presença de melanina em sua parede celular, o que confere a característica cor escura a esporos e hifas. O diagnóstico baseia-se na microscopia cuidadosa, cultivo do agente e histopatologia. Espécies de *Cladophialophora* são citadas como agentes de feohifomicoses que incluem desde infecção cutânea até abscesso cerebral (Revankar, 2006; Lastoria *et al.*, 2009). Existem poucos relatos de infecções sistêmicas em receptores de transplante de órgãos sólidos, dos quais a maioria ocorre por *C. bantiana* (Lastoria *et al.*, 2009).

Shigemura *et al.* (2009), relatam um caso de osteomielite femoral por *C. arxii* em paciente portador de doença granulomatosa crônica. Na ocasião, o paciente apresentava granulomas pulmonares e hemoptise, o que levou os autores levantar a hipótese de que o agente fúngico disseminou até o osso pela corrente sanguínea através da lesão pulmonar, que pode ter sido causada por inalação de propágulos fúngicos.

Dentre as espécies de *Cladophialophora*, *C. devriesii* foi citado anteriormente como agente de micose subcutânea (Gonzalez *et al.*, 1984; Howard *et al.*, 2006) e infecção fúngica disseminada (Mitchell *et al.*, 1990), sendo este o terceiro relato desta espécie como

agente de feohifomicose, o segundo como feohifomicose profunda e o primeiro relato como agente de micose pulmonar na América do Sul.

O tratamento recomendado para feohifomicose é uma terapia combinada de anfotericina B, fluocitosina e fluconazol (Naggie; Perfect, 2009).

De acordo com a literatura, neste trabalho feohifomicose pulmonar foi considerada uma micose emergente e rara.

4.5. Caracterização Enzimática

Dos 21 isolados, em 17 foi detectada atividade enzimática com zona de atividade variando de 0,7 cm (+++: forte) a 0,9 cm (+: muito fraca) segundo Serda e Yucel (2002). Dez isolados apresentaram atividade proteolítica em BSA (Figura 14), sete apresentaram no substrato gelatina e um na caseína do leite. Três isolados apresentaram atividade fosfolipásica em lecitina de soja e três apresentaram atividade elastinolítica (Figura 15, Tabela 2).

Todos os isolados que apresentaram atividade nos substratos gelatina, caseína do leite e elastina pertenciam ao gênero *Aspergillus*, enquanto que todos os isolados que apresentaram atividade nos substratos BSA e lecitina de soja foram leveduras pertencentes ao gênero *Candida*. Os isolados de *Geotrichum clavatum* e *Cladophialophora devriesii* não apresentaram atividade em nenhum dos substratos utilizados (Tabela 2).

Neste estudo, em cinco de oito isolados de *A. fumigatus* e um isolado de *A. flavus* foi detectada atividade proteásica colagenolítica no substrato gelatina, representando 66,6%. O isolado de *A. flavus* também apresentou atividade proteásica no substrato caseína do leite. Dos oito isolados de *A. fumigatus* testados, em três foi detectada capacidade de degradar elastina, representando 37,5% dos isolados de *A. fumigatus*, com destaque para o isolado 3 proveniente de escarro, que apresentou atividade forte (+++) (Tabela 2).

Os resultados obtidos neste estudo mostram que 100% dos isolados do gênero *Candida* apresentaram atividade proteolítica no BSA e três isolados apresentaram atividade fosfolipásica na lecitina de soja. O isolado 19 de *C. tropicalis* mostrou a maior atividade proteolítica (+++), e o isolado 14 de *C. albicans* maior atividade fosfolipásica (++) (Tabela 2).



Figura 14. Presença de halo (↑) ao redor de colônia de *Candida albicans* indicando atividade proteásica no substrato soro de albumina bovina (BSA).

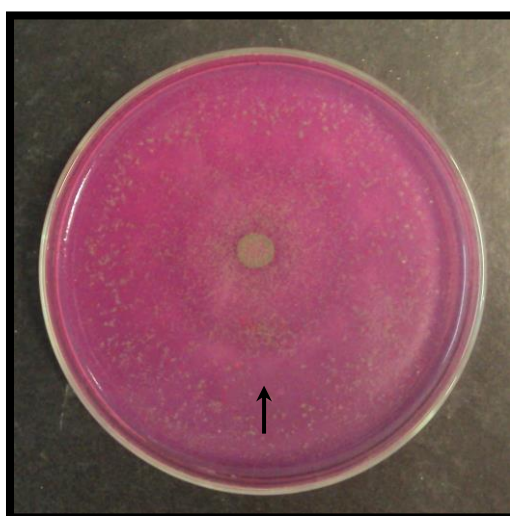


Figura 15. Presença de halo (↑) ao redor de colônia de *Aspergillus fumigatus* indicando atividade elastinolítica.

Tabela 2. Detecção de enzimas hidrolíticas como fatores de virulência em fungos isolados de amostras de escarro, secreção de cavidade oral, lavado broncoalveolar e fragmentos de tecido pulmonar de pacientes internos do Setor de Pneumologia do Hospital Geral Otávio de Freitas.

Enzimas								
Isolado	Espécie	Amostra clínica	Proteases			Fosfolipases		
			Elastase ZA (mm)	Caseína do leite ZA (mm)	BSA ZA (mm)	Gelatina	Gema de ovo ZA (mm)	Lecitina de soja ZA (mm)
1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Escarro	-	-	-	+	-	-
2	<i>A. fumigatus</i>	Escarro	0,83	-	-	+	-	-
3	<i>A. fumigatus</i>	Escarro	0,75	-	-	+	-	-
4	<i>A. fumigatus</i>	Escarro	-	-	-	-	-	-
5	<i>A. fumigatus</i>	Escarro	-	-	-	-	-	-
6	<i>A. fumigatus</i>	LBA	-	-	-	+	-	-
7	<i>A. fumigatus</i>	Escova endobrônquica	0,80	-	-	-	-	-
8	<i>A. fumigatus</i>	Fragmento de tecido	-	-	-	+	-	-

Legendas:

ZA: Zona de atividade

BSA: Soro de albumina bovina

LBA: Lavado bronco-alveolar

- : Ausência de atividade

+: Presença de atividade

Continuação da tabela 2.

Enzimas								
Isolado	Espécie	Amostra clínica	Proteases			Fosfolipases		
			Elastase ZA (mm)	Caseína do leite ZA (mm)	BSA ZA (mm)	Gelatina	Gema de ovo ZA (mm)	Lecitina de soja ZA (mm)
9	<i>A. flavus</i>	Escarro	-	0,83		+	-	-
10	<i>Candida albicans</i>	Escarro	-	-	0,82	-	-	-
11	<i>C. albicans</i>	Escarro	-	-	0,82	-	-	0,90
12	<i>C. albicans</i>	Escarro	-	-	0,92	-	-	-
13	<i>C. albicans</i>	Escarro	-	-	0,92	-	-	-
14	<i>C. albicans</i>	Escarro	-	-	0,82	-	-	0,83
15	<i>C. albicans</i>	Secreção de cavidade oral	-	-	0,88	-	-	0,90
16	<i>C. albicans</i>	Secreção de cavidade oral	-	-	0,83	-	-	-
17	<i>C. albicans</i>	Secreção de cavidade oral	-	-	0,93	-	-	-

Legendas:

ZA: Zona de atividade

BSA: Soro de albumina bovina

LBA: Lavado bronco-alveolar

- : Ausência de atividade

+: Presença de atividade

Continuação da tabela 2.

Enzimas								
Isolado	Espécie	Amostra clínica	Proteases			Fosfolipases		
			Elastase ZA (mm)	Caseína do leite ZA (mm)	BSA ZA (mm)	Gelatina	Gema de ovo ZA (mm)	Lecitina de soja ZA (mm)
18	<i>C. tropicalis</i>	Escarro	-	-	0,9	-	-	-
19	<i>C. tropicalis</i>	Secreção de cavidade oral	-	-	0,74	-	-	-
20	<i>Geotrichum clavatum</i>	Escarro	-	-	-	-	-	-
21	<i>Cladophialophora devriesii</i>	Escarro	-	-	-	-	-	-

Legendas:

ZA: Zona de atividade

BSA: Soro de albumina bovina

LBA: Lavado bronco-alveolar

- : Ausência de atividade

+: Presença de atividade

Tolerância à temperatura, taxa de crescimento, tamanho dos conídios, adesinas, produção de pigmentos, metabólitos tóxicos e enzimas extracelulares são fatores de virulência de espécies de *Aspergillus* (Tomee *et al.*, 1994; Al-Alawi *et al.*, 2005; Okumura *et al.*, 2004; Alp; Arikan, 2008).

Para invadir o hospedeiro, espécies de *Aspergillus* apresentam, dentre os fatores de virulência, adesinas, que são proteínas presentes na parede celular da célula fúngica que permitem a adesão do patógeno ao sítio da infecção, bem como enzimas que atuam na penetração dos tecidos, explicando em parte a patogênese deste patógeno oportunista durante o mecanismo de infecção (Alp; Arikan, 2008).

Colagenases são proteases capazes de degradar colágeno, que é constituinte predominante de pele, tendões e cartilagem, bem como o componente orgânico de ossos, dentes e córnea, representando aproximadamente 25 a 33% da proteína total dos mamíferos. É encontrado nos tecidos conjuntivos de quase todos os órgãos, como fibras insolúveis embebidas em mucopolissacarídeos e proteínas da matriz extracelular, tendo como função estruturar e conferir resistência aos tecidos. Consequentemente, qualquer processo que resulte em degradação ou perda da integridade desta proteína tem implicações significativas para a saúde (Harrington, 1996; Lima *et al.*, 2009).

A digestão dos componentes do parênquima pulmonar, como o colágeno e a elastina, constitui uma causa importante de necrose e hemoptise, e a secreção de enzimas que degradam estes compostos pode ser a principal causa destes sintomas, frequentemente relatados nos pacientes com aspergilose pulmonar (Hohl; Feldmesser, 2007; Alp; Arikan, 2008; Amchentsev *et al.*, 2008; Dagenais; Keller, 2009).

A evidência de um possível envolvimento de elastase na patogênese da aspergilose foi primeiro documentada por Kothary *et al.* (1984).

A detecção elastinolítica em 37,5% das culturas *A. fumigatus* isoladas de amostras clínicas de casos com diferentes formas clínicas de aspergilose também é relatada por Kothary *et al.* (1984); Blanco *et al.*, (2002) e Alp; Arikan (2008).

A atividade elastinolítica é documentada como acentuada em agentes de aspergilose invasiva (Kothary *et al.*, 1984; Blanco *et al.*, 2002; Alp; Arikan, 2008).

A não detecção de protease no substrato BSA e fosfolipase por *A. fumigatus* contradiz aos dados obtidos por Shen *et al.* (2004); Birch *et al.* (2004) e Alp e Arikan (2008).

Alp e Arikan (2008) afirmam que a existência e o grau das atividades da elastase, protease e fosfolipase em isolados de *Aspergillus* clínicos tendem a apresentar variações dentro das espécies e do isolado testado.

C. albicans é considerada a mais virulenta deste gênero, e muitos fatores de virulência têm sido descritos, incluindo a secreção de enzimas hidrolíticas. Dois tipos de enzimas parecem ser mais importantes: proteases e fosfolipases. Proteases são capazes de degradar proteínas da barreira epitelial e da mucosa como colágeno, queratina e mucina, como também anticorpos, complemento e citocinas, e fosfolipases danificam as membranas das células do hospedeiro, auxiliando na invasão de tecidos do hospedeiro (Borst; Fluit, 2003).

A detecção de atividade proteolítica em *C. albicans* e *C. tropicalis* utilizando BSA como substrato, verificada neste trabalho, bem como fosfolipásica, no substrato lecitina de soja, está corroborada por Borst; Fluit (2003); Kumar *et al.* (2006); Kumar *et al.* (2009).

A não detecção proteolítica no substrato caseína do leite em isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* contrasta com os resultados obtidos por Kumar *et al.* (2009), que verificaram que isolados de cavidade oral de pacientes com tuberculose pulmonar mostraram significativamente maior atividade proteásica. Por outro lado, quando utilizando gelatina, não foi detectada atividade proteolítica, como constatada neste trabalho.

A produção de protease por *C. albicans* não depende apenas do tipo de isolado ou tipo de infecção, mas também do tipo fenotípico, condições ambientais e até mesmo da fase de infecção (De Bernardis *et al.*, 2001).

Borst e Fluit (2003) afirmam que a detecção de protease e fosfolipase é maior em isolados provenientes de infecções respiratórias, quando comparados a culturas de outros sítios corpóreos e consideram que isolados de *C. albicans* agentes de infecções respiratórias podem ser originados da própria cavidade oral do paciente. Afirmam ainda que *C. albicans* isolada da cavidade oral de voluntários saudáveis demonstra baixa atividade fosfolipásica, enquanto que isolados clínicos de cavidade oral de pacientes com candidíase oral produzem taxas altas desta enzima, porém outros estudos são necessários para elucidar se isto é causado pela seleção de isolados mais virulentos que fazem parte da microbiota dos pacientes.

A patogenicidade de espécies de *Candida* é resultado das características dos isolados, estado imunológico do hospedeiro e condições locais dos sítios de infecção (Kumar *et al.*, 2009).

Fungos demácios são relatados como produtores de proteases e fosfolipases, dentre estes *Cladophialophora bantiana* (Souza *et al.*, 2008), contudo poucos são os relatos de *C.*

devriesii como agentes de micoses e nenhum trabalho referente a detecção destas enzimas foi descrito; assim como para *Geotrichum clavatum*.

Não foi possível estabelecer correlação entre os danos ao hospedeiro e a detecção enzimática, tendo em vista que a maioria dos isolados utilizou dois substratos, bem como o isolado obtido do caso de candidíase oral apresentou melhor perfil enzimático quando comparado ao isolado de aspergilose confirmada.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir:

- Micoses pulmonares, colonização por leveduras e candidíase oral ocorrem em pacientes internos em hospital de referência para pneumologia, afetando o sexo masculino com maior frequência.
- Estruturas fúngicas em parasitismo observadas em escarro e lavado bronco-alveolar permitem o diagnóstico provável de aspergilose.
- Diagnóstico conclusivo de aspergilose é baseado nos dados clínicos, de imagem e laboratoriais.
- *Aspergillus fumigatus* permanece como principal agente de aspergilose pulmonar.
- Dentre os fatores que predis põem o hospedeiro à infecções fúngicas pulmonares, sequela de tuberculose é o mais freqüente, com destaque para aspergilose pulmonar.
- Pacientes jovens do sexo masculino têm nove vezes mais chance de desenvolver aspergilose pulmonar em relação ao sexo feminino.
- Estruturas de leveduras observadas em escarro permitem o diagnóstico de colonização pulmonar por leveduras.
- *Candida albicans* persiste como a principal levedura isolada de colonização pulmonar e candidíase oral.
- Feohifomicose pulmonar é uma micose emergente e rara.
- *Cladophialophora devriesii* é citada pela terceira vez como agente de feohifomicose sendo o primeiro relato como agente de micose pulmonar na América do Sul.
- Existem equívocos de diagnóstico entre tuberculose pulmonar e outras infecções bacterianas com formas clínicas de aspergilose, como também foi verificado equívoco entre aspergilose pulmonar e feohifomicose pulmonar.
- Fungos isolados de amostras do trato respiratório superior e cavidade oral podem expressar enzimas relacionadas à patogenicidade.
- Não foi possível estabelecer correlação entre os danos ao hospedeiro e a detecção enzimática.

REFERÊNCIAS

- Abad, A., Fernández-Molina, J.V., Bikandi, J., Ramírez, A., Margareto, J., Sendino, J., Hernando, F.L.H., Pontón, J., Garaizar, J., Rementeria, A. 2010. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Revista Iberoamericana de Micología* 27 (4): 155-182.
- Ajello, L., George, L.K., Steigbigel, R.T., Wang, C.J. 1974. A case of phaeohyphomycosis caused by new species of *Phialophora*. *Mycology* 66: 490-498.
- Al-Alawi, A., Ryan, C.F., Flint, J.D., Müller, N.L. 2005. Aspergillus-related lung disease. *Cancer Respiratory Journal* 12 (7): 377-387.
- Al-Moudi, O.S. 2001. Allergic bronchopulmonary aspergillosis mimicking pulmonary Tuberculosis. *Saudi Med Journal* 22: 708-13.
- Alp, S., Arikan, S. 2008. Investigation of extracellular elastase, acid proteinase and phospholipase activities as putative virulence factors in clinical isolates of *Aspergillus* species. *Journal of Basic Microbiology* 48: 1-7.
- Almeida, O.P., Jorge Junior, J., Scully, C. 2003. Paracoccidioidomycosis of the mouth: an emerging deep mycosis. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 4: 268-274.
- Amchentsev, A., Kurugundla, N., Saleh, A.G. 2008. *Aspergillus*-related lung disease. *Respiratory Medicine CME* (1) 3: 205-215.
- Ameen, M., Arenas, R. 2009. Developments in the management of mycetomas. *Clin Exp Dermatol.* 34 (1): 1-7.
- Aoki, S., Ito-Kuwa, S., Nakamura, Y., Masuhara, T. 1990. Comparative pathogenicity of wild-type strain and respiratory mutants of *Candida albicans* in mice. *Zentralblatt für Bakteriologie* 273: 332-343.
- Ascioglu, S., Rex, J. H., De Pauw, B., Bennett, J.E., Bille, J.; Crokaert, F., Denning, D. W., Donnelly, J.P., Edwards, J.E., Erjavec, Z., Fiere, D., Lortholary, O., Maertens, J., Meis, J. F., Patterson, T. F., Ritter, J., Selleslag, D., Shah, P.M., Stevens, D.A., Walsh, T.J. 2002. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clinical Infectious Diseases* 34: 7-14.
- Aunstrup, K. 1974. Industrial production of enzymes. Em: *Industrial Aspects of Biochemistry*, Federation of European Biochemical Societies, Amsterdam, Spencer, B. (ed.), pp23-46.
- Avrella, D, Goulart, L. S. 2008. Isolamento de *Candida* spp da mucosa oral de pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico. *Revista Brasileira de Análises Clínicas* 40 (3): 205-207.
- Barnett, J.A., Paine, R.W., Yarrow, D. 2000. *Yeasts: Characteristics and Identification*. 3rd edition. Cambridge University Press, Cambridge.
- Barroso, B., Abello, N., Bischoff, R. 2006. Study of human lung elastin degradation by different elastases using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 358 (2): 16-224.

- Benito, N., Moreno-Camacho, A., Torres, A. 2008. Pulmonary Infiltrates in HIV Patients in the Highly Active Antiretroviral Therapy Era [Respiratory Infections]. *Clinical Pulmonary Medicine* 15 (6): 313-324.
- Birch, M., Denning, D.W., Robson, G.D. 2004. Comparison of extracellular phospholipase activities in clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates. *Medical Mycology* 42 (1): 81-86.
- Binder, C., Rüschel, R. 2000. Mixed systemic mycoses with fatal outcome in a patient with acute myeloblastic leukaemia. *Mycoses* 43: 59-63.
- Bonifaz, A., Vázquez-González, D., Macías, B., Paredes-Farrera, F., Hernández, M.A., Araiza, J., Ponce, R.M. 2010. Oral geotrichosis: report of 12 cases. *Journal of Oral Science* 52 (3): 477-83.
- Boktour, M.R., Kontoyiannis, D.P., Hanna, H.A., Hachem, R.Y., Girgawy, E., Bodey, G. P., Raad, I.I. 2004. Multiple-Species Candidemia in Patients with Cancer. *Cancer* 101 (8): 1860-1865.
- Borst, A., Fluit, A.G. 2003. High levels of hydrolytic enzymes secreted by *Candida albicans* isolates involved in respiratory infections. *Journal of Medical Microbiology* 52: 971-974.
- Blanco, J.L., Hontecillas, R., Bouza, E., Blanco, I., Pelaez, T., Muñoz, P., Perez Molina, J., Garcia, M.E. 2002. Correlation between the elastase activity index and invasiveness of clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology* 40 (5): 1811-1813.
- Brandt, M.E., Warnock, D.W. 2003. Epidemiology, clinical manifestations, and therapy of infections caused by dematiaceous fungi. *Journal of Chemotherapy* 15 (2): 36-47.
- Caligorne, R.B. 2007. Biodiversidade e Taxonomia de fungos negros, patógenos humanos. (5º Congresso Brasileiro de Micologia, Anais).
- Campos, J.G.S., Otero, D.D.C. 2010. Micosis pulmonares. *Medicine* 10 (67): 4597-4604.
- Camuset, J., Lavolé, A., Wislez, M., Khalil, A., Bellocq, A., Bazelly, B., Mayaud, C., Cadranet, J. 2007. Bronchopulmonary aspergillosis infections in the non-immunocompromised patient. *Revista de Pneumologia Clinica* 63: 155-166.
- Carranza, J.M. 1949. *Técnicas e métodos elementares para el estudio de hongos sitopáfitos*. 2ª edición, Universidad Nacional de La Plata, Bolívia.
- Castón-Osorio, J.J.; Rivero, A.; Torre-Cisneros, J. 2008. Epidemiology of invasive fungal infection. *International Journal of Antimicrobial Agents* 32 (2): 103-109.
- Colombo, A.L. 2007. Diagnóstico de doenças fúngicas oportunistas: o grande desafio para os centros médicos de atendimento terciário. *Prática Hospitalar* 9 (52): 12-17.
- Costa, S.F., Alexander, B.D. 2005. Non-*Aspergillus* Fungal Pneumonia in Transplant Recipients. *Clinical Chest Medicine* 26: 675 – 690.
- Cuenca-Estrella, M., Bernal-Martinez, L., Buitrago, M.J., Castelli, M.V., Gomez-Lopez, A., Zaragoza, O., Rodriguez-Tudela, J.L. 2008. Update on the epidemiology and diagnosis of invasive fungal infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 32 (2): 143-147.

- Dagenais, T.R.T., Keller, N.P. 2009. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 22 (3): 447–465.
- Dalmau, L.M. 1929. Remarques sur la technique mycologique. Caractères macroscopiques des cultures de champignons. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 7: 536–541.
- De Bernardis, F., Sullivan, P.A., Cassone, A. 2001. Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity. *Medical Mycology* 39: 303–313.
- De Hoog, G.S., Guarro, J., Gene, J., Figueras, M.J. 2000. *Atlas of Clinical Fungi*. 2nd edition, Utrecht, The Netherlands. Centraalbureau voor Schimmelfcultures.
- De Hoog, G.S., Smith, M.T. 2004. Ribosomal gene phylogeny and species delimitation in *Geotrichum* and its teleomorphs. *Studies in Mycology* 50: 489–515.
- De Pauw, B., Walsh, T.J., Donnelly, J.P., Stevens, D.A., Edwards, J.E., Calandra, T., Pappas, P.G., Maertens, J., Lortholary, O., Kauffman, C.A., Denning, D.W., Patterson, T.F., Maschmeyer, G., Bille, J., Dismukes, W.E., Herbrecht, R., Hope, W.W., Kibbler, C.C., Kullberg, B.J., Marr, K.A., Muñoz, P., Odds, F.C., Perfect, J.R., Restrepo, A., Ruhnke, M., Segal, B.H., Sobel, J.D., Sorrell, T.C., Viscoli, C., Wingard, J.R., Zaoutis, T., Bennett, J.E. 2008. Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clinical Infectious Diseases* 46 (12):1813–1821.
- De Pauw, B.E., Picazo, J.J. 2008. Present situation in the treatment of invasive fungal infection. *International Journal of Antimicrobial Agents* 32 (2):167–171.
- De Valk, H.A., Klaassen, C.H.W., Méis, J.F.G.M. 2008. Molecular typing of *Aspergillus* species. *Mycoses* 51: 463–476.
- Delisle, M.S., Williamson, D.R., Perreault, M.M., Albert, M., Jiang, X., Heyland, D.K. 2008. The clinical significance of *Candida* colonization of respiratory tract secretions in critically ill patients. *Journal of Critical Care* 23 (1): 11-17.
- Dongari-Bagtzoglou, A., Dwivedi, P., Ioannidou, E., Shaqman, M., Hull, D., Burleson, J. 2009. Oral *Candida* infection and colonization in solid organ transplant recipients. *Oral Microbiology and Immunology* 24 (3): 249-54.
- El Omri, H., Fathallah-Mili, A., Youssef, Y.B., Amara, H., Said, M.B., Khelif, A. 2005. *Geotrichum capitatum* septicemia in neutropenic patient, case report and review. *Journal de Mycologie Médicale* 15: 242–246.
- Falcone, M., Accarpio, F., Venditti, M., Vena, A., Sibio, S., Sammartino, P., Di Giorgio, A. 2010. Septic bilateral pulmonary candidiasis successfully treated with anidulafungin therapy in two patients with peritoneal carcinomatosis. *Journal of Antimicrobials Chemotherapy* 2266-2267.
- Fanello, S. Bouchara, J.P., Sauteron, M., Delbos, V., Parot, E., Marot-Leblond, A., Moalic, E., Le Flohic, A.M., Brangerd, B. 2006. Predictive value of oral colonization by *Candida* yeasts for the onset of a nosocomial infection in elderly hospitalized patients. *Journal of Medical Microbiology* 55: 223–228.
- Feldmesser, M. 2005. Prospects of vaccines for invasive aspergillosis. *Medical Mycology* 43 (7): 571-587.

- Franquet, T, Muller, N.L., Giménez, A., Guembe, P., de La Torre, J., Bagué, S. 2001. Spectrum of pulmonary aspergillosis: histologic, clinical, and radiologic findings. *Radiographics* 21 (4): 825-37.
- Franquet, T., Muller, N.L., Lee, K.S. et al. 2005. Pulmonary candidiasis after hematopoietic stem cell transplantation: thin-section CT findings. *Radiology* 236: 332–337.
- Gangneux, J.P., Camus, C., Philippe, B. 2010. Epidemiology of invasive aspergillosis and risk factors in non neutropaenic patients. *Revue des Maladies Respiratoires* 27 (8): 34-46.
- Geftter, W.B., Weingrad, T.R., Epstein, D.M., Ochs, R.H. Miller, W.T. 1981. "Semi-invasive" pulmonary aspergillosis: a new look at the spectrum of *Aspergillus* infections of the lung. *Radiology* 140: 313-321.
- Ghannoum, A.M. 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews* 13 (1): 122-143.
- Girmania, C., Pagano, L., Martino, B., D'antonio, D., Fanci, R., Specchia, G., Melillo, L., Buelli, M., Pizzarelli, G., Venditti, M., Martino, P. 2005. Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (4): 1818-1828.
- Gomes, M., Faresin, S.M. (eds.) 2007. Pneumologia- Atualização e Reciclagem. Volume 7. São Paulo: Editora Roca; Sociedade Paulista de Pneumologia e Tisiologia.
- Goldenberg, S., Price, N. 2008. Opportunistic fungal lung infections. *Medicine* 36 (6): 10-18.
- Gonzalez, M.S., Alfonso, B., Seckinger, D., Padhye, A.A., Ajello, L. 1984. Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Cladosporium devriesii*, sp. nov. *Medical Mycology* 22 (5): 427-432.
- Hae-Seong Nam, Kyeongman Jeon, Sang-Won Um, Gee Young Suh, Man Pyo Chung, Hojoong Kim, O. Jung Kwon and Won-Jung Koh. 2010. Clinical characteristics and treatment outcomes of chronic necrotizing pulmonary aspergillosis: a review of 43 cases. *International Journal of Infectious Diseases* 14 (6): 479-482.
- Hanel, H., Kirs, R., Schimids, H. 1995. New systematically active antimycotics from the beta-blocher category. *Mycoses* 38: 251-264.
- Hao, W., Pan, Y., Ding, Y., Xiao, S., Yin, K., Wang, Y., Qiu, L., Zhang, Q., Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Yuen, K., Che, X. 2008. Well-Characterized monoclonal antibodies against cell wall antigen of *Aspergillus* species improve immunoassay specificity and sensitivity. *Clinical and vaccine immunology* 15: 194–202.
- Harrington, D.J. 1996. Bacterial Collagenases and Collagen-Degrading Enzymes and Their Potential Role in Human Disease *Infection and Immunity* 64 (6): 1885–1891
- Hohl, T.M., Feldmesser, M. 2007. *Aspergillus fumigatus*: Principles of pathogenesis and host defense. *Eukaryotic Cell* 6 (11): 1953–1963.
- Hogan, L.H, Klein, B.S., Levitz, L.M. 1996. Virulence Factors of Medically Important Fungi. *Clinical Microbiology Reviews* 9 (4): 469–488.

- Howard, S.J., Walker, S.L., Andrew, S.M., Borman, A.M. Johnson, E.M., Denning, D.W. 2006. Sub-cutaneous phaeohyphomycosis caused by *Cladophialophora devriesii* in a United Kingdom resident. *Medical Mycology* 44 (6): 553-556.
- Hummel, M., Buchheidt, D. 2007. Molecular and serological diagnosis of invasive aspergillosis. *Mycoses* 50: 18–23.
- Ibrahim, A.S., Mirbod, S.G., Filler, Y., Banno, G.T., Cole, Y., Litjima, J.E., Edwards, J.R. 1995. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infection and Immunity* 63: 1993-1998.
- Javidan-Nejad, C., Bhalla, S. Bronchiectasis. 2010. *Thoracic Surgery Clinics* 20 (1): 85-102.
- Jensen, J., Munoz, P., Guinea, J., Rodriguez-Creixems, M., Pelaez, T., Bouza, B. 2007. Mixed Fungemia: Incidence, Risk Factors, and Mortality in a General Hospital. *Clinical Infectious Diseases* 44: 109–114.
- Kant, S., Sanjay, S. 2007. Allergic brochopulmonary aspergillosis mimicking as pulmonary tuberculosis. *Lung India* 24: 142-144.
- Kemmelmeier, E.G., Ferreira, M.E., Stefano Filho, L.C., Svidzinski, T.I.E. 2008. Colonização da mucosa oral por leveduras, em pacientes oncológicos, encaminhados para quimioterapia em Maringá - PR. *Ciências e Cuidados em Saúde* 7 (1): 69-75.
- Khan, A.N., Jones, C., Macdonald, S. 2003. Bronchopulmonary aspergillosis: a review. *Current Problems in Diagnostic Radiology* 32 (4):156-168.
- Koga-Ito, C. Y., Lyon, J.P., Vidotto, V., Resende, M.A. 2006. Virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from oral candidosis patients and control individuals. *Mycopathologia* 161: 219–223.
- Kothary, M.H., Chase Junior, T., Macmillan, J.D. 1984. Correlation of elastase production by some strains of *Aspergillus fumigatus* with ability to cause pulmonary invasive aspergillosis in mice. *Infection and Immunity* 43(1): 320-325.
- Kuan-Yu Chen, Shiann-Chin Ko, Po-Ren Hsueh, Kwen-Tay Luh, Pan-Chyr Yang. 2001. Pulmonary fungal infection: emphasis on microbiological spectra, patient outcome, and prognostic factors. *Chest* 120: 177-184.
- Klich, M.A. Identification of common *Aspergillus* species. 2002. Utrecht, The Netherlands. Centraalbureau voor Schimmelcultuur.
- Kumar, R. 2000. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of 29 Cases. *Ind. J. Tub.* 47: 237.
- Kumar, C.P.J., Kumar, S.S.J., Menon, T. 2006. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. *Mycopathologia* 161: 213–218.
- Kumar, K.K., Hallikeri, K. 2008. Phaeohyphomycosis. *Indian Journal of Pathology and Microbiology* 51 (4): 556-8.
- Kumar, V.G.; Latha, R.; Vedhagiri, K.; Sathiamoorthi, T.; Jayarani, G.; Sasikala, R.; Selvin, J.; Natarajaseenivasan, K. 2008. Phospholipase C, proteinase and hemolytic activities of *Candida* spp. isolated from pulmonary tuberculosis patients. *Journal of Mycologie Médicale* 19 (1): 3-10.

- Kumar, V.G., Latha, R., Vedhagiri, K., Sathiamoorthi, T., Jayarani, G., Sasikala, R., Selvin, J., Natarajaseenivasan, K. 2009. Phospholipase C, proteinase and hemolytic activities of *Candida* spp. isolated from pulmonary tuberculosis patients. *Journal de Mycologie Médicale* 19: 3-10.
- Lacaz, C.S., Porto, E., Martins, J.E.C., Vaccari, E.M.H., Melo, N.T. 2002. *Tratado de Micologia Médica*. 9ª edição, Sarvier, São Paulo.
- Lacroix, C., de Chauvin, M. F. 2005. Infections dues à *Trichosporon* spp. et à *Geotrichum* spp. *EMC-Maladies Infectieuses* 2: 97-104.
- Lastoria, C., Cascina, A., Bini, F., Di Matteo, A., Cavanna, C., Farina, C., Carretto, E., Meloni, F. 2009. Pulmonary *Cladophialophora boppii* Infection in a Lung Transplant Recipient: Case Report and Literature Review. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 28 (6): 635-637.
- Latgé, J.P. 2003. *Aspergillus fumigatus*, a saprotrophic pathogenic fungus. *Mycologist* 17 (2): 56-61.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. 2002. *Princípios de bioquímica*. 3ª edição, Sarvier, São Paulo. 975p.
- Levin, T.P. Baty, D.E., Fekete, T., Truant, A.L., Suh, B. 2004. *Cladophialophora bantiana* Brain Abscess in a Solid-Organ Transplant Recipient: Case Report and Review of the Literature. *Journal of Clinical Microbiology* 42 (9): 4374-4378.
- León, C, Álvarez-Lerma, F., Ruiz-Santana, S., León, M.A., Nolla, J., Jordá, R., Saavedra, P., Palomar, M., The EPCAN Study Group. Fungal colonization and/or infection in non-neutropenic critically ill patients: results of the EPCAN observational study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 28 (3): 233-242.
- Lima, C.A., Rodrigues, P.M.B, Porto, T.S., Viana, D.A., Lima Filho, J.L., Porto, A.L.F., Cunha, M.G.C. 2009. Production of a collagenase from *Candida albicans* URM3622. *Biochemical Engineering Journal* 43: 315-320.
- Lumbreras, C.; Gavalda, J. 2003. Aspergilosis invasora: manifestaciones clínicas y tratamiento. *Revista Iberoamericana de Micología* 20: 79-89.
- Li Yang Hsu, Esther Shu-Ting Ng, Liang Piu Koh. 2010. Common and Emerging Fungal Pulmonary Infections. *Infectious Disease Clinical North America* 24: 557-577.
- Macêdo, D.P.C., Farias, A.M.A., Lima Neto, R.G., Silva, V.K.A., Leal, A.F.G., Neves, R.P. 2009. Opportunistic yeast infections and enzymatic profile of the etiological agents. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 42 (2): 188-191.
- Macias, P., Peces, E.C., Zambrano, C.D., Torrado, C., Jimenez, V. 2004. Four patients with mucormycosis in a postoperative recovery unit. *Revista Espanhola de Anestesiologia e Reanimação* 51 (7): 385-389.
- Magill, S.S., Swoboda, S.M., Johnson, E.A., Merz, W.G., Pelz, R.K., Lipsett, P.A., Hendrix, C.W. 2006. The association between anatomic site of *Candida* colonization, invasive candidiasis, and mortality in critically ill surgical patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 55 (4): 293-301.
- Marshall, H., Jones, S., Williams, A. 2010. Chronic pulmonary aspergillosis - longterm follow-up over 20 years, a case report. *Journal of Radiology Case Reports* 1: 424.

- Mayser, P., Laabs, S., Hener, K., Gründe, K. 1996. Detecção of extracellular phospholipase activity in *Candida albicans* and *Rhodotorula rubra*. *Mycopathologia* 135: 149-155.
- Mellon, J.E., Cotty, P.J., Dowd, M.K. 2007. *Aspergillus flavus* hydrolases: their roles in pathogenesis and substrate utilization. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77: 497-504.
- Menezes, E.A., Cavalcante, M.S., Farias, R.B., Teixeira, A.B., Pinheiro, F.G., Bezerra, B.P., Torres, J.C.N., Cunha, F.A. 2005. Frequência e atividade enzimática de *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de crianças de uma creche da prefeitura de Fortaleza. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 41 (1): 17-24.
- Mímica, L.M.J, Ueda, S.M.Y., Martino, M.D.V, Navarini, A., Martini, I.J. 2009. Diagnóstico de infecção por *Candida*: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 45 (1): 17-23.
- Mitchell, D.M., Fitz-Henley, M., Horner-Bryce, J. 1990. A case of disseminated phaeohyphomycosis caused by *Cladosporium devriesii*. *West Indian Medicine Journal* 39: 118-123.
- Monoda, M., Capoccia, S., Lechenne, B., Zaugg, C., Holdom, M., Jousson, O. 2002. Secreted proteases from pathogenic fungi. *International Journal of Medical Microbiology* 292: 405- 419.
- Muzyka, B.C. Oral fungal infections. 2005. *Dental Clinics of North America* 49 (1): 49-65.
- Naggie, S., Perfect, J.R. 2009. Molds: Hyalohyphomycosis, Phaeohyphomycosis, and Zygomycosis. *Clinical Chest Medicine* 30: 337-353.
- Neder, R.N. 1992. *Microbiologia: Manual de Laboratório*. São Paulo: Ed. Nobel.
- Nowakowska, D., Kurnatowska, A., Stray-Pedersen, B., Wilczynski, J. 2004. Activity of hydrolytic enzymes in fungi isolated from diabetic pregnant women: Is there any relationship between fungal alkaline and acid phosphatase activity and glycemic control?. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 112: 374-83.
- Oksuz, S.; Sahin, I.; Yildirim, M.; Gulcan, A.; Yavuz, T.; Kaya, D.; Koc, A.N. 2007. Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. *Japanese Journal of Infectious Disease* 60: 280-283.
- Okumura, Y., Ogawa, K., Nikai, T. 2004. Elastase and elastase inhibitor from *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. *Journal of Medical Microbiology* 53: 351-354.
- Pittet, D., Monod, M., Suter, P.M., Frenk, E., Auckenthaler, R. 1994. *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg.* 220 (6): 751-758.
- Price, M.F., Cawson, R.A. 1977. Phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 15: 179-185.

- Price, M.F., Walkison, I.D., Gentry, L.O. 1982. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 20: 7-14.
- Procop, G.W., Roberts, G.D. 2004. Emerging fungal diseases: the importance of the host. *Clinical Laboratorial Medicine* 24: 691-719.
- Randhawa, H.S. 2000. Respiratory and systemic mycoses: an overview. *The Indian Journal of Chest Diseases and Allied Sciences* 42: 207-219.
- Rapper, K.B., Fennel, D.I. 1977. *The genus Aspergillus*, 3rd edition. Florida: Publishing Company Malabar.
- Revankar, S.G. Phaeohyphomycosis. 2006. *Infectious Disease Clinics of North America* 20: 609-620.
- Revankar, S.G., Patterson, J.E., Sutton, D.A., Pullen, R., Rinaldi, M.G. 2002. Disseminated phaeohyphomycosis: review of an emerging mycosis. *Clinical Infectious Diseases* 34 (4): 467-76.
- Ricard, J.D., Roux, D. 2009. *Candida* pneumonia in the ICU: myth or reality? *Intensive Care Medicine* 35: 1500-1502.
- Riscili, B.P., Wood, K.L. 2009. Fungal Diseases Noninvasive Pulmonary *Aspergillus* Infections. *Clinics in Chest Medicine* 30 (2): 315-335.
- Rhoades, R.A., Tane, G.A. 2005. *Fisiologia Médica*. 2^a ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro.
- Romero, J.F., Garcia, L.A., Salas J.A., Díaz, M., Quirós, L.M. 2001. Production, purification and characterization of extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown in whey. *Process Biochemistry* 36: 507-515.
- Sagan, D., Gozdzik, K., Korobowicz, E. 2010. Predictive and Prognostic Value of Preoperative Symptoms in the Surgical Treatment of Pulmonary Aspergilloma. *Journal of Surgical Research* 163 (2): 35-43.
- Santos, V.M., Fatureto, M.C., Saldanha, J.C., Adad, S.J. 2000. Pulmonary adiaspiromycosis: report of two cases. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 33: 483-488.
- Sánchez, C.D., Viña, A.L. 2004. Pulmonary Aspergillosis. *Archivos Bronconeumologia* 40 (3): 114-22.
- Sales, M.P.U. 2009. Aspergillosis: from diagnosis to treatment. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 35 (12): 1238-1244.
- Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco. 2008. *Hospitais Públicos-Recife e Região Metropolitana*. Disponível em: <<http://www.saude.pe.gov.br/>> Acesso em: 23 de dezembro de 2008.
- Segal, B.H. 2009. Aspergillosis. *New England Journal of Medicine* 360: 1870-1884.
- Serda, A.K., Yucel, A. 2002. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses* 45: 160-165.
- Silva, C.I.S., Marchiori, E., Souza Júnior, A.S., Müller, N.L., Comissão de Imagem da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. 2010. Consenso brasileiro ilustrado sobre a terminologia dos descritores e padrões fundamentais da TC de tórax. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 36 (1): 99-123.

- Shen, D., Noodeh, A.D., Kazemi, A., Grillot, R., Robson, G., Brugère, J.F. 2004. Characterisation and expression of phospholipases B from the opportunistic fungus *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiology Letters* 239: 87–93.
- Shigemura, T., Agematsu, K., Yamazaki, T., Eriko, K., Yasuda, G., Nishimura, K., Koike, K. 2009. Femoral Osteomyelitis due to *Cladophialophora arxii* in a patient with chronic granulomatous disease. *Infection* 37: 469–473.
- Stanzani, M., Orciuolo, E., Lewis, R., Kontoyiannis, .D.P., Martins, S.L.R., St. John, L.S., Komanduri, K.V. 2005. *Aspergillus fumigatus* suppresses the human cellular immune response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes. *Blood* 105 (6): 2258-2265.
- Stramandinoli, T., Souza, R.C., Westphalen, P., Bisinelli, F.H., Ignácio, J.C.A.S., Yurgel, L.S. 2010. Prevalência de candidose bucal em pacientes hospitalizados e avaliação dos fatores de risco. *Revista Sul-Brasileira de Odontologia* 7 (1): 66-72.
- Souza, C.A. 2006. *Aspergilose e candidíase pulmonar em pacientes imunocomprometidos: estudo comparativo dos achados de tomografia computadorizada de alta resolução*. 92f. Dissertação (Faculdade de Medicina - UFRJ) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Souza, T.F., Scroferneker, M.L., Costa, J.M., Carissimi, M., Corbellini, V.A. 2008. Secretion of five extracellular enzymes by strains of chromoblastomycosis agents. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 50 (5): 269-272,
- Torres-Pereira, C., Giovanini, A.F., Stramandinoli, R.T., Amenabar J.M., Piazzetta, C.M. 2007. Oral paracoccidioidomycosis and pulmonary tuberculosis co-infection: relevance of oral biopsy in establishing the diagnosis and therapeutic approach. *International Journal of Infectious Diseases* 13: 114-116.
- Tomee, J.F., Kauffman, H.F., Klimp, A.H., de Monchy, J.G., Köeter, G.H., Dubois, A.E. 1994. Immunologic significance of a collagen-derived culture filtrate containing proteolytic activity in *Aspergillus* related diseases. *Journal of Allergy Clinical Immunology* 93 (4): 768-778.
- Tomee, J.F.C., van der Werf, T.S. 2001. Pulmonary aspergillosis. *The Netherlands Journal of Medicine* 59: 244–258.
- Trabulsi, L.R., Alterthum, F., Gompertz, O.F., Candeias, J.A.N. 2002. 3ª edição. *Microbiologia*. São Paulo, Atheneu.
- Troughton, J.A., Browne, G., McAuley, D.F., Walker, M.J., Patterson, C.C., McMullan, R. 2010. Prior colonisation with *Candida* species fails to guide empirical therapy for candidaemia in critically ill adults. *Journal of Infection* 61: 403-409.
- Unis, G., Picon, P.D., Severo, L.C. 2005. Coexistência de colonização fúngica intracavitária (bola fúngica) e tuberculose ativa. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 31 (2): 139-143.
- Varkey, J.B., Perfect, J.R. 2008. Rare and Emerging Fungal Pulmonary Infections. *Semin. Respiratory Critical Care Medicine* 29 (2):121-131.

- Vidigal, P.G., Svidzinski, T.I.E. 2009. Leveduras nos tratos urinário e respiratório: infecção fúngica ou não?. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 45 (1): 55-64.
- Wheat, J.L. 2009. Approach to the diagnosis of invasive aspergillosis and candidiasis. *Clinical Chest Medicine* 30: 367–377.
- Welsh, O., Vera-Cabrera, L, Salinas-Carmona, M.C. 2007. Mycetoma. *Clinics in Dermatology* 25: 195–202.
- Wong, S.S., Woo, P.C., Yuen, K.Y. 2001. *Candida tropicalis* and *Penicillium marneffei* mixed fungaemia in a patient with Waldenstrom's macroglobulinaemia. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 20: 132–135.
- Xavier, M.O., Pasqualotto, A.C, Sales, M.P.U, Severo, C.B, Camargo, J.J.P., Severo, L.C. 2008. Invasive pulmonary aspergillosis due to a mixed infection caused by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus*. *Revista Iberoamericana de Micologia* 25: 176-178.
- Xavier, M.O., Oliveira, F.M., Severo, L.C. 2009. Capítulo 1 - Diagnóstico laboratorial das micoses pulmonares. Curso de Atualização - Micoses. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 35 (9): 907-919.
- Zmeili, O.S., Soubani, A.O. 2007. Pulmonary aspergillosis: a clinical update. *Q J Med* 100: 317–334.

ANEXOS

Anexo 1

Andamento do projeto - CAAE - 0010.0.344.000-09				
Título do Projeto de Pesquisa PATOGENICIDADE DE FUNGOS DAS VIAS RESPIRATÓRIAS DE PACIENTES INTERNOS NO SETOR DE PNEUMOLOGIA DO HOSPITAL GERAL OTÁVIO DE FREITAS				
Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na CONEP
Aprovado no CEP	30/06/2009 11:33:54	04/08/2009 09:23:07		
Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	Origem
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	30/06/2009 11:33:54	Folha de Rosto	0010.0.344.000-09	CEP
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	30/06/2009 09:30:59	Folha de Rosto	FR275122	Pesquisador
3 - Envio do Protocolo Aprovado para CONEP	04/08/2009 09:23:07	Folha de Rosto	0.33.08.2009	CONEP
4 - Aguardando Protocolo chegar na CONEP	04/08/2009 09:23:07	Folha de Rosto	0.33.08.2009	CONEP

Anexo 2

Meios de Cultura, Soluções e Corantes**Isolamento e purificação**Ágar-Sabouraud + 50mg/L de cloranfenicol (Lacaz *et al.*, 2002)

Dextrose	40,0g
Peptona	10,0g
Ágar	15,0g
Água destilada	1000mL
Cloranfenicol	50mg

IdentificaçãoÁgar Czapeck (Lacaz *et al.*, 2002)

Sacarose.....	30g
Nitrato de Sódio.....	3g
Fosfato Dibásico de Potássio.....	1g
Sulfato de Magnésio 7H ₂ O.....	0,5g
Cloreto de Potássio.....	0,5g
Sulfato de Ferro 7H ₂ O.....	0,01g
Ágar.....	15g
Água Destilada q.s.p.....	1000mL

Ágar Extrato de Malte (Samson e Frisvad, 2004 *in* Lacaz *et al.*, 2002)

Extrato de Malte.....	20g
Dextrose.....	20g
Peptona de Carne.....	1g
Ágar.....	16g
Água destilada q.s.p.....	1000mL

Ágar Batata Dextrose (BDA) (Lacaz *et al.*, 2002)

Dextrose.....	20g
Ágar.....	16g
Batata.....	140g
Água destilada q.s.p.....	1000mL

Ágar-Sabouraud + YE (extrato de levedura) (Lacaz *et al.*, 2002)

Extrato de levedura.....	5,0g
Peptona	10,0g
Ágar	20,0g
Glicose	40,0g
Água destilada	1000mL
Cloranfenicol	50mg

Meios para identificação de leveduras**Ágar uréia de Christensen**

(Christensen, 1946 *in* Lacaz *et al.*, 2002)

Peptona	1,0g
Glicose	1,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Fosfato de potássio monobásico	2,0g
Fenol vermelho	12,0mg
Ágar	20,0g
Água destilada	1000mL

Meio para produção de ácidos (CaCO₃)
(diferencia o gênero *Candida* de *Brettanomyces*)
(Lacaz *et al.*, 2002)

Dextrose	5,0g
Extrato de levedura	0,5g
Carbonato de cálcio	0,5g
Ágar	2,0g
Água destilada	100mL

Água peptonada – extrato de levedura
(para formação de película e observação da micromorfologia)
(Lacaz *et al.*, 2002)

Dextrose	20,0g
Extrato de levedura	5,0g
Peptona	10,0g
Água destilada	1000mL

Meio de Gorodkova
(para induzir a formação de ascos e ascosporos)
(Lacaz *et al.*, 2002)

Peptona	1,0g
Glicose	0,1g
Cloreto de sódio	0,5g
Ágar	2,0g
Água destilada	100mL

Meio para prova de assimilação de carbono
(Lodder e Kreger-Van-Rij, 1952 *in* Lacaz *et al.*, 2002)

Meio Básico C

Sulfato de amônio5,0g
Fosfato de potássio monobásico1,0g
Sulfato de magnésio 7H₂O0,5g
Ágar20,0g
Água destilada1000mL

Meio para prova de assimilação de nitrogênio
(Lodder e Kreger-Van-Rij, 1952 *in* Lacaz *et al.*, 2002)

Meio Básico N

Dextrose20,0g
Fosfato de potássio monobásico.....1,0g
Sulfato de magnésio 7H₂O0,5g
Ágar20,0g
Água destilada1000mL

Meio para fermentação de carboidratos, sem indicador
(Lacaz *et al.*, 2002)

Água Peptonada

Peptona2,5g
Extrato de levedura2,5g
Água destilada1000mL

*Para 100mL do meio basal (água peptonada-extrato de levedura), adicionar 3g de cada um dos açúcares utilizados nesta prova.

Meio para produção rápida de clamidosporos (Feo, 1978 *in* Lacaz *et al.*, 2002)
(meio utilizado para identificação rápida de *Candida albicans* a partir de material clínico)

Meio a base de bile de boi

(Lacaz *et al.*, 2002)

Bile de boi (Bacto Oxgall)20,0g

Água destilada1000mL

Todos os meios de cultura utilizados foram preparados de acordo com Lacaz *et al.* (2002), sendo utilizados após 72 horas a temperatura ambiente para controle de esterilização.

Corantes e soluções

Azul de Amann (Carranza, 1949)

Cristais de ácido fênico.....20g

Glicerina.....20mL

Ácido láctico.....20mL

Azul de algodão.....0,05g

Água destilada q.s.p.....20mL

Solução de hidróxido de potássio a 20% (Lacaz *et al.*, 2002)

Hidróxido de potássio.....2g

Água destilada.....100mL

Caracterização Enzimática

Detecção de Atividade Proteásica

Meio de Caseína (Lacaz *et al.*, 2002)

(1) Leite Desnatado (Molico®).....	10g
Água destilada q. s. p.....	100mL
(2) Ágar.....	2g
Água destilada q.s.q.....	100mL

Solução Acidificada de Cloreto de Mercúrio (Frazier apud Lacaz *et al.*, 2002)

Cloreto de Mercúrio.....	12g
Ácido Clorídrico Concentração.....	16mL
Água destilada q.s.p.....	100mL

Meio de Gelatina (Lacaz *et al.*, 2002)

Extrato de carne.....	3g
Peptona.....	5g
Gelatina.....	120g
Água destilada q.s.p.....	1000mL

Meio de Soro de Albumina Bovina (Aoki *et al.*, 1990)

Sulfato de magnésio.....	0,04g
Fosfato de potássio.....	0,5g
Cloreto de Sódio.....	NaCl 1g
Extrato de levedura.....	0,2g
Glicose.....	4g
Soro de albumina bovina (Sigma®).....	0,5g
Água destilada.....	60mL

Após ajustar o pH da solução para 3,5 e esterilização por filtração, adicionar o filtrado a 140 mL de ágar-água esterilizado.

Detecção de Atividade Fosfolipásica

Ágar Sabouraud acrescido de sais + Lecitina de soja (Price *et al.*, 1982)

Dextrose.....	40g
Peptona de Carne.....	10g
Lecitina de soja.....	2g
Cloreto de Sódio.....	0.29g
Cloreto de Cálcio.....	0,55g
Ágar.....	20g
Água destilada q.s.p.....	1000mL

Ágar Sabouraud acrescido de sais + Gema de ovo natural (modificado de Price *et al.*, 1982)

Dextrose.....	40g
Peptona de Carne.....	10g
Lecitina de soja.....	2g
Cloreto de Sódio.....	0.29g
Cloreto de Cálcio.....	0,55g
Ágar.....	20g
Água destilada q.s.p.....	1000mL

Detecção de Atividade Elastinolítica

Meio de Elastase (Kothary *et al.*, 1984)

Elastina.....	0,05g
Yeast carbon base.....	0,05g
Rosa bengala.....	0,01g
Ágar.....	15g
Tampão borato (0.05 M).....	1000mL
pH final: 7.6	