



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA - REDE BIONORTE**



**PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA E FATORES DE
VIRULÊNCIA DE ISOLADOS FÚNGICOS DE HOSPITAL PÚBLICO
DO ESTADO DO MARANHÃO**

PEDRO HENRIQUE CUNHA FONTENELLE

**São Luís - MA
2024**

PEDRO HENRIQUE CUNHA FONTENELLE

**PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA E FATORES DE
VIRULÊNCIA DE ISOLADOS FÚNGICOS DE HOSPITAL PÚBLICO
DO ESTADO DO MARANHÃO**

Qualificação de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da REDE BIONORTE como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Julliana Ribeiro Alves dos Santos

**São Luís - MA
2024**

PEDRO HENRIQUE CUNHA FONTENELLE

PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA E FATORES DE VIRULÊNCIA DE ISOLADOS FÚNGICOS DE HOSPITAL PÚBLICO DO ESTADO DO MARANHÃO

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – REDE BIONORTE, na Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovada em / /

Banca examinadora

Documento assinado digitalmente



RITA DE CASSIA MENDONCA DE MIRANDA

Data: 25/11/2024 11:49:06-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Rita de Cássia Mendonça de Miranda

Documento assinado digitalmente



WELLYSON DA CUNHA ARAUJO FIRMO

Data: 25/11/2024 10:51:26-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Wellyson da Cunha Araújo Firmo

Documento assinado digitalmente



WOLIA COSTA GOMES

Data: 25/11/2024 11:13:37-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Wolia Costa Gomes

Documento assinado digitalmente



PAULO CESAR MENDES VILLIS

Data: 25/11/2024 11:43:08-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Paulo Cesar Mendes Villis

Documento assinado digitalmente



JULLIANA RIBEIRO ALVES DOS SANTOS

Data: 25/11/2024 18:17:42-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Julliana Ribeiro Alves dos Santos (Orientadora)

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO

Eu, Pedro Henrique Cunha Fontenelle, () autorizo () não autorizo a publicação da versão final aprovada de minha Tese de Doutorado intitulada “Perfil de susceptibilidade antifúngica e fatores de virulência de isolados fúngicos de hospital público do estado do Maranhão” no Portal do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – REDE BIONORTE (PPG-BIONORTE), bem como no repositório de Teses da CAPES ou junto à biblioteca da Instituição Certificadora.

Local/Data: São Luís-MA, 20 de 11 de 2024

 Documento assinado digitalmente
PEDRO HENRIQUE CUNHA FONTENELLE
Data: 26/02/2025 12:05:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Pedro Henrique Cunha Fontenelle

CPF: 604.994.303-60
RG: 038537542009-5

Dedicatória

A minha Mãe e minha Irmã por estarem comigo em todos os momentos de minha vida. Dedico a elas e a Deus tudo o que tenho.

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor do meu destino, que permitiu que tudo isso acontecesse ao longo de minha vida, e não somente nestes anos como universitário, mas estava presente que em toda a caminhada desse sonho.

A minha mãe, Cristina Guimarães, por estar presente em todos os momentos da minha jornada e por toda ajuda, conselhos, ensinamentos e carinho dado durante todos esses momentos. A minha irmã, Laíssa Fontenelle, que nos momentos de minha ausência dedicados ao estudo superior, entendeu que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente. Aos avós, primas, primos, tios, por acreditar no meu potencial.

Finalmente, agradeço imensamente à minha querida orientadora Profa. Dra. Julliana Ribeiro Alves dos Santos pela paciência, disposição e acolhimento, em que me cedeu à oportunidade como aluno de mestrado no Laboratório de Microbiologia Ambiental, onde pude aprofundar meus conhecimentos e chegar até aqui, com seus grandes ensinamentos e experiências de suma importância para meu aprendizado.

E gostaria de agradecer a todas as pessoas que fazem parte da minha vida e acrescentam nela de forma positiva, me ajudando a tornar uma pessoa melhor a cada dia e pela oportunidade que me deram em poder fazer parte da vida de todos vocês.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão pelo apoio financeiro concedido pelo CNPq e pela CAPES, que foram essenciais para a continuidade das minhas pesquisas. Agradeço também ao Programa de Doutorado em Biotecnologia e à Universidade CEUMA pelo suporte acadêmico e estrutural oferecido ao longo desta jornada. O incentivo e os recursos proporcionados por essas instituições foram fundamentais para o desenvolvimento do meu trabalho e para a realização dos meus objetivos científicos.

FONTENELLE, Pedro Henrique Cunha. **Perfil de susceptibilidade antifúngica e fatores de virulência de isolados fúngicos de hospital público do Estado do Maranhão**. 2024. 85f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2024.

RESUMO

As micoses são doenças negligenciadas e representam um importante problema de saúde pública. Os fungos são cosmopolitas, apresentam uma enorme biodiversidade e podem ser encontrados em diversos nichos ecológicos. Um crescente número de casos de internações por micoses invasivas vem ganhando espaço no ambiente hospitalar, o que acaba gerando o aumento consequentemente da morbimortalidade destes indivíduos acometidos. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de susceptibilidade antifúngica e de virulência em isolados de pacientes atendidos em hospitais no Estado do Maranhão. O estudo foi realizado com 14 amostras biológicas de pacientes internados em Unidades Hospitalares de São Luís-MA, e foram isolados fungos de ambiente intra-hospitalares, no período de Janeiro de 2020 a Janeiro de 2024. As amostras foram coletadas para identificação das espécies fúngicas pelo MALDI-TOF/MS. Em seguida, foram realizados os testes de sensibilidade aos antifúngicos, testes de virulência para produção de exoenzimas (proteínase, fosfolipase e catalase) e formação de biofilme em superfícies abióticas como em cateteres, além da avaliação da distribuição da frequência e percentual do perfil clínico e socioeconômico dos acometidos. No teste de Sensibilidade aos antifúngicos, aproximadamente 92,8% das amostras se apresentaram sensíveis à anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol. Observou-se que as amostras apresentaram a capacidade de produzir as exoenzimas fosfolipase e proteinase onde destaca-se que todas as amostras apresentaram a Zona de Precipitação (PZ) $< 0,70$ sendo consideradas de acordo com sua intensidade muito forte produtoras de proteinase e catalase positiva. Além disso, no teste de formação de biofilme em cateter de poliuretano, em que todas as amostras foram capazes de produzir biofilme com ênfase nas cepas GCM e IJST que foram caracterizadas como produtoras fortes de biofilme em placa. Observa-se que *Candida albicans* é o fungo mais prevalente, correspondendo a 50% dos casos. Conclui-se que este estudo sobre a prevalência de infecções fúngicas invasivas em hospitais de referência para doenças infectocontagiosas fornecerá subsídios importantes para a elaboração de programas municipais e estaduais de prevenção. Dessa forma, espera-se que as medidas propostas contribuam efetivamente para a redução da probabilidade de surtos futuros dessas infecções, reforçando o controle e a segurança hospitalar.

Palavras-chave: Biodiversidade, Fungos, Resistência, Virulência.

FONTENELLE, Pedro Henrique Cunha. **Antifungal susceptibility profile and virulence factors of fungal isolates from a public hospital in the State of Maranhão**. 2024. 85f. Thesis (Doctorate in Biodiversity and Biotechnology) - Federal University of Maranhão, São Luís, 2024.

ABSTRACT

Fungal infections are neglected diseases and represent a significant public health problem. Fungi are cosmopolitan, exhibit enormous biodiversity, and can be found in various ecological niches. A growing number of hospitalizations due to invasive fungal infections has been increasing in the hospital environment, consequently leading to higher morbidity and mortality among affected individuals. In this context, the aim of this study was to evaluate the antifungal susceptibility and virulence profile of isolates from patients treated in hospitals in the state of Maranhão. The study was conducted with 14 biological samples from patients hospitalized in healthcare units in São Luís, MA, and fungi were isolated from the hospital environment between January 2020 and January 2024. The samples were collected for fungal species identification using MALDI-TOF/MS. Subsequently, antifungal susceptibility tests, virulence tests for the production of exoenzymes (proteinase, phospholipase, and catalase), and biofilm formation on abiotic surfaces such as catheters were performed. In the antifungal susceptibility test, approximately 92.8% of the samples were sensitive to amphotericin B, fluconazole, itraconazole, and voriconazole. It was observed that the samples had the ability to produce the exoenzymes phospholipase and proteinase, with all samples showing a precipitation zone (PZ) < 0.70 , indicating strong proteinase production and positive catalase activity. Additionally, in the polyurethane catheter biofilm formation test, all samples were capable of producing biofilm, with an emphasis on the GCM and IJST strains, which were characterized as strong biofilm producers in plates. In conclusion, this study on the prevalence of invasive fungal infections in reference hospitals for infectious diseases will provide important support for the development of municipal and state prevention programs. Thus, it is expected that the proposed measures will effectively contribute to reducing the likelihood of future outbreaks of these infections, strengthening hospital control and safety.

Keywords: Biodiversity, Fungi, Resistance, Virulence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distritos sanitários de São Luís (RESOLUÇÃO CMS N° 18/2020).....	22
Figura 2 – Mapa do município de São Luís/MA, 2018	23
Figura 3 – <i>Columba livia</i> (Pombo)	24
Figura 4 – Produção de proteinase dos isolados fúngicos	39
Figura 5 – Produção de fosfolipase dos isolados fúngicos	41
Figura 6 – Placa de Petri com formação do Halo	41
Figura 7 – Intensidade da Produção de fosfolipase (Pz) dos isolados fúngicos	42
Figura 8 – Zona de Precipitação (PZ) das diferentes espécies fúngicas	42
Figura 9 – Produção de biofilme dos isolados fúngicos em placa de 96 poços.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição da frequência e percentual do perfil sociodemográfico dos pacientes com infecções fúngicas atendidos em um centro de referência em São Luís, Maranhão	25
Tabela 2 – Distribuição da frequência e percentual do perfil clínico dos pacientes com infecções fúngicas atendidos em um centro de referência em São Luís, Maranhão	26
Tabela 3 – Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/ml}$)	50
Tabela 4 – Formação de Biofilme em Cateter de Poliuretano (Método Qualitativo)	52
Tabela 5 – Formação de Biofilme em Cateter de Poliuretano (Método Semi-quantitativo).	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BSA	Albumina Sérica Bovina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade Óptica
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
K ₂ HPO ₄	Fosfato de Potássio Dibásico
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Sulfato de Magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
PBS	Tampão fosfato-salino
Pz	Zona de Precipitação
TCLE	TCLE
UNESCO	Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e a Cultura

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 OBJETIVO GERAL	12
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 FUNGOS.....	13
2.2 BIODIVERSIDADE DOS FUNGOS	13
2.3 INFECÇÕES FÚNGICAS	15
2.4 INFECÇÕES FÚNGICAS EM AMBIENTES NOSOCOMIAIS	16
2.5 MICOSES SISTÊMICAS E OPORTUNISTAS.....	17
2.5.1 Criptococose.....	17
2.5.2 Candidíase.....	18
2.5.3 Pneumocistose.....	19
2.6 FATORES DE VIRULÊNCIA	19
2.6.1 Resistência a antifúngicos.....	20
2.6.2 Produção de Exoenzimas.....	20
2.6.3 Formação de Biofilme.....	21
2.7 ANÁLISE SITUACIONAL DO MUNICÍPIO DE SÃO LUÍS.....	21
2.7.1 Aspectos históricos	21
2.7.2 Aspectos geográficos e demográficos.....	22
3. RESULTADOS	25
4 DISCUSSÃO	29
REFERÊNCIAS	30
Artigo publicado na revista Revista Observatorio de La Economía Latinoamericana, Qualis A4 2017-2020.	35
Artigo aceito pela Revistas Eletrônica Acervo Saúde, Qualis B1 2017-2020.....	47
ANEXO I.....	58
APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA	59
ANEXO II.....	63

1 INTRODUÇÃO

Os fungos têm sido foco de estudos por cientistas e pesquisadores devido ao seu potencial perigo à saúde humana e animal. Desta forma, através de tais pesquisas, foi possível avaliar e estudar a diversidade e complexidade de múltiplas espécies de fungos buscando sempre avaliar a patogenicidade de vários grupos desses microrganismos. A maioria dos fungos é cosmopolita e podem ser encontrados em praticamente todos os lugares da natureza entre eles: solo, seres humanos, vegetais, materiais em decomposição e em animais domésticos (Rodrigues, 2022).

A forma principal de propagação dos fungos é através do ar, desta forma, esses microrganismos possuem uma capacidade de propagação elevada com uma taxa de colonização que pode variar de acordo com determinadas superfícies e habitats (Souto *et al.*, 2023). As micoses sistêmicas são infecções contraídas através da inalação de propágulos de fungos que podem acabar lesionando, por exemplo, o tecido pulmonar. Algumas pesquisas realizadas no semiárido Nordeste, principalmente nos estados do Ceará, Maranhão e Piauí mostraram o aumento dos níveis de morbimortalidade, devido às micoses pulmonares, pois não são doenças de notificação compulsória, o que aumenta ainda mais as proporções da doença (Pereira *et al.*, 2017; Fonseca, Rodrigues, 2022).

Atualmente, muitas internações são recorrentes em hospitais e em postos de saúde, devido à elevada incidência de casos de micoses sistêmicas e oportunistas no Brasil. As principais micoses profundas endêmicas no país são a criptococose, candidíase, a aspergilose e a pneumocistose (Pereira, 2015).

Em um contexto geral, o desenvolvimento desse projeto se justifica pela necessidade de compreender que infecções causadas por fungos patogênicos representam um desafio médico global, sobretudo devido a tais patologias não serem de notificação compulsória pelo Estado Federativo. Com isso, quadros de internações por micoses invasivas com criptococose, pneumocistose e candidíase vêm complicando o curso clínico, terapêutico e medicamentoso.

Aliado a este fato, a biodiversidade dos fungos classificam-os como cosmopolitas e acabam colonizando indivíduos pertencentes a climas que podem variar do temperado ao subtropical/tropical ocasionando micoses sistêmicas e gerar óbitos, especialmente naqueles que apresentam graus variados de imunossupressão.

Além disso, o número de micoses invasivas em indivíduos imunocompetentes vem aumentando paulatinamente, principalmente devido à infecção por cepas de *Cryptococcus gatti* e de outras leveduras consideradas patógeno emergente como o *Cryptococcus laurentii*. Tais

aspectos alertam para outros fatores de virulência passíveis de serem expressos por estas cepas causadoras de micoses invasivas (Sales *et al.*, 2021).

Com isso, considerando que as infecções fúngicas são doenças negligenciadas, mas de importância para a saúde pública, e que estes microrganismos possuem grande biodiversidade e estão presentes em inúmeros ambientes, ressalta-se a necessidade do estudo sobre os fatores de virulência e da biodiversidade dos fungos a fim de aumentar o conhecimento científico tanto no âmbito acadêmico quanto entre os profissionais de saúde, o que trará benefícios à população, influenciando a tomada de decisões em nível municipal, estadual, federal.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil de susceptibilidade e os fatores de virulência em isolados ambientais e de pacientes atendidos em hospitais do Estado do Maranhão.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os agentes fúngicos pelas técnicas clássicas e método automatizado;
- Descrever o perfil de sensibilidade aos antifúngicos;
- Avaliar a produção de exoenzimas dos fungos isolados de pacientes com infecções fúngicas invasivas de hospital de referência do Estado, obtidos a partir de amostras biológicas;
- Investigar a formação de biofilme sobre substratos abióticos diversos;
- Analisar a frequência e o perfil clínico e socioeconômicos dos pacientes acometidos por micoses.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FUNGOS

Os fungos, em sua biodiversidade, apresentam uma enorme variedade de modos de vida. Alguns deles vivem como saprófitos, quando obtêm seus nutrientes através da decomposição de organismos mortos; como parasitas, quando capturam seu alimento de substâncias que são advindas de organismos vivos em que estão instalados, danificando-o ou até mesmo estabelecendo relação mutualística, em que ambos possam ser beneficiados (Ganiko-Dutra; De Lara Weiser, 2019; Begon; Townsend, 2023).

A maioria dos fungos é cosmopolita e podem ser encontrados no solo, em seres humanos, vegetais, materiais em decomposição e em animais domésticos (Favalessa *et al.*, 2009; Souto *et al.*, 2023). Os fungos têm sido foco de estudos por cientistas e pesquisadores devido ao seu potencial perigo à saúde humana e animal. Atualmente, muitas infecções são recorrentes em hospitais, devido à elevada incidência de casos de micoses sistêmicas e oportunistas no Brasil (Pereira, 2015; Toyotani, De Souza, 2021).

2.2 BIODIVERSIDADE DOS FUNGOS

O Reino Fungi, recentemente calculado em aproximadamente 3,8 milhões de espécies, demonstra uma enorme diversidade de formas de vida com estratégias nutricionais e relações com outros organismos. A origem dos fungos pode ser rastreada há mais de 1 bilhão de anos. Desde então, os fungos conquistaram não apenas terras, mas também quase todos os habitats e substratos no planeta (Remy *et al.*, 1994; Floudas *et al.*, 2012; Neves, 2020).

O Bioma de transição Cerrado-Amazônico é conhecido como a maior diversidade biológica e maior riqueza florestal do planeta, constitui uma fonte de valor elevadíssimo para a busca de novos extratos enzimáticos a serem explorados para a aplicação biotecnológica, pois oferece uma riqueza imensurável em biodiversidade, recursos hídricos, minérios, espécies animais e vegetais, além de fungos macro e microscópicos, leveduras e bactérias disponíveis em seu bioma (Mendoza *et al.*, 2022).

A biodiversidade e biotecnologia são reconhecidas como ciências para o avanço do século XXI, frente às suas características de inovação radical, impacto atual e potencial frente

a problemas globais junto à promessa de desenvolvimento sustentável (Begon; Townsend, 2023).

Nesse contexto, os fungos são utilizados na produção de alimentos, contribuem na indústria farmacêutica, estão presentes no processo de biodegradação e tratamento biológico de efluentes, atuam na atividade enzimática, de interesse industrial e na biotransformação; também são de grande importância agrícola e ecológica, pois mantêm o equilíbrio do ambiente, decompondo restos vegetais, degradando substâncias tóxicas (Pereira *et al.*, 2017; Fonseca, Rodrigues, 2022).

Igualmente, ocupam um papel ecológico importante para o planeta terra na recuperação ambiental, uma vez que a Amazônia brasileira é caracterizada por uma notável riqueza de espécies e altos índices de endemismo (Capobianco *et al.*, 2017; Begon; Townsend, 2023).

Porém, mesmo nem sempre observado a olho nu, estes microrganismos estão intimamente relacionados com a evolução e com a ecologia da vida como qualquer outro organismo na Terra. Relatos de que os fungos propiciam proteção a plantas e animais contra adversidades, produzindo compostos protetores, conferindo defesa de alguns organismos a estresses bióticos ou abióticos, além de aumentar o sistema de defesa vem sendo descritos na literatura (Jones *et al.*, 2006; Backman *et al.*, 2008; Sales *et al.*, 2021).

Além disso, a influência dos fungos pode ser observada nas funções do sistema imunológico humano, na química dos solos e no DNA de muitos microrganismos. Porém, com o uso indiscriminado de fungicidas químicos convencionais, ou seja, aqueles que contaminam o meio ambiente, prejudicando a saúde humana, acarretando na resistência de cepas a essas substâncias ocasionando o aparecimento de doenças, a exploração de agentes fúngicos no controle biológico de patologias, tornou-se uma tendência frequente na tentativa de melhorar o tratamento de pacientes acometidos por micoses invasivas (Clay, 1998; Brosi *et al.*, 2011; Hawksworth *et al.*, 2017; Stocco *et al.*, 2019; Costa Filho *et al.*, 2021).

Estudos mostram que infecções fúngicas, principalmente causadas por microrganismos como *Candida* e *Cryptococcus* spp, levam a óbito todos os anos cerca de um milhão de pessoas. Essas leveduras do gênero possuem distribuição mundial dos Trópicos até as regiões árticas e antárticas e tem capacidade de colonizar inúmeros locais que variam deste o meio ambiente até materiais em decomposição, vegetais, excretas de aves e solo, onde estudos recentes também revelaram que o gênero *Cryptococcus* é um grupo fúngico predominante em solos, além conseguirem colonizar o próprio ser humano (Tedersoo *et al.*, 2018; Folha *et al.*, 2024; Carvalho *et al.*, 2024).

Tendo em vista a biodiversidade dos fungos, o desenvolvimento de antifúngicos e ferramentas no diagnóstico que são importantes para combater doenças fúngicas de forma eficaz, há a necessidade de maiores conhecimentos acerca da biologia dos patógenos fúngicos de humanos no contexto de infecções e seu papel na microbiota humana e ambiental (Renker *et al.*, 2004; Casadevall; Kontoyiannis; Robert *et al.*, 2019).

2.3 INFECÇÕES FÚNGICAS

Infecções causadas por fungos vêm sendo relatadas mundialmente, atingindo centenas de indivíduos de diversas faixas etárias. Casos recorrentes de micoses estão intimamente ligados ao avanço de procedimentos cirúrgicos, diagnóstico e terapia medicamentosa com o uso de antimicrobianos, principalmente as infecções causadas por leveduras (Veasey *et al.*, 2017; Cardoso *et al.*, 2018; Da Rocha *et al.*, 2021).

Microrganismos como *Cryptococcus* e *Candida* estão entre os principais fungos responsáveis por ocasionar micoses invasivas, que acabam afetando aproximadamente cerca de um milhão e meio de indivíduos por ano (Martins *et al.*, 2016).

Uma preocupação mundial se faz presente quando se relaciona as doenças invasivas provocadas por fungos e pacientes acometidos pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), pois seu impacto é mais abrasivo devido à fragilidade do sistema imune do hospedeiro, tornando algo significativo, que gera preocupação (Passos *et al.*, 2018).

Outra preocupação é a deficiência e as dificuldades encontradas no diagnóstico precoce e eficaz de infecções fúngicas invasivas, bem como as características e perfil de resistência dos microrganismos a medicamentos como o fluconazol, voriconazol, itraconazol entre patógenos fúngicos que contribuem para a elevação dos índices de mortalidade (Santos *et al.*, 2015; Parras, Cárdenas, 2020).

As internações decorrentes de micoses representam um ônus significativo para o Sistema Único de Saúde, acarretando custos substanciais que reverberam negativamente na economia. A necessidade de tratamentos prolongados, muitas vezes envolvendo terapias complexas e medicamentos de alto custo, impõe uma pressão financeira considerável sobre os recursos públicos destinados à saúde (Silva, 2013; Shikanai-Yasuda, 2018).

Além disso, o impacto negativo se estende para além dos gastos diretos com assistência médica, abrangendo também os custos indiretos associados à perda de produtividade, tanto dos pacientes afetados quanto de seus familiares que precisam se ausentar do trabalho para prestar cuidados. Essa conjunção de fatores ressalta a importância de

estratégias eficazes de prevenção e controle das micoses, visando mitigar seu impacto tanto na saúde pública quanto na estabilidade econômica do país (Russo *et al.*, 2018; Freire, 2021).

2.4 INFECÇÕES FÚNGICAS EM AMBIENTES NOSOCOMIAIS

São consideradas infecções hospitalares as que ocorrem em pacientes que estão internados, ou ainda em pacientes que receberam altas e apresentaram sintomas de infecção de 48 a 72 horas após a mesma (Baptista *et al.*, 2020).

O termo infecção hospitalar (IH) está sendo substituído pelo termo IRAS, que significa infecção relacionada à assistência em saúde. Essa mudança relaciona a infecção hospitalar não somente com a infecção adquirida no hospital, mas também a infecções ligadas a outros meios de assistência à saúde, como ambulatórios e clínicas (Dos Santos; Figueiredo, 2021).

Em pacientes internados na unidade de terapia intensiva (UTI), a infecção hospitalar é mais comum, pois estes pacientes geralmente apresentam um quadro clínico que os deixa mais suscetíveis a IH. Isso ocorre devido à supressão do seu sistema imunológico e aos procedimentos invasivos realizados (Dos Santos; Figueiredo, 2021).

As infecções hospitalares fúngicas podem ter origem endógena, isto é, os microrganismos são provenientes da própria microbiota, com proliferação ou mudança do sítio da levedura, induzidas por algum fator predisponente do hospedeiro ou do fungo. A infecção também pode ter origem exógena, na qual os fungos chegam ao paciente a partir de fontes externas, tais como mãos dos profissionais de saúde, cateteres, sondas e sistema de climatização do hospital (Rizzati, 2022).

Infecções por leveduras do gênero *Candida*, por exemplo, corresponde a cerca de 80% das infecções fúngicas documentadas em hospitais terciários. Além disso, a levedura integra a microbiota do corpo humano, mais comumente em pele e mucosas bucal, intestinal e vaginal (Baptista *et al.*, 2020).

Da mesma forma, observa-se que a criptococose assume caráter oportunista em pacientes vivendo com HIV-AIDS e imunossupressão avançada. A principal forma clínica, prevalecendo em 70% a 90% dos casos, é a meningoencefalite, responsável por 625.000 mortes anuais em pacientes nosocomiais (Rizzati, 2022).

2.5 MICOSES SISTÊMICAS E OPORTUNISTAS

As micoses sistêmicas possuem inúmeros aspectos em comum, como a distribuição geográfica, mais comumente encontrada nas Américas (Ferreira *et al.*, 2016). Seus agentes etiológicos podem ser encontrados em solo, tronco de arvores em decomposição, em excretas de animais, tendo como principal forma de infecção as vias aéreas superiores, pela inalação de propágulos fúngicos. As micoses sistêmicas e oportunistas são responsáveis por acometer adultos e crianças, sendo mais prevalentes em pessoas com o sistema imune debilitado, além de 90% das infecções serem assintomáticas em indivíduos imunocompetentes (Alves, 2015; Souza *et al.*, 2015; Capone *et al.*, 2011; Mendonça *et al.*, 2018; Romitti *et al.*, 2024).

A maioria das infecções fúngicas sistêmicas são encontradas principalmente em adultos com idade superior a 30 anos de idade. No Brasil, as micoses que causam manifestações oportunistas pulmonares de caráter crônico são: criptococose, candidíase e pneumocistose (Deus Filho *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013; De Oliveira *et al.*, 2024).

2.5.1 Criptococose

A criptococose é uma micose sistêmica que tem como o agente etiológico, *Cryptococcus* spp. que são responsáveis por causar uma micose primariamente pulmonar, e que possui predileção por órgãos nobres como o cérebro e o sistema nervoso central e podem causar também, lesões cutâneas no paciente acometido (Berres *et al.*, 2016; Kon *et al.*, 2008; Dos Santos *et al.*, 2021).

O gênero *Cryptococcus* é composto de aproximadamente 39 espécies, sendo as duas mais relevantes que desencadeiam infecções em animais e no ser humano, *C. neoformans* e *C. gattii* (Destro, 2016). É importante ressaltar que a espécie *C. laurentii* anteriormente era descrita como saprófita (Alves *et al.*, 2015; Khawcharoenporn, 2007; Cardoso *et al.*, 2020), porém, atualmente é considerada um patógeno emergente, e que pode agredir a homeostasia de indivíduos infectados por esse microrganismo (Molina-Leyva *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2017). O contato do hospedeiro com o microrganismo ocorre pela inalação de leveduras infecciosas

presentes em vegetais, solo e excretas de pombos urbanos da espécie *Columba livia*, entre outras formas (Menezes *et al.*, 2014; Da Silva *et al.*, 2020).

De acordo com Rajasingham (2017), a criptococose é a micose mais comumente encontrada em indivíduos portadores do vírus HIV, que pode evoluir a uma meningite fúngica ou meningite criptocócica com índices de morbimortalidade relevante, principalmente em continentes como a África e Ásia, e na América do Sul, em países como o Brasil.

A criptococose é endêmica na região Nordeste do Brasil, e tem sido relatada como uma das micoses de maior prevalência segundo dados do Sistema Único de Saúde (SIHSUS-DATASUS, 2016). Casos de criptococose no semiárido nordestino carecem de dados epidemiológicos que evidenciem de forma concreta a sua prevalência de forma que afeta consideravelmente os dados de morbidade e mortalidade. Outro ponto bastante relevante é o fato de as micoses sistêmicas e casos de meningite criptocócica não serem doenças de notificação compulsória, o que agrava consideravelmente todo o contexto da doença (Silva *et al.*, 2010; Macêdo *et al.*, 2020; Brito *et al.*, 2022).

2.5.2 Candidíase

A candidíase é uma micose oportunista que tem como agente etiológico, os fungos do gênero *Candida*. Em pessoas com deficiência do sistema imunológico e portadores de HIV, tais microrganismos podem desencadear micoses oportunistas (Costa *et al.*, 2015; Tavare *et al.*, 2018). Microrganismos do gênero *Candida* aumentam o número de pacientes nosocomiais e em UTIs. Além disso, o uso indiscriminado de drogas antimicrobianas faz com que cepas desses microrganismos oportunistas se encontrem em níveis de resistência antes não vistos (Pappas, 2006; Baptista *et al.*, 2020).

Por outro lado, tais leveduras estão presentes em manifestações clínicas e fatores de risco relacionados à neutropenia como diabetes mellitus, tuberculose pulmonar, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), transplantes, uso de quimioterapias ou radioterapias (Koh *et al.*, 2008; Barnes; Marr, 2007).

Embora seja raro, *Candida* spp. pode se disseminar geralmente após alguma neoplasia, doenças imunossupressivas e após transplantes de órgãos. Logo, quando tais eventos ocorrem, o microrganismo tende a agredir órgãos como os pulmões, rins, bexiga, meninges, articulações e olhos (Pereira, 2015).

A espécie *C. albicans* é a que mais se destaca, sendo uma das principais causadoras de doença fúngica invasiva. Porém, recentemente, um número considerável de infecções

causadas por *Candida não albicans* vem sendo relatado (Reginatto *et al.*, 2016; Roberto *et al.*, 2016; Dos Santos *et al.*, 2024).

2.5.3 Pneumocistose

A pneumocistose vem sendo cada vez mais relatada por pesquisadores, pois se caracteriza por provocar micose oportunista em pacientes nosocomiais e portadores de HIV. O agente etiológico da doença é o *Pneumocystis jirovecii* de distribuição ubíqua e que afeta principalmente o homem (Santos *et al.*, 2015; Pinto, 2016; Mcdonald, *et al.*, 2024). Aproximadamente 60% de indivíduos com AIDS desenvolvem a patologia durante determinado momento da evolução clínica da doença e mais de 60% apresentam infecção por tal microrganismo logo no início da síndrome (Mcdonald, *et al.*, 2024).

Muitos pesquisadores afirmam que o número crescente de casos de pneumocistose está relacionado com o número crescente de doentes sob terapêuticas imunossupressoras para neoplasias, transplante de órgãos, transfusões e doenças autoimunes. Tais pontos fazem com que a pneumocistose tenha aumentado o número de relatos de casos nesses indivíduos, até mesmo em pacientes soronegativos para HIV (Ferreira *et al.*, 2016; Ibrahim *et al.*, 2024).

A espécie *P. jirovecii* possui tropismo pelo pulmão causando pneumonia intersticial grave, conhecida por pneumocistose ou pneumonia por *Pneumocystis* (Grilo *et al.*, 2016; Ladeia *et al.*, 2020). Muitas pesquisas que relacionam dados epidemiológicos afirmam que grande parte dos indivíduos saudáveis já foram expostos ao *P. jirovecii* desde a infância. Porém, a patologia pode ocorrer como uma reinfeção ou uma infecção latente (Esteves *et al.*, 2014).

2.6 FATORES DE VIRULÊNCIA

Muitos microrganismos expressam mecanismos que possibilitam a colonização e infecção do hospedeiro. Vários patógenos como *Cryptococcus* e *Candida* expressam uma gama de estratégias específicas para colonizar, se estabelecer, causar a doença e resistir às defesas de hospedeiros susceptíveis (Edimio *et al.*, 2020).

Os fatores de virulência destes microrganismos aumentam a capacidade de desenvolvimento de infecções localizadas em mucosas ou sistêmicas dependendo do estágio e também da natureza da resposta do hospedeiro. Comumente estes processos infecciosos são favorecidos pela ruptura do equilíbrio parasita-hospedeiro (Santana *et al.*, 2013; Carobeli *et al.*, 2019).

2.6.1 Resistência a antifúngicos

As principais classes de antifúngicos para o tratamento de infecções por fungos são os poliênicos (nistatina e anfotericina B), que atuam na membrana celular fúngica; azóis (miconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, cetoconazol) que atuam na enzima associada à biossíntese do ergosterol componente da membrana celular fúngica e equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina) que agem na enzima b-1,3-D-glucano sintase da parede celular fúngica (Rodrigues *et al.*, 2014; Maubon *et al.*, 2014; Costa, Campos, 2020).

Bem como todas as populações de microrganismos, as leveduras são organismos adaptáveis a condições de estresse. Quando uma pressão seletiva é imposta, seja a exposição a um antifúngico, estas desencadeiam mecanismos de modo a superar o estresse causado. O desenvolvimento de resistência antifúngica deriva da seleção de isolados com alterações genéticas que codificam para a resistência (Campos *et al.*, 2029; Da Silva, Sanches, 2022).

A obtenção de resistência antifúngica destina-se a neutralizar os efeitos fungicidas ou fungistáticos das diferentes classes de antifúngicos, o que é conseguido através da: redução da acumulação do fármaco no interior da célula fúngica, diminuição da afinidade do antifúngico à proteína alvo e alteração no metabolismo (Coelho *et al.*, 2020).

2.6.2 Produção de Exoenzimas

Uma vez invadidos os tecidos do hospedeiro, algumas espécies como *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp., por exemplo, têm a capacidade de produzir, de forma constitutiva e indutível, enzimas hidrolíticas que destroem ou desorganizam elementos das membranas celulares do hospedeiro, levando à disfunção da membrana e / ou ruptura física (D'eca Junior, 2011; Santos *et al.*, 2020).

A produção da enzima fosfolipase é considerada um fator relevante para o processo de infecção. Essa enzima é encontrada normalmente na superfície da levedura e na extremidade do tubo germinativo e atua lisando os fosfolipídeos em lisofosfolipídeos que causam danos à célula epitelial durante a invasão tecidual (Silva *et al.*, 2021).

As proteinases desempenham um papel marcante na degradação dos componentes da mucosa como o colágeno e a queratina, assim como de componentes do sistema imunológico

como anticorpos e citocinas, favorecendo a invasão dos tecidos do hospedeiro (Gutierrez-Gongora *et al.*, 2022; Gupta *et al.*, 2023).

2.6.3 Formação de Biofilme

Destacam-se como fator de virulência a sua capacidade de adesão a vários sítios, adaptação, versatilidade e a formação de comunidades microbianas aderidas a diversas superfícies, conhecidas como biofilmes (Xin *et al.*, 2023). O biofilme é uma comunidade microbiana, caracterizada por células que estão aderidas em uma interface ou substrato e, envoltas de uma matriz extracelular de substâncias poliméricas produzidas pelas próprias células que exibem um fenótipo alterado relacionado à transcrição de genes e a taxa de crescimento (Cerqueira *et al.*, 2024).

Os biofilmes fúngicos constituem uma causa prevalente de infecções crônicas. Estão inteiramente associadas à utilização de dispositivos médicos de longo período de uso, tais como próteses (ortopédicas, cardíacas, vasculares) e cateteres (vasculares e urinários) (Da Rocha *et al.*, 2021). Estes dispositivos além da superfície porosa dos polímeros oferecem a combinação de um meio líquido altamente nutritivo com a presença em potencial de microrganismos. Essas infecções são caracterizadas pela cronicidade em virtude da sua resistência ao tratamento antimicrobiano, tornando mais difícil o diagnóstico microbiológico (Brilhante *et al.*, 2020).

Um forte exemplo são os biofilmes de *Candida* spp. ao qual são formados por comunidades de células na forma de leveduras unicelulares e filamentosas, envoltas por uma matriz extracelular que protege as células do ambiente externo, tornando-as mais resistentes à ação de substâncias antimicrobianas. A vantagem das células estarem presentes em biofilmes são que os mesmos podem proporcionar a essas células mecanismos que podem contribuir para a disponibilidade de nutrientes, adesão celular, cooperação metabólica e aquisição de novas características genéticas inclusive de genes de resistência a antimicrobianos (Krummenauer *et al.*, 2019; Tetz *et al.*, 2019).

2.7 ANÁLISE SITUACIONAL DO MUNICÍPIO DE SÃO LUÍS

2.7.1 Aspectos históricos

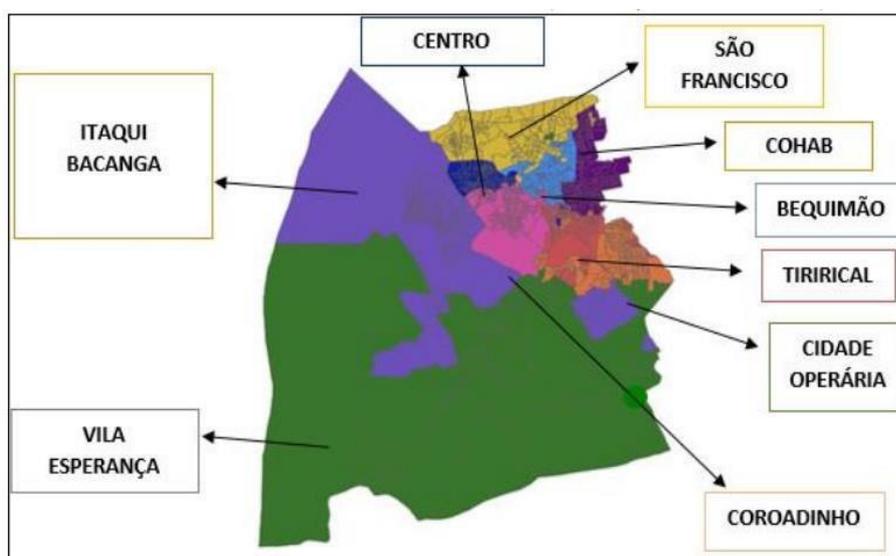
O município de São Luís do Maranhão, situada no litoral maranhense, traz influência dos nativos, portugueses, franceses e africanos. Com uma diversidade intrínseca de seus

costumes, seja em ritmos e sabores, a cidade possui reflexos da mistura cultural dos povos formadores de sua identidade (SÃO LUÍS, 2022).

Fundada em 8 de setembro de 1612, pelos franceses Daniel de La Touche e François de Rasily, foi posteriormente invadida por holandeses e, em seguida, colonizada por portugueses. Hoje, o centro da cidade é considerado Patrimônio Cultural Mundial, reconhecido pela Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e a Cultura (UNESCO) em 1997 (SÃO LUÍS, 2022).

No que diz respeito à história de sua formação administrativa, São Luís passou por algumas mudanças ao longo do tempo. Considerando a Resolução n°018/2020 emitida pelo Conselho Municipal de Saúde, foi homologada a criação de mais 2 distritos: São Francisco e Cidade Operária. Com isso, atualmente, o município está dividido em 9 distritos sanitários, sendo eles: Itaqui-Bacanga, Vila Esperança, Coroadinho, Centro, Cidade Operária, Tirirical, Bequimão, Cohab, São Francisco (Figura 1).

Figura 1: Distritos sanitários de São Luís (RESOLUÇÃO CMS N° 18/2020).



Fonte: SEMUS/ SVES. app.powerbi.com, 2021.

2.7.2 Aspectos geográficos e demográficos

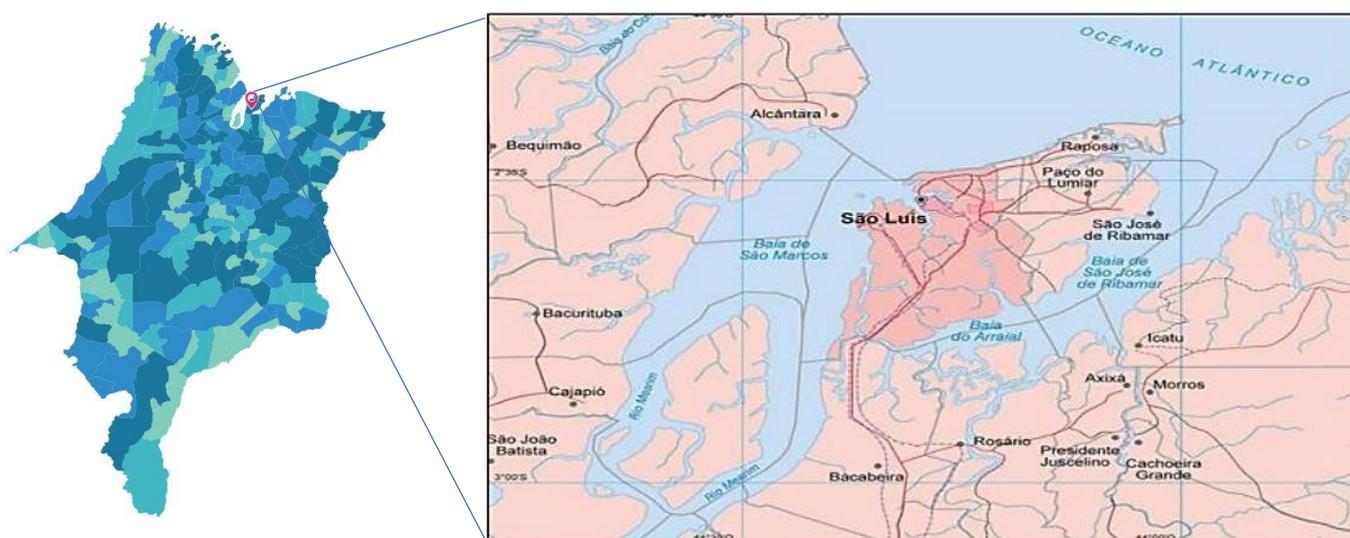
O município de São Luís/MA está localizado na ilha de Upaon-Açu no Atlântico Sul, entre as baías de São Marcos e São José de Ribamar, no Golfão Maranhense, com área territorial de 583,063 km² (IBGE, 2022). É o principal município da Região Metropolitana Grande São Luís e possui 1.108.975 habitantes (Estimativa do IBGE, 2020) com densidade demográfica de

1.215,69 hab./km². Tem como municípios limítrofes Paço do Lumiar, São José de Ribamar e Raposa (IBGE, 2022).

Estima-se que, em 2022, tenha havido um aumento populacional de 9,27% em relação ao ano de 2010, mantendo São Luís como o município mais populoso do Maranhão e o quarto maior contingente populacional da Região Nordeste do Brasil. Os ludovicenses representam 67,9% do total de residentes na sua Região Metropolitana (1.037.775 hab.) e 15,58% da população do Estado do Maranhão, cujo contingente populacional está estimado para 2023 em 7.144.598 habitantes (IBGE, 2022).

Vale ressaltar que, em função da pandemia do novo coronavírus, o censo demográfico previsto para 2020 foi adiado para o segundo semestre de 2021. Dessa forma, grande parte dos dados demonstrados a seguir terá como base o censo de 2010 (SÃO LUÍS, 2022).

Figura 2: Mapa do município de São Luís/MA, 2018.



Fonte: IBGE, 2022.

O crescimento desordenado das cidades, juntamente com a falta de controle ambiental efetivo urbano e até rural, tem trazido ao longo dos anos, muitos desafios nas relações homem e meio ambiente. Muitos transtornos surgem a partir do crescimento quantitativo exponencial de aves sinantrópicas em ambientes urbanizados, é, por exemplo, o caso dos pombos. Em grandes centros, esses animais habitam-se muito facilmente a esses ambientes, ainda que em estruturas arquitetônicas mais íngremes, pois essas estruturas inclusive lembram locais de seu habitat natural (De Souza; Bochner, 2022).

A proliferação dos pombos é ainda mais potencializada por não possuir competição intraespecífica, nem um quantitativo relevante de predadores naturais, como aves de

rapina. Quanto maior é o número de pombos no meio ambiente, maior é a competição por alimentos com as aves nativas, ocasionando assim impacto ambiental pela diminuição dessas aves que também são importantes para o ecossistema (De Faria, 2010; De Melo *et al.*, 2024).

A presença de pombos, cujo nome científico é *Columba livia*, tem seu marco inicial no Brasil por volta do século XVI com a chegada da família portuguesa. Já a domesticação de *Columbas* tem registros a partir de 4.500 a C. Entretanto, existem relatos de que no Oriente Médio, Egito Antigo e Civilização Grega, entre 3.000 a 1100 a C. essas aves eram usadas para o envio de mensagens e possuíam grande significado religioso, estético e social para a humanidade (Feare, 1986; Neto; Nunes, 1998).

Figura 3: *Columba livia* (Pombo).



Fonte: Próprio autor (2024).

Columba livia é comumente descrita como dócil e de fácil adaptação nos grandes centros. As áreas urbanas são muito propícias para adaptação dos pombos, pois possuem estruturas arquitetônicas como fendas, telhados, arcos, locais altos e seguros para adaptação de seus ninhos e abrigo das intempéries ambientais (Rodrigues; Moraes; De Mesquita, 2022).

Os pombos têm ainda a seu favor nesses locais, alimentação facilmente disponível, pois tem comportamento de pedintes, e a própria população que, de modo geral, não os enxergam como nocivos à saúde, fornecem facilmente alimentos como grãos, pipocas e farelos de pão, além disso, eles também consomem rejeitos orgânicos presentes no lixo. Com isso, conseguem coabitar tranquilamente nas cidades, tendo seu tempo médio de vida variando entre 3 a 5 anos, já em regiões silvestres, podem viver até 15 anos (Da Silva Gomes *et al.*, 2020; Dias, 2015; Feare, 1986).

As excretas dos *Columbas* representam uma problemática relevante, pois podem causar acidentes ao serem pisadas e a sujeira que esses animais proporcionam ao depositar esses dejetos em bancos, telhados, árvores, estátuas, e demais estruturas causam corrosão

e aceleração do processo de envelhecimento dos bens públicos, pois nas fezes existem substâncias oxidativas e corrosivas (Sarmiento *et al.*, 2021).

As penas soltas, cascas de ovos e palhas dos ninhos causam entupimento de drenagens hidráulicas. Por fim, destaca-se também um perigo iminente a saúde populacional, pois desses excrementos podem ser comumente isolados patógenos como enterobactérias e fungos de interesse clínico, como é o caso de *Cryptococcus spp.* causador da criptococose que acarreta danos irreversíveis à saúde de homens e alguns animais (Silva, 2018; Fonseca 2018; Neto; Nunes, 1998).

3. RESULTADOS

Tabela 1. Distribuição da frequência e percentual do perfil sociodemográfico dos pacientes com infecções fúngicas atendidos em um centro de referência em São Luís, Maranhão.

VARIÁVEIS	N	%	p-VALOR
Sexo			
Feminino	9	64,29	0,195
Masculino	5	35,71	
Faixa etária			
21 a 30 anos (Adulto jovem)	2	14,29	0,147
31 a 59 anos (Adulto de meia idade)	7	50,00	
60 anos a mais (Idoso)	5	35,71	
Estado civil			
Solteiro	10	71,43	0,347
Casado	4	28,57	
Escolaridade			
Ensino médio completo	13	92,86	0,557
Ensino médio incompleto	1	7,14	
Município de residência			
São Luís	6	42,86	0,914
Humberto de Campos	1	7,14	
Rosário	1	7,14	
Vargem Grande	1	7,14	
Caxias	1	7,14	
Axixá	1	7,14	
Pinheiro	1	7,14	
Santa Helena	1	7,14	

Barra do Corda	1	7,14	
Zona			
Zona urbana	7	50,00	0,483
Zona rural	7	50,00	
Ocupação			
Aposentado	5	35,71	
Dona de casa	4	28,57	
Costureira	1	7,14	
Estudante	1	7,14	0,010
Auxiliar de obras	1	7,14	
Desempregado	1	7,14	
Mecânico	1	7,14	

Tabela 2. Distribuição da frequência e percentual do perfil clínico dos pacientes com infecções fúngicas atendidos em um centro de referência em São Luís, Maranhão.

VARIÁVEIS	N	%	p-VALOR
Comorbidades			
HIV			
Soronegativo	11	78,57	0,907
Soropositivo	3	21,43	
Diabetes			
Não portador	11	78,57	0,356
Portador	3	21,43	
Tuberculose			
Não portador	9	64,29	0,604
Portador	5	35,71	
Exames			
Cultura para fungos			
Realizado	14	100,00	0,356
Baciloscopia			
Realizado	14	100,00	0,356
Exames de imagem			
Realizado	14	100,00	0,356
Fungos			
<i>Candida albicans</i>	5	50,00	
<i>Candida africana</i>	1	7,14	
<i>Candida tropicalis</i>	3	21,43	
<i>Cryptococcus gattii</i>	1	7,14	
<i>Candida parapsilosis</i>	1	7,14	
<i>Candida guilliermondii</i>	1	7,14	
Antifúngicos			
Anfotericina B			
Não utilizaram	11	78,57	0,576
Utilizaram	3	21,43	
Fluconazol			

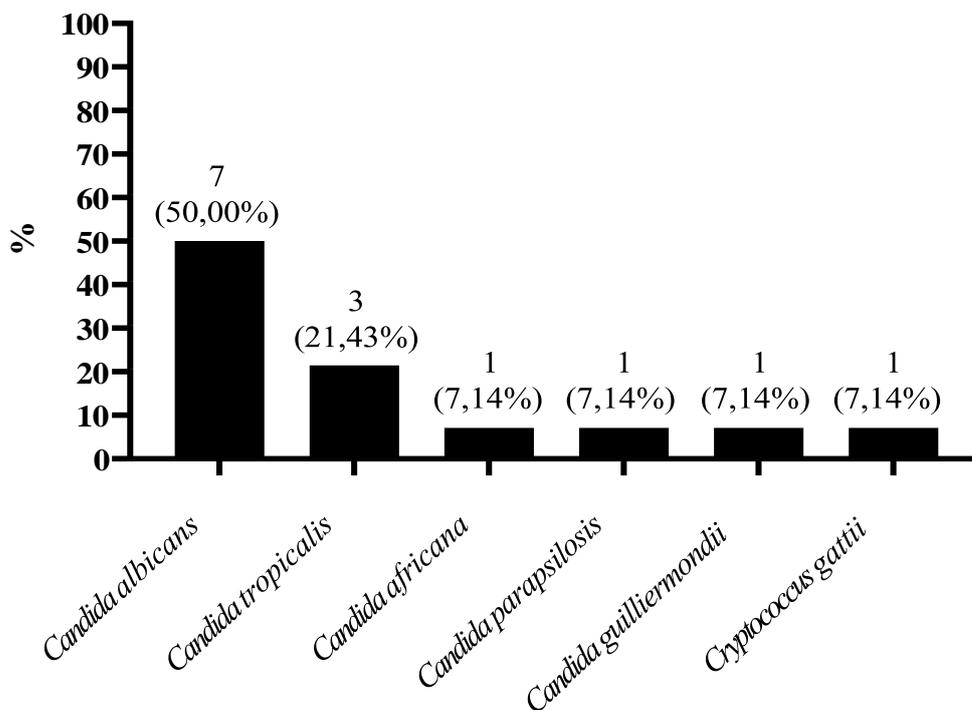
Não utilizaram	5	35,71	0,169
Utilizaram	9	64,29	
Itraconazol			
Não utilizaram	11	78,57	0,113
Utilizaram	3	21,43	
Nistatina			
Não utilizaram	11	78,57	0,113
Utilizaram	3	21,43	
Cetaconazol			
Não utilizaram	13	92,86	0,557
Utilizaram	1	7,14	
Índice de Massa Corpórea			
Peso normal	5	35,71	0,816
Sobrepeso	4	28,57	
Obesidade grau I	4	28,57	
Obesidade grau II	1	7,14	
Evolução			
Cura	12	85,71	0,801
Óbito	2	14,29	
Efeitos adversos			
Não	13	92,86	0,956
Nefrotoxicidade	1	7,14	

A Tabela 1 e 2 apresentam dados sociodemográficos e clínicos de pacientes com infecções fúngicas atendidos em um centro de referência em São Luís, Maranhão. Observa-se que, em relação ao sexo, a maioria dos pacientes é do sexo feminino (64,29%), enquanto os homens representam 35,71% ($p=0,195$). No quesito faixa etária, destaca-se a predominância de adultos de meia idade (31 a 59 anos) com 50%, seguido de idosos (60 anos ou mais) com 35,71% e jovens adultos (21 a 30 anos) com 14,29% ($p=0,147$). Em termos de estado civil, 71,43% dos pacientes são solteiros, e 28,57% são casados ($p=0,347$). A escolaridade aponta que 92,86% possuem ensino médio completo, e 7,14% ensino médio incompleto ($p=0,557$).

A ocupação mais comum entre os pacientes é a aposentadoria (35,71%), seguida por donas de casa (28,57%), com um p-valor significativo ($p=0,010$), sugerindo uma possível correlação entre aposentados e maior suscetibilidade a infecções fúngicas. Com relação às comorbidades, 21,43% dos pacientes são soropositivos para HIV, 21,43% possuem diabetes, e 35,71% têm tuberculose. Os principais antifúngicos utilizados foram o Fluconazol, administrado em 64,29% dos casos, enquanto 78,57% dos pacientes não utilizaram Anfotericina B. Em relação ao Índice de Massa Corpórea (IMC), 35,71% dos pacientes apresentavam peso normal, enquanto o restante estava entre sobrepeso e obesidade. A evolução

clínica foi positiva para a maioria, com taxa de cura de 85,71%, e apenas 14,29% dos casos resultaram em óbito.

Gráfico 1. Distribuição da frequência e percentual dos fungos isolados dos pacientes com infecções fúngicas atendidos em um centro de referência em São Luís, Maranhão.



O Gráfico 1 representa a distribuição dos diferentes fungos isolados dos pacientes atendidos em um centro de referência em São Luís, Maranhão. Observa-se que *Candida albicans* é o fungo mais prevalente, correspondendo a 50% dos casos. Outros fungos identificados incluem *Candida tropicalis* (21,43%), seguida por *Candida africana*, *Cryptococcus gattii*, *Candida parapsilosis* e *Candida guilliermondii*, cada um representando 7,14% dos casos. Esses dados indicam uma alta frequência de infecções por *Candida*, com destaque para a *Candida albicans*, espécie frequentemente associada a infecções fúngicas sistêmicas e mucocutâneas em pacientes imunocomprometidos (SANTOS, 2020).

A presença de *Cryptococcus gattii*, geralmente relacionada a infecções respiratórias e meningite, é um ponto de interesse, especialmente considerando as características clínicas desses pacientes e possíveis fatores ambientais associados (SILVA et al., 2019). A diversidade dos fungos encontrados sugere uma ampla gama de fontes e possibilidades de infecção, o que reforça a necessidade de diagnósticos precisos para um tratamento adequado.

4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos refletem uma série de padrões importantes para a compreensão do perfil de pacientes com infecções fúngicas no Brasil, especificamente no Maranhão. A predominância de mulheres entre os infectados pode estar associada a fatores sociais e biológicos que requerem maior investigação (SANTOS, 2020). A faixa etária majoritária entre adultos de meia idade e idosos é um indicativo relevante, possivelmente relacionado ao declínio do sistema imunológico e maior exposição a ambientes favoráveis ao desenvolvimento de infecções fúngicas (SILVA et al., 2018).

A elevada porcentagem de pacientes com ensino médio completo indica uma possível correlação entre o nível educacional e o acesso a serviços de saúde, que deve ser aprofundada em estudos futuros (PEREIRA; OLIVEIRA, 2021). Além disso, a predominância de aposentados como grupo ocupacional relevante sugere que a inatividade ou o envelhecimento podem ser fatores de risco para infecções oportunistas. As comorbidades, como HIV e tuberculose, frequentemente coexistem com infecções fúngicas, reforçando a importância de protocolos de tratamento que contemplem essas interações e garantam um atendimento integral (CARVALHO; SOUZA, 2019).

O uso predominante de Fluconazol como antifúngico revela uma tendência no manejo das infecções fúngicas, possivelmente devido ao seu custo-benefício e menor incidência de efeitos adversos comparado a outros antifúngicos como a Anfotericina B (ALMEIDA, 2017). O índice de massa corpórea elevado em parte dos pacientes sinaliza um alerta para a correlação entre sobrepeso/obesidade e imunossupressão, que pode aumentar a susceptibilidade a infecções (RODRIGUES et al., 2022).

A alta prevalência de *Candida albicans* nos pacientes analisados está de acordo com estudos que identificam esta espécie como uma das principais responsáveis por infecções fúngicas oportunistas (OLIVEIRA; MENEZES, 2021). A *Candida albicans* é conhecida por sua capacidade de aderir e formar biofilmes, o que contribui para sua patogenicidade e resistência a tratamentos convencionais, especialmente em pacientes imunocomprometidos, como aqueles com HIV e diabetes (COSTA et al., 2018).

A presença de *Cryptococcus gattii* em 7,14% dos casos é relevante, pois sugere que essa infecção não se restringe a regiões específicas, como áreas tropicais e subtropicais, onde o fungo é mais comum, mas também pode acometer pacientes em outras localidades (MARTINS et al., 2020). Esse achado pode estar associado a fatores ambientais, como o contato com árvores contaminadas, ou a fatores individuais, como a imunossupressão (PEREIRA; ALMEIDA, 2019).

Além disso, a presença de outras espécies de *Candida* (como *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*) aponta para a necessidade de monitoramento contínuo e de abordagens terapêuticas adaptadas. Cada uma dessas espécies possui características específicas de resistência e virulência, o que implica em estratégias de tratamento diferenciadas para evitar complicações e recidivas (SOUZA et al., 2017). Estudos apontam que a *Candida tropicalis*, por exemplo, pode apresentar resistência a antifúngicos como o fluconazol, exigindo alternativas terapêuticas (RODRIGUES et al., 2019).

Assim, os dados indicam a importância de uma vigilância microbiológica eficaz e de uma abordagem personalizada no tratamento de infecções fúngicas, principalmente em regiões com variabilidade climática e em populações vulneráveis.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. M. Uso de antifúngicos e resistência em pacientes hospitalizados. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 20, n. 4, p. 15-29, 2017.

BAPTISTA, Kelly Cristina Cordeiro et al. Infecções hospitalares por candida sp. em pacientes internados em UTI. **Revista Gestão & Saúde**, v. 22, n. 2, p. 66-81, 2020.

BRILHANTE, Raimunda Sâmia Nogueira et al. Antifungal activity of promethazine and chlorpromazine against planktonic cells and biofilms of *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* complex species. **Medical Mycology**, v. 58, n. 7, p. 906-912, 2020.

BRITO, Sheila Paloma de Sousa et al. Mortalidade por doenças tropicais negligenciadas no Piauí, Nordeste do Brasil: tendência temporal e padrões espaciais, 2001-2018. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 31, n. 1, p. e2021732, 2022.

CAMPOS, Carlos Alberto Passinho. Fungicidas agrícolas azólicos e pressão seletiva de fenótipos resistentes em *Aspergillus fumigatus*. 2019.

CARDOSO, Cintia Martins et al. Criptococose por espécies de *Cryptococcus* não-neoformans/não-gattii. 2020.

CAROBELI, Lucimara Rodrigues et al. Fatores de virulência de fungos relacionados a zoonoses isolados em ambiente de banho e tosa de um pet shop. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 9, n. 2, 2019.

CARVALHO, Letícia Cizoski; CARVALHO, Gabriel Cizoski; FRANÇA, Olinda Cizoski. Criptococose: Epidemiologia, Diagnóstico e Tratamento de uma Micose Sistêmica em Pacientes Imunocompetentes e Imunossuprimidos. **Periódicos Brasil. Pesquisa Científica**, v. 3, n. 2, p. 908-916, 2024.

CARVALHO, R. F.; SOUZA, A. P. Comorbidades e suas interações com infecções fúngicas: uma revisão crítica. **Revista de Infectologia Clínica**, v. 32, n. 1, p. 38-47, 2019.

CERQUEIRA, Fátima et al. A Cyclam Salt as an Antifungal Agent: Interference with *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* Mechanisms of Virulence. **Antibiotics**, v. 13, n. 3, p. 222, 2024.

COELHO, José Leonardo Gomes et al. Dermatofito: resistência a antifúngicos. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 74675-74686, 2020.

COSTA FILHO, Ailton Pereira da. **Caracterização molecular de um receptor acoplado a uma proteína G (GPCR) de *Aspergillus fumigatus***. 2021. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

COSTA, Ellen Gilnaya Reis; CAMPOS, Ana Claudia Camargo; SOUZA, Álvaro Paulo Silva. Terapias para o tratamento de candidíase vulvovaginal. **Referências em Saúde do Centro Universitário Estácio de Goiás**, v. 3, n. 02, p. 61-67, 2020.

COSTA, J. P. et al. Fatores de virulência e resistência em infecções por *Candida albicans*. **Revista de Microbiologia Médica**, v. 28, n. 2, p. 65-74, 2018.

DA ROCHA, Wilma Raianny Vieira et al. Gênero *Candida*-Fatores de virulência, epidemiologia, candidíase e mecanismos de resistência. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e43910414283-e43910414283, 2021.

DA ROCHA, Wilma Raianny Vieira et al. Gênero *Candida*-Fatores de virulência, epidemiologia, candidíase e mecanismos de resistência. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e43910414283-e43910414283, 2021.

DA SILVA GOMES, Vânia et al. Pombos urbanos *Columba livia* como agentes transmissores de infecções na cidade de araguaína-to. **Facit Business and Technology Journal**, v. 1, n. 20, 2020.

DA SILVA, Carla Dal Guedes; SANCHES, Camila Garcia Salvador; CHASSOT, Francieli. *Candida* parapsilosis: resistência aos antifúngicos. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 17, p. 1-16, 2022.

DE MELO, Nedilson José Gomes. a influência da manifestação de pombos em ambientes urbanos e sua relação na classificação de risco biológico. **revista owl (owl journal)-revista interdisciplinar de ensino e educação**, v. 2, n. 1, p. 446-456, 2024.

DE OLIVEIRA OHNISHI, Yumi et al. Doenças fúngicas sistêmicas em pacientes internados em um hospital público de referência em Belém, estado do Pará, Amazônia brasileira. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 13, p. 10-10, 2022.

DOS SANTOS, Eliete Fernandes; FIGUEIREDO, Erick Frota Gomes. Criptococose: consequência da infecção por *Cryptococcus neoformans* em pacientes com AIDS no Brasil. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. e150101522591-e150101522591, 2021.

DOS SANTOS, Laura Caldas et al. Avaliação da atividade antifúngica do extrato acetato de etila de *Psidium guineense* (Myrtaceae) contra cepas de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. **Observatório de la economía latinoamericana**, v. 22, n. 9, p. e6785-e6785, 2024.

- EMIDIO, Elúzia Castro Peres et al. Estudo da interação entre três diferentes reinos: entendendo a complexidade de co-infecções entre bactérias e o fungo *Cryptococcus gattii* em modelo murino. 2020.
- FOLHA, Jéssica dos Santos. Diferenças na interação de isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* com macrófagos murinos. 2024.
- FONSECA, Ana Paula Costa; RODRIGUES, João Francisco. Percepção dos fungos e sua aplicabilidade: uma revisão de literatura. **Revista da Faculdade Supremo Redentor**, p. 16-25, 2022.
- GUPTA, Munesh K. et al. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: The In Vitro Antifungal Susceptibility Pattern in Addition to the Quantification of Phospholipase and Proteinase Enzymatic Activities. **Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. 1, p. 32-37, 2023.
- GUTIERREZ-GONGORA, Davier; GEDDES-MCALISTER, Jennifer. Peptidases: promising antifungal targets of the human fungal pathogen, *Cryptococcus neoformans*. **Facets**, v. 7, n. 1, p. 319-342, 2022.
- IBRAHIM, Atif et al. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a review of management in human immunodeficiency virus (HIV) and non-HIV immunocompromised patients. **Avicenna Journal of Medicine**, v. 13, n. 01, p. 023-034, 2023.
- KRUMMENAUER, Maria E. et al. A highly active triterpene derivative capable of biofilm damage to control *cryptococcus* spp. **Biomolecules**, v. 9, n. 12, p. 831, 2019.
- LADEIA, Diana Neves et al. Fisiopatologia da pneumocistose em pacientes HIV positivo: revisão narrativa. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 12, n. 10, p. e3924-e3924, 2020.
- MACÊDO, Alan Greison Costa et al. Criptococose nasal causada por *Cryptococcus gattii* em ovino na Bahia, Nordeste do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 48, n. 1, p. 561, 2020.
- MARTINS, L. R. et al. Distribuição geográfica de *Cryptococcus gattii* e fatores de risco associados. **Revista Brasileira de Micologia**, v. 15, n. 1, p. 89-100, 2020.
- MCDONALD, Emily G. et al. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in people living with HIV: a review. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 37, n. 1, p. e00101-22, 2024.
- NETO, Luciano dos Santos Saraiva; DOS SANTOS, Francílio de Amorim. PERCEPÇÃO DOS IMPACTOS SÓCIO-AMBIENTAIS CAUSADOS POR POMBOS URBANOS NO CENTRO URBANO DE MARCOS PARENTE (PI). **REVISTA EQUADOR**, v. 8, n. 3, p. 44-58, 2019.
- NEVES, Franciny Mara de Lima. Produção de anticorpos monoclonais para imunodiagnóstico de paracoccidiodomicose causada por *Paracoccidioides lutzii*. 2020.
- OLIVEIRA, A. L.; MENEZES, F. R. Perfil de infecções fúngicas oportunistas e seus desafios terapêuticos. **Jornal Brasileiro de Patologia**, v. 33, n. 4, p. 112-126, 2021.

- PARRA, Leidy Yurani Cárdenas; CÁRDENAS, Jorge Enrique Pérez. Mecanismos de resistencia a fluconazol expresados por *Candida glabrata*: una situación para considerar en la terapéutica. **Investigación en Enfermería: Imagen y Desarrollo**, 2020.
- PEREIRA, T. A.; OLIVEIRA, L. M. Acesso à saúde e vulnerabilidade social em pacientes com infecções oportunistas. **Saúde Coletiva em Foco**, v. 15, n. 3, p. 60-78, 2021.
- PEREIRA, V. S.; ALMEIDA, J. M. Impacto ambiental na ocorrência de infecções por *Cryptococcus* spp.. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 3, p. 29-41, 2019.
- RODRIGUES, T. C. et al. Resistência antifúngica em *Candida tropicalis*: desafios para o tratamento. **Journal of Clinical Mycology**, v. 17, n. 3, p. 55-68, 2019.
- RODRIGUES, V. S. et al. Relação entre obesidade e infecções: um estudo de caso em hospitais brasileiros. **Revista de Nutrição e Saúde Pública**, v. 10, n. 2, p. 48-61, 2022.
- ROMITTI, Julia Picua; BARBOSA, Adriano Batista; FURLANETTO, Rosecler Canossa. Paracoccidioidomicose. **Revista Mato-grossense de Odontologia e Saúde**, v. 3, n. 1, p. 43-61, 2024.
- SALES, Cinara Ramos. Inibição do crescimento de *Spodoptera frugiperda* e fitopatógenos causados por isolados bacterianos obtidos de lagartas infectadas com microrganismos do solo. 2021.
- SANTOS, Luélida Ribeiro et al. Atributos de virulência por isolados de *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* de origem clínica e ambiental em Maceió, Alagoas. 2020.
- SANTOS, M. C. Diferenças de espécies de *Candida* em infecções e fatores de risco associados. **Revista de Saúde do Maranhão**, v. 25, n. 2, p. 112-128, 2020.
- SANTOS, M. C. Diferenças de gênero nas infecções fúngicas e fatores de risco associados. **Revista de Saúde do Maranhão**, v. 25, n. 2, p. 112-128, 2020.
- SILVA, D. A. et al. Infecções fúngicas e fatores predisponentes em pacientes imunocomprometidos. **Revista de Infectologia Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 47-59, 2019.
- SILVA, Kassia Gabriela Vieira et al. Morfologia, epidemiologia e virulência de espécies do gênero *Candida*. **Tópicos nas ciências da saúde**, v. 7, p. 42, 2021.
- SILVA, L. R. et al. O impacto da idade no sistema imunológico e a predisposição a infecções em idosos. **Jornal de Saúde e Envelhecimento**, v. 30, n. 1, p. 85-95, 2018.
- SOUTO, Simone da Rocha Leal da et al. Estudo da interação fungo-hospedeiro na esporotricose felina por meio da citologia por Imprint. 2023.
- SOUZA, A. P. et al. Diversidade de espécies de *Candida* em infecções hospitalares e manejo clínico. **Revista de Medicina Tropical**, v. 29, n. 3, p. 72-84, 2017.
- STOCCO, Marina et al. Fungicida biológico a base de una cepa del hongo *Trichoderma harzianum*: su supervivencia en el suelo. **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 118, n. 2, p. 020-020, 2019.

TETZ, George et al. In vitro activity of a novel antifungal compound, MYC-053, against clinically significant antifungal-resistant strains of *Candida glabrata*, *Candida auris*, *Cryptococcus neoformans*, and *Pneumocystis* spp. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 4, p. 10.1128/aac.01975-18, 2019.

TOYOTANI, Bruna Janaina Silveira; DE SOUZA, Elton Bill Amaral. INCIDÊNCIA DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE NO ESTADO DE RONDÔNIA-2011 A 2014. **Saber Científico (1982-792X)**, v. 8, n. 2, p. 104-113, 2021.

XIN, Caiyan et al. Secretions from *Serratia marcescens* inhibit the growth and biofilm formation of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 221-232, 2023.

Artigo publicado na revista Revista Observatorio de La Economia Latinoamericana, Qualis A4 2017-2020.

Fatores de virulência de isolados fúngicos de ambiente hospitalar no Estado do Maranhão

RESUMO

As micoses são doenças negligenciadas e representam um importante problema de saúde pública, apresentando uma alta morbimortalidade, embora a maioria delas não seja de notificação compulsória no Brasil. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar os fatores de virulência de isolados fúngicos em um hospital de referência no Estado do Maranhão. O estudo foi realizado com amostras biológicas de pacientes internados em Unidades Hospitalares de São Luís-MA, no período de Janeiro de 2020 a Janeiro de 2024. As amostras foram coletadas para identificação das espécies fúngicas pelo MALDI-TOF. Em seguida, foram realizados os testes de virulência. Dos isolados testados, todas as cepas apresentaram formação do halo, indicando uma maior produção significativa ($p < 0,05$) da fosfolipase. Observou-se que as amostras apresentaram a capacidade de produzir as exoenzimas proteinase, no qual destaca-se que todas as amostras apresentaram a Zona de Precipitação (PZ) $< 0,70$ sendo consideradas, de acordo com sua intensidade, como muito forte produtoras de proteinase e catalase positiva. Logo, este trabalho foi concebido com o propósito de adquirir entendimento acerca da patogenicidade dos fungos responsáveis pelas micoses invasivas e seu significado primordial para a saúde pública, visto que tais agentes são os instigadores de infecções fúngicas graves que lamentavelmente conduzem um número substancial de pacientes ao óbito, em virtude da ausência de notificação compulsória no Brasil.

Palavras-chave: Biodiversidade, Fungos, Negligência, Virulência.

ABSTRACT

Mycoses are neglected diseases and represent an important public health problem, presenting high morbidity and mortality, although most of them are not mandatory notification in Brazil. Therefore, the objective of this work was to evaluate the virulence factors of fungal isolates in a reference hospital in the State of Maranhão. The study was carried out with biological samples from patients admitted to Hospital Units in São Luís-MA, from January 2020 to January 2024. The samples were collected to identify the fungal species using MALDI-TOF. Then, virulence tests were carried out. Of the isolates tested, all strains showed halo formation, indicating a significant ($p < 0.05$) greater production of phospholipase. It was observed that the samples presented the ability to produce proteinase exoenzymes, in which it is highlighted that all samples presented a Precipitation Zone (PZ) < 0.70 and were considered, according to their intensity, as very strong producers of proteinase and catalase positive. Therefore, this work was conceived with the purpose of acquiring understanding about the pathogenicity of the fungi responsible for invasive mycoses and their primary significance for public health, since such agents are the instigators of serious fungal infections that unfortunately lead a substantial number of patients to death, due to the lack of compulsory notification in Brazil.

Keywords: Biodiversity, Fungi, Neglect, Virulence.

1 INTRODUÇÃO

Os fungos têm sido foco de estudos por cientistas e pesquisadores devido ao seu potencial perigo à saúde humana e animal. Desta forma, através de tais pesquisas, foi possível avaliar e estudar a diversidade e complexidade de múltiplas espécies de fungos buscando sempre avaliar a patogenicidade de vários grupos desses microrganismos. A maioria dos fungos é cosmopolita e podem ser encontrados em praticamente todos os lugares da natureza entre eles: solo, seres humanos, vegetais, materiais em decomposição e em animais domésticos (Favalessa *et al*, 2010; Cavalcante, Campos, De Lima, 2024).

A forma principal de propagação dos fungos é através do ar, desta forma, esses microrganismos possuem uma capacidade de propagação elevada com uma taxa de colonização que pode variar de acordo com determinadas superfícies e habitats (Calumby *et al*, 2022). As micoses sistêmicas são infecções contraídas através da inalação de propágulos de fungos que podem acabar lesionando, por exemplo, o tecido pulmonar (Cavalcante, Campos, De Lima, 2024).

Atualmente, muitas internações são recorrentes em hospitais e em postos de saúde, devido à elevada incidência de casos de micoses sistêmicas e oportunistas no Brasil. Duas importantes micoses endêmicas no país são a criptococose e a candidíase (Barbosa *et al* 2014).

As internações decorrentes de micoses representam um ônus significativo para o Sistema Único de Saúde, acarretando custos substanciais que reverberam negativamente na economia. A necessidade de tratamentos prolongados, muitas vezes envolvendo terapias complexas e medicamentos de alto custo, impõe uma pressão financeira considerável sobre os recursos públicos destinados à saúde (Silva, 2013; Shikanai-Yasuda, 2018).

Além disso, o impacto negativo se estende para além dos gastos diretos com assistência médica, abrangendo também os custos indiretos associados à perda de produtividade, tanto dos pacientes afetados quanto de seus familiares que precisam se ausentar do trabalho para prestar cuidados. Essa conjunção de fatores ressalta a importância de estratégias eficazes de prevenção e controle das micoses, visando mitigar seu impacto tanto na saúde pública quanto na estabilidade econômica do país (Russo *et al*, 2018; Freire, 2021).

Com isso, considerando que as infecções fúngicas são doenças negligenciadas, mas de importância para a saúde pública, e que estes microrganismos possuem grande biodiversidade e estão presentes em inúmeros ambientes, ressalta-se a necessidade do estudo sobre os fatores de virulência a fim de aumentar o conhecimento científico tanto no âmbito acadêmico quanto

entre os profissionais de saúde, o que trará benefícios à população, influenciando a tomada de decisões em nível municipal, estadual, federal. Logo, o objetivo deste trabalho foi avaliar os fatores de virulência dos isolados de pacientes nosocomiais atendidos em um Hospital de Referência do Estado do Maranhão.

2 METODOLOGIA

2.1 COMITÊ DE ÉTICA, TIPO, LOCAL E POPULAÇÃO DE ESTUDO

Em cumprimento aos requisitos exigidos pela Resolução 466/12 e suas complementares do Conselho Nacional de Saúde para pesquisas envolvendo seres humanos, o Projeto de Pesquisa foi submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade (Número do Parecer 2.927.864), com adição do modelo de questionário e o termo de consentimento livre e esclarecido.

Foi feito um estudo transversal, com amostragem aleatória simples e abordagem quantitativa e qualitativa, no período de Janeiro de 2020 a Janeiro de 2024, em hospitais em São Luís-MA na área para doenças infecto-contagiosas, como tuberculose, HIV e doenças tropicais (nestas incluídas as micoses) do Estado do Maranhão.

Como critérios de inclusão: participaram da pesquisa todos os pacientes com suspeita e/ ou confirmação de infecções fúngicas invasivas que assinaram o termo de consentimento livre esclarecido. Como critérios de exclusão: foram excluídos os pacientes que não apresentarem diagnóstico confirmado para infecções fúngicas invasivas ou que se recusarem a participar da pesquisa.

Para o cálculo do tamanho amostral do número de pacientes que foram incluídos no estudo, foi utilizado o programa estatístico PASS 15 (2017) com os seguintes parâmetros: tamanho da população atendida no hospital, prevalência de infecções fúngicas invasivas, nível de significância (α) de 5%, erro tolerável (erro padrão) de 4%, mais 5% de possíveis perdas.

2.2 COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS E DOS DADOS CLÍNICOS

Cada paciente selecionado previamente foi convidado a participar da pesquisa por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). As amostras biológicas (soro, escarro, lavado brônquico, secreção traqueal, sangue total, soro, urina, líquido e biópsia) foram coletadas por profissionais experientes e encaminhadas a um Laboratório de

Análises Clínicas (São Luís-MA) para identificação da espécie fúngica. Os dados clínicos foram obtidos a partir dos prontuários dos pacientes que participaram do estudo.

Os fungos foram identificados por meio da técnica automatizada MALDI-TOF e encaminhados ao Laboratório de Microbiologia Ambiental da Universidade CEUMA, onde foram mantidos em meio Agar Sabouraud e incubados a 28 e a 37°C. Em seguida, foram mantidos em meio BHI + glicerol (10%) na Coleção de culturas do Laboratório, sob congelamento em -20°C e sob refrigeração para subseqüentes testes de virulência e de susceptibilidade aos antifúngicos de uso clínico.

2.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Os fatores de virulência dos isolados fúngicos foram avaliados por meio da determinação das atividades enzimáticas da proteinase, fosfolipase e catalase.

Para análise de produção de proteinases, usou-se o método de AOKI *et al.* (1990) com modificações de D'ECA *et al.* (2011). Na determinação da proteinase o teste foi feito em placas com 140 mL do meio de cultura ágar Sabouraud dextrose contendo 60 mL de solução composta por 0,04g de $MgSO_4 \cdot H_2O$; 0,5 g de K_2HPO_4 ; 1g de NaCl; 0,2g de extrato de levedura; 4g de glicose e 0,5g de BSA, pH ajustado para 4,0 e esterilizada por filtração. As placas foram inoculadas com 3µL de salina 0,85 % contendo células de leveduras, comparada a escala de McFarland 0.5 (1×10^6 células/mL), e incubadas a 37°C por 7 dias. A atividade de proteinases foi medida e calculada de acordo com o método descrito em termos da proporção de diâmetro da colônia e a colônia mais a zona de precipitação (Pz) das proteinases. Os testes foram feitos em duplicata e foi calculada a média do valor de Pz, agrupando-os em 5 grupos: Pz=1, negativo; Pz entre 0.9 e 0.99, fraco; Pz entre 0.80 e 0.89, moderado; Pz entre 0.70 e 0.79, forte; PZ < 0.70 muito forte.

Para a determinação da atividade fosfolipídica, foi preparado um meio de cultura que consiste em 180 mL de ágar Sabouraud dextrose acrescido de 11,40g de cloreto de sódio; 0,11g de cloreto de cálcio; 4 % de glicose e 20 mL de gema de ovo. O meio foi inoculado com 3 µL de inóculo fúngico preparado em salina 0,85%, comparado com a escala de McFarland 0.5 (1 a 5×10^6 células/mL). As placas de Petri foram incubadas a 37°C e o diâmetro das colônias e da área de precipitação mais a colônia foram medidos 96 horas após a inoculação. Os experimentos foram feitos em duplicata. As medidas e cálculos da zona de precipitação (Pz) da fosfolipase foram feitos de acordo com o descrito por Price *et al.* (1982), a partir da média dos valores obtidos na duplicata, os coeficientes encontrados foram classificados em 5 grupos:

Pz=1, negativo; Pz entre 0.9 e 0.99, fraco; Pz entre 0.80 e 0.89, moderado; Pz entre 0.70 e 0.79, forte; Pz<0.70, muito forte (PRICE *et al*, 1982).

A atividade da catalase foi constatada em meio Sabouraud com adição de solução de peróxido de hidrogênio a 3% sobre a cultura fúngica, segundo metodologia modificada de Shin & Kim (1998).

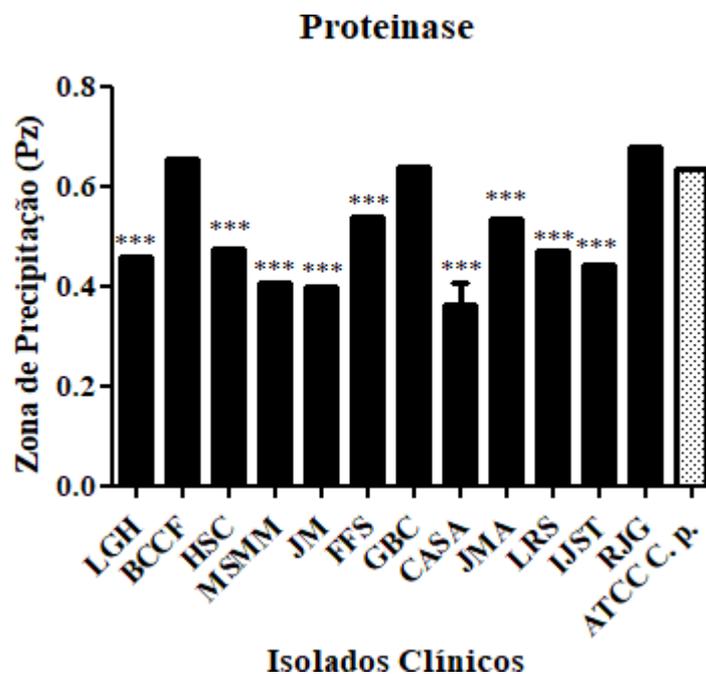
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proteinase é uma enzima que desintegra as proteínas vitais. As proteinases são divididas em quatro tipos: serina proteinase, aspartil proteinase, cisteína proteinase e metaloproteinase. *Candida* secreta aspartil proteinases secretoras (SAP), que é uma das moléculas multifuncionais envolvidas na patogênese da *Candida*, a produção dessa molécula por fungos aumenta a colonização e penetração do mesmo no tecido do hospedeiro (Gonçalves *et al*, 2016).

Os genes SAP que variam de SAP1-SAP10 foram identificados em *C. albicans*. A SAP é um dos principais marcadores para determinar os diferentes tipos de candidíase (Gonçalves *et al*, 2016).

Para observar a presença da exoenzima com capacidade de degradar proteínas realizou-se o teste de proteinase como mostra a Figura 1.

Figura 1. Produção de proteinase dos isolados fúngicos



Negativo: Pz = 1; Fraco: Pz entre 0.9 e 0.99; Moderado: Pz entre 0.80 e 0.89; Forte: Pz entre 0.70 e 0.79; Muito forte: Pz < 0.70. *** p<0,05. Fonte: Elaboradas pelos próprios autores.

De acordo com a Figura 1, observou-se que todos os isolados fúngicos foram positivos para a produção da exoenzima. Destaca-se que todas as amostras apresentaram a Zona de Precipitação (PZ) $< 0,70$ sendo consideradas de acordo com sua intensidade muito forte produtoras de proteinase.

As fosfolipases fazem parte de um grupo de hidrolises que quebram os fosfolipídeos em ácidos graxos e outras substâncias lipofílicas. A produção de fosfolipase é vista como um dos principais critérios para identificar cepas invasivas, virulentas e não virulentas de *Candida* (Motenegro, 2018).

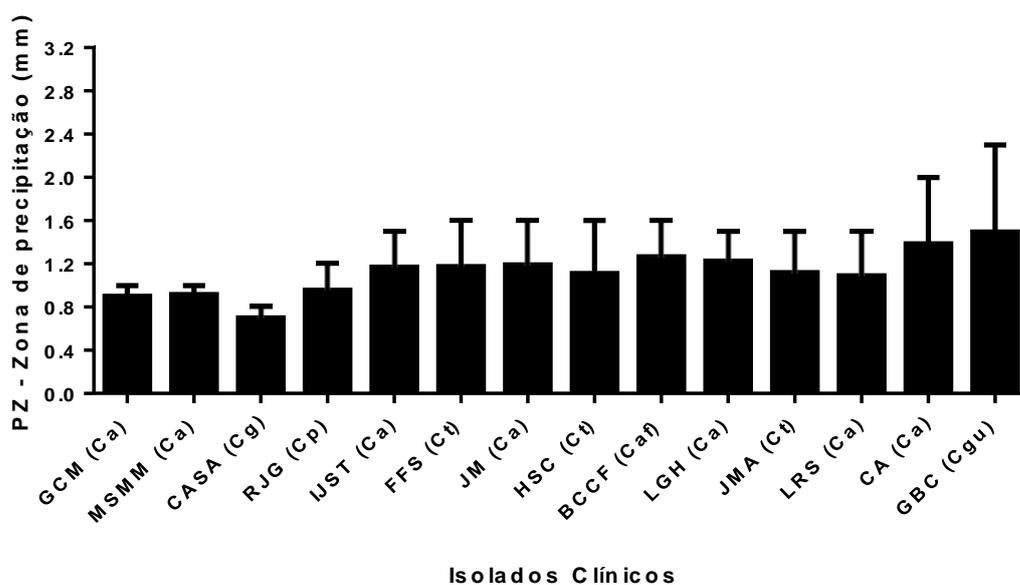
Segundo Junior e De Andrade Monteiro (2012), as atividades de fosfolipase são consideradas como um papel importante na patogênese de fungos oportunistas. A presença de fosfolipase em amostras de *C. albicans* e outras espécies de fungos invasivos estão relacionados à virulência das espécies.

De acordo com o trabalho de Campos e Baroni (2010) a maioria das cepas apresentaram atividade muito forte para produção de fosfolipase (75%). No estudo de Costa *et al.* (2010), a maioria dos isolados apresentaram atividade enzimática para produção de fosfolipase, o que corrobora os resultados obtidos no presente estudo. Da mesma forma, no estudo de Hartmann *et al* (2016), através da determinação da atividade fosfolipídica dos 24 isolados fúngicos foi possível observar que 37,5% das cepas dispunham de atividade positiva para exoenzimas.

A atividade enzimática dos isolados fúngicos possibilita confirmar o aumento da patogenicidade dos microrganismos, pois a presença de tais fatores de virulência auxilia os mesmos na penetração e colonização de tecidos mais profundos causando quadros mais abrasivos para o hospedeiro, tendo em vista, que as micoses invasivas são negligenciadas e acabam levando o indivíduo portador a óbito. Logo, um maior potencial de virulência manifestado associado, por exemplo, a possíveis quadros de imunossupressão, eleva o número de quadros da doença (Andreola *et al* 2016).

A avaliação da produção de exoenzimas como a fosfolipase para isolados fúngicos é relevante para a verificação do potencial de virulência dos fungos, tendo em vista que conferem ao microrganismo mecanismos que facilitam sua penetração em tecidos mais profundos (Junior, De Andrade Monteiro, 2012), causando micoses invasivas. Os resultados são apresentados na Figura 2.

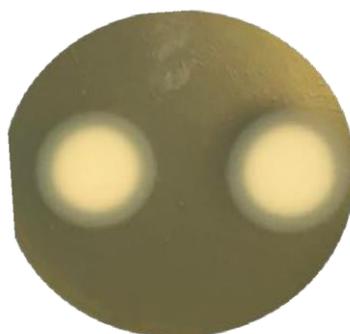
Figura 2. Produção de fosfolipase dos isolados fúngicos



Ca: *Candida albicans*; Ct: *Candida tropicalis*; Caf: *Candida africana*; Cp: *Candida parapsilosis*; Cgu: *Candida guilliermondii*; Cg: *Cryptococcus gattii*; * P < 0,05. Fonte: Elaboradas pelos próprios autores.

O resultado positivo para o teste de fosfolipase é confirmado através da formação de um halo opaco ao redor da colônia. Dos isolados testados, todas as cepas apresentaram formação do halo, indicando uma maior produção significativa ($p < 0,05$) da enzima, como ressalta a Figura 3.

Figura 3. Placa de Petri com formação do Halo

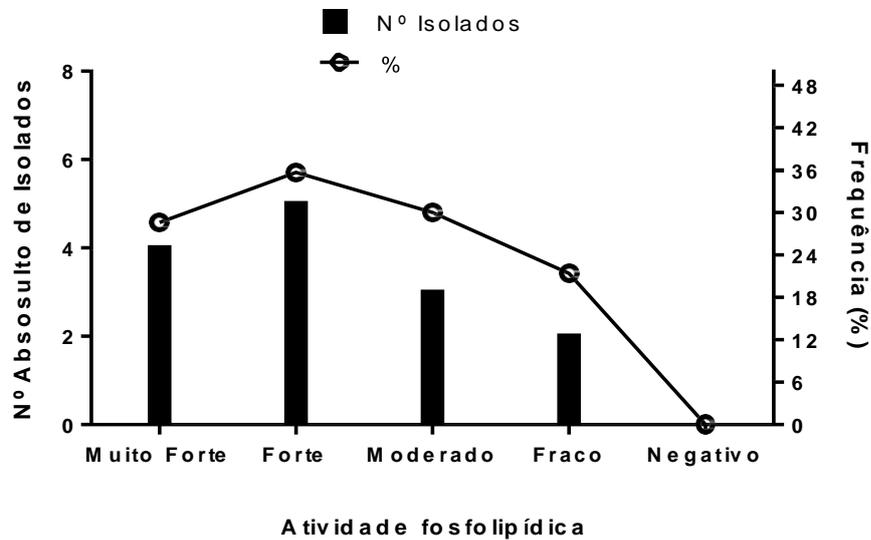


Fonte: Elaboradas pelos próprios autores.

É interessante destacar que isolados como CA e GBC foram as cepas que apresentaram maior halo (PZ) e isso explica um potencial significativo para o fungo, pois a presença da fosfolipase funciona como um mecanismo auxiliador na colonização e infecção de tecidos mais profundos. Porém, em contrapartida, houve isolados que a presença da enzima foi tida como moderada como nas amostras GCM e MSMM e outros apresentaram a exoenzima, porém com PZ inferiores, como no isolado CASA.

A classificação da intensidade da produção das enzimas fosfolipase encontra-se na figura 4.

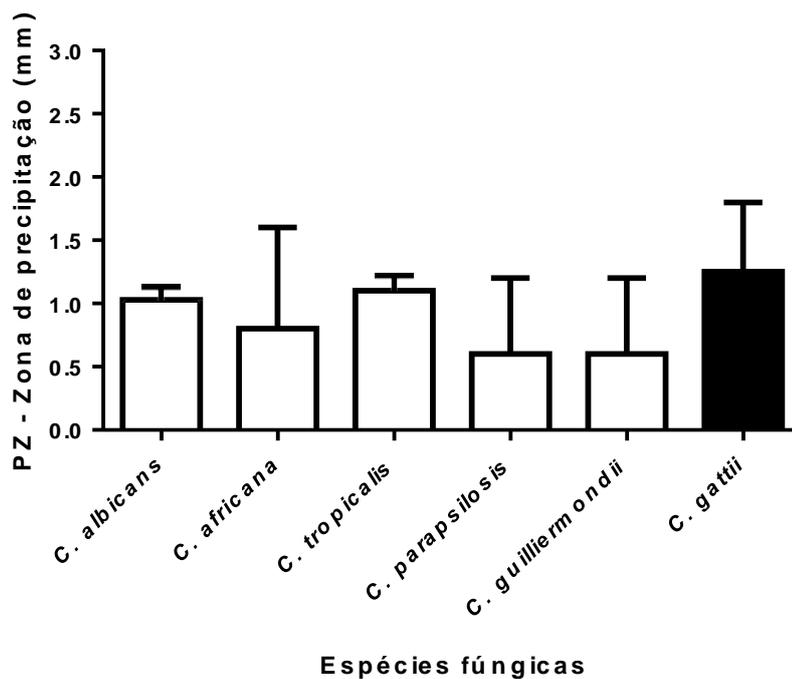
Figura 4. Intensidade da Produção de fosfolipase (Pz) dos isolados fúngicos.



Negativo: Pz = 1; Fraco: Pz entre 0.9 e 0,99; Moderado: Pz entre 0.80 e 0.89; Forte: Pz entre 0.70 e 0.79; Muito forte: Pz < 0.70. Fonte: Elaboradas pelos próprios autores.

Na figura 5, observa-se a comparação da média da Zona de Precipitação entre as diferentes espécies fúngicas.

Figura 5. Zona de Precipitação (PZ) das diferentes espécies fúngicas.



Barras brancas: isolados de *Candida* spp; Barra preta: isolados de *Cryptococcus* spp. *P<0,05. Fonte: Elaboradas pelos próprios autores.

Observa-se na Figura 5, a comparação da Zona de Precipitação das diferentes espécies fúngicas, em que os isolados de *C.tropicalis* apresentaram PZ mais elevada se comparada às outras espécies desse mesmo gênero. Já em relação ao gênero *Cryptococcus* spp, observou-se que a espécie *C.gattii* foi a que apresentou a maior PZ em detrimento das demais espécies de fungos leveduriformes. Houve diferença significativa ($p=0,0131$) entre a PZ média de *C. albicans* e a PZ média de *C. gattii*.

Isolados de *C. neoformans* e de *Candida* spp. possuem vários constituintes imunes inatos, incluindo a fosfolipase e catalase com o papel de colonização de tecidos como o cérebro e pulmões (YANG et al, 2017).

Conforme Souza (2022), a maioria das cepas positivas para produção de fosfolipase foi de amostras provenientes de secreção urinária e traqueal, apesar de não ser notada proporcionalidade no arranjo distribucional das espécies de *Candida* entre os materiais clínicos, visto que a maior atividade da fosfolipase foi definida nos isolados do trato respiratório.

A avaliação da produção de catalase pelos microrganismos foi confirmada pela conversão de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio por todos os isolados, favorecendo o potencial de virulência dos mesmos e auxiliando na penetração de tecidos mais profundos (Osorio et al 2021).

De acordo com Rodrigues et al (2008), a presença de catalase positiva permite com que o microrganismo invada tecidos mais profundos. Além disso, a catalase é uma metaloenzima antioxidante que converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular, tal exoenzima auxilia o fungo na driblagem imunológica contra o estresse oxidativo imposto pelo sistema imune do hospedeiro (Pinto, 2021).

As internações decorrentes de micoses representam uma fonte significativa de despesas para o Sistema Único de Saúde, gerando um impacto financeiro substancial que reverbera por toda a economia. Os altos custos associados ao tratamento hospitalar, incluindo medicamentos específicos, procedimentos cirúrgicos e acompanhamento médico especializado, sobrecarregam os recursos financeiros já limitados destinados à saúde pública. Além disso, essas internações acarretam uma perda adicional em termos de produtividade econômica, uma vez que tanto os pacientes quanto seus familiares muitas vezes precisam se afastar do trabalho para lidar com a situação de saúde (Russo, 2019; Freire, 2021).

4 CONCLUSÃO

Mediante esta pesquisa, ressalta-se uma preocupação diante da análise das micoses invasivas/opportunistas, tais quais a candidíase e criptococose, especialmente quando se entrelaça as infecções fúngicas à manifestação das exoenzimas que nelas se perfazem, notadamente a proteinase, fosfolipase e catalase.

Essas enzimas desempenham um papel crucial na patogenicidade desses fungos, aumentando sua capacidade de invasão e colonização de tecidos dos hospedeiros, especialmente em pacientes imunocomprometidos. Esses achados são ainda mais alarmantes quando se considera as altas taxas de infecções hospitalares, onde os pacientes estão frequentemente expostos a ambientes propícios à disseminação desses agentes patogênicos.

A compreensão da importância dessas exoenzimas na virulência dos fungos invasivos é essencial para o desenvolvimento de estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento. Intervenções direcionadas para a descoberta de cepas positivas para tais atividades enzimáticas podem oferecer novas perspectivas no controle dessas infecções e na melhoria dos resultados clínicos para os pacientes afetados.

Além disso, a conscientização sobre os riscos associados às infecções fúngicas invasivas e a implementação de medidas preventivas adequadas são cruciais para mitigar o impacto dessas doenças na saúde pública, especialmente em ambientes hospitalares.

As internações por micoses geram altos custos para o Sistema Único de Saúde, afetando negativamente a economia. Esses gastos, somados à perda de produtividade devido ao afastamento do trabalho, evidenciam a necessidade urgente de medidas preventivas eficazes. Investimentos em saúde preventiva e acesso equitativo ao tratamento são essenciais para aliviar a pressão sobre os recursos de saúde e promover uma economia mais sustentável.

Com isso, mais estudos na área devem ser realizados a fim de prevenir e tratar tais doenças que tanto afetam a população mundial, em especial a de países subdesenvolvidos como o Brasil, onde o saneamento básico e a saúde pública encontram-se em colapso.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório CEDRO pelo fornecimento das amostras fúngicas. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão (FAPEMA), pela Universidade CEUMA e com apoio da Universidade Federal do Maranhão, pelo Programa

Bionorte (Programa de Pós-Graduação da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal).

REFERÊNCIAS

- ANDREOLA, Patrícia et al. Estudo comparativo entre a produção de fosfolipases extracelulares e proteinases do gênero *Candida* isoladas a partir de infecções de cavidade oral. **Rev. odontol. UNESP (Online)**, v. 45, n. 4, p. 219-226, 2016.
- AOKI, S.; ITO-KUWA, S.; NAKAMURA, Y.; MASUHARA, T. Comparative pathogenicity of wild-type strains and respiratory mutants of *Candida albicans* in mice. **Zentralbl Bakteriol** 273: 332-343, 1990.
- BARBOSA, Monica Santiago et al. Análise das principais micoses encontradas na rotina de um laboratório de análises clínicas na cidade de Jataí, Estado de Goiás, Brasil. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 9, n. 1, p. 108-114, 2014.
- CALUMBY, Rodrigo José Nunes et al. Microbiota fúngica dos filtros do condicionador de ar e de superfícies em uma Unidade de Terapia Intensiva. **Revista Principia**, v. 59, n. 1, p. 10-19, 2022.
- CAMPOS, Felipe Lopes; BARONI, Francisco De Assis. Isolados de *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii* e *C. laurentii* produtores de protease e fosfolipase. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 39, n. 2, p. 83-90, 2010.
- CAVALCANTE, Felipe Sant'Anna; CAMPOS, Milton César Costa; DE LIMA, Janaína Paolucci Sales. A IMPORTÂNCIA DOS MACROFUNGOS PARA O MEIO AMBIENTE. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental**, v. 13, n. 1, 2024.
- COSTA, C. R.; PASSOS, X. S.; SOUZA, L. K. H; LUCENA, P. A.; FERNANDES, O. F. L; SILVA, M. R. R. Differences in exoenzyme production and adherence ability of *Candida* spp. isolates from catheter, blood and oral cavity. **Rev. Inst. Med. trop.**, São Paulo , v. 52, n. 3, p. 139-143, June 2010 .
- D'ECA JUNIOR, A.; SILVA, A. F.; ROSA, F. C.; MONTEIRO, S. G IGUEIREDO, P. M. S.; MONTEIRO, C. A. In vitro differential activity of phospholipases and acid proteinases of clinical isolates of *Candida*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 44, n. 3, p. 334-338, June 2011.
- FAVALESSA, Olivia Cometti; DOS ANJOS MARTINS, Marilena; HAHN, Rosane Christine. Aspectos micológicos e suscetibilidade in vitro de leveduras do gênero *Candida* em pacientes HIV-positivos provenientes do Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, p. 673-677, 2010.
- FREIRE, Claudevan Pereira. **Análise clínica e de custos do tratamento de pacientes coinfectados com meningite criptocócica e HIV em um Hospital do Nordeste do Brasil**. 2021.
- GONÇALVES, Bruna et al. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. **Critical reviews in microbiology**, v. 42, n. 6, p. 905-927, 2016.

HARTMANN, Andreia et al. Incidência de *Candida spp.* na mucosa oral de pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) no município de Santo Ângelo-RS. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 6, n. 3, p. 125-130, 2016.

JUNIOR, Aurean Deca; DE ANDRADE MONTEIRO, Cristina. Atividade diferencial in vitro de fosfolipases e proteinases ácidas de isolados clínicos de *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, 2012.

MONTENEGRO, Caroline de Souza. Papel da fosfolipase A2 secretória do grupo V na indução de eosinofilia sistêmica pela infecção por *Schistosoma mansoni* em camundongos. **Repositório Institucional Pantheon**, 2018.

OSORIO, Rodrigo de Paulo et al. **Análise da relação entre o potencial antioxidante dos ácidos ferúlico e p-cumárico e a enzima catalase de *saccharomyces cerevisiae***. 2021.

PINTO, Gabriel Vitor da Silva. Análise e identificação dos microrganismos presentes em fones de ouvido. **Revista InterSaúde**, v. 1, n. 5, p. 37-51, 2022.

PRICE, M.F.; WILKINSON, I.D.; GENTRY, L.O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia** 20: 7-14.1982.

RODRIGUES, Marcio L. et al. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 1, p. 58-67, 2008.

RUSSO, Letícia Xander et al. Análise da eficiência dos tratamentos hospitalares de hiv/aids e seus determinantes nas unidades federativas do Brasil. **Revista Econômica do Nordeste**, v. 50, n. 4, p. 79-95, 2019.

SHIKANAI-YASUDA, Maria Aparecida et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Epidemiologia e Serviços de Saude**, 2018.

SHIN K-SOO, Kim C-Jin (1998) Decolorisation of artificial dyes by peroxidase from the white-rot fungus, *Pleurotus ostreatus*. **Biotechnology Letters** 20:569-572.

SILVA, Clécia Patrocínio da. **Quem é o doente? Um estudo sobre as vivências dos acompanhantes de pacientes adultos em hospital público no Rio Grande do Norte**. 2013. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

SOUZA, Misma Kilvia Frazão de. ***Candida krusei*: aspectos atuais sobre epidemiologia, fatores de virulência e resistência antifúngica**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Avaliação da suscetibilidade a antifúngicos e formação de biofilme de amostras clínicas em hospital de referência no Estado do Maranhão

RESUMO

Objetivo: Descrever o perfil de sensibilidade antifúngica de isolados clínicos de *Candida* e *Cryptococcus* spp. e investigar a formação de biofilme sobre substratos abióticos diversos. **Métodos:** O estudo foi realizado com amostras biológicas de pacientes internados em Unidades Hospitalares de São Luís-MA, no período de Janeiro de 2020 a Janeiro de 2024. As amostras foram coletadas para identificação das espécies fúngicas pela técnica de MALDI-TOF/MS. Em seguida, foram realizados os testes de sensibilidade aos antifúngicos e testes de virulência, como: formação de biofilme em superfícies abióticas em placas de 96 poços e cateteres. **Resultados:** No teste de sensibilidade aos antifúngicos, aproximadamente 92,8% das amostras foram sensíveis à anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol. Além disso, no teste de formação de biofilme em cateter de poliuretano, todas as amostras foram capazes de produzir biofilme com ênfase nas cepas GCM e IJST que foram caracterizadas como produtoras fortes de biofilme em placa. **Conclusão:** Espera-se aumentar o conhecimento sobre a sensibilidade antifúngica e do perfil de virulência de leveduras isoladas de hospitais de referência. Isso permitirá criar programas de prevenção municipais e estaduais para reduzir surtos e gastos relacionados a manejo dos pacientes.

Palavras-chave: Biofilme, Fungos, Infecções, Suscetibilidade, Virulência.

ABSTRACT

Objective: To describe the sensitivity profile of clinical isolates of *Candida* and *Cryptococcus* spp. to antifungals and investigate biofilm formation on different abiotic substrates. **Methods:** The study was carried out with biological samples from patients admitted to Hospital Units in São Luís-MA, from January 2020 to January 2024. The samples were collected to identify the species fungal infections by the technique of MALDI-TOF/MS. Next, sensitivity tests to antifungals and virulence tests were carried out, such as: biofilm formation on abiotic surfaces in 96-well plates and catheters. **Results:** In the antifungal sensitivity test, approximately 92.8% of the samples were sensitive to amphotericin B, fluconazole, itraconazole and voriconazole. Furthermore, in the biofilm formation test on a polyurethane catheter, all samples were capable of producing biofilm with an emphasis on the GCM and IJST strains that were characterized as strong producers of biofilm on plaque. **Conclusion:** It is expected to increase knowledge about the antifungal sensitivity and virulence profile of yeasts isolated from reference hospitals. This will allow the creation of municipal and state prevention programs to reduce outbreaks and costs related to patient management.

Key words: Biofilm, Fungi, Infections, Susceptibility, Virulence.

INTRODUÇÃO

Os fungos têm atraído a atenção de cientistas e pesquisadores por representarem um potencial risco à saúde de humanos e animais. Por meio dessas pesquisas, foi possível analisar a diversidade e complexidade de várias espécies de fungos, avaliando a patogenicidade de diferentes grupos desses microrganismos. A maioria dos fungos é cosmopolita, podendo ser encontrada em quase todos os ambientes naturais, como solo, seres humanos, plantas, materiais em decomposição e animais domésticos (Cavalcante SB, et al. 2022; Souto SRL, et al. 2023). A taxa de colonização desses microrganismos pode variar conforme as superfícies e habitats em que se encontram (Da Silva BC et al., 2020; Machado et al., 2021).

As micoses sistêmicas são doenças adquiridas principalmente pela inalação de propágulos de fungos, que podem danificar tecidos pulmonares. Pesquisas realizadas no semiárido nordestino, especialmente nos estados do Ceará, Maranhão e Piauí, revelaram um aumento nos índices de morbimortalidade devido às micoses pulmonares. Como essas doenças não são de notificação compulsória, a gravidade da situação pode ser ainda maior (Queiroz F e Dos Santos M, 2021; Lima ERA, 2023).

Atualmente, muitos pacientes são frequentemente internados em hospitais e postos de saúde no Brasil devido à alta incidência de micoses sistêmicas e oportunistas. As principais micoses endêmicas no país incluem criptococose, candidíase, aspergilose e pneumocistose (Shikanai-Yasuda MA, et al.2018; Vilar DNS, 2023).

De forma geral, este projeto é justificado pela necessidade de entender como as infecções causadas por fungos patogênicos representam um desafio médico global, principalmente porque a maioria dessas patologias não possui notificação compulsória pelo Estado Federativo. Consequentemente, casos de internações por micoses invasivas, como criptococose, pneumocistose e candidíase, vêm complicando o manejo clínico e tratamento medicamentoso. Além disso, o número de micoses invasivas em indivíduos imunocompetentes tem aumentado gradualmente, especialmente devido à infecção por cepas de *Cryptococcus gatti* e outras leveduras emergentes, como *Cryptococcus laurentii*. Esses aspectos indicam a presença de novos fatores de virulência que podem ser expressos por essas leveduras (Veríssimo C et al., 2016; Cardoso CM et al., 2020; Balde MS, 2023; Corrêia CEB et al., 2023).

Portanto, considerando que as infecções fúngicas são doenças negligenciadas, possuem relevância para a saúde pública, e que esses microrganismos possuem ampla biodiversidade e estão presentes em diversos ambientes, o objetivo deste trabalho foi descrever o perfil de sensibilidade antifúngica de isolados clínicos de *Candida* e *Cryptococcus* spp. e investigar a formação de biofilme sobre substratos abióticos diversos. Esse estudo visa aumentar o conhecimento científico, tanto acadêmico quanto entre os profissionais de saúde, trazendo benefícios à população e influenciando as decisões em níveis municipal, estadual e federal.

MÉTODOS

Para atender aos requisitos da Resolução 466/12 e suas complementares, o Projeto de Pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade CEUMA (Número do Parecer 2.927.864, CAAE: 99142118.5.0000.5084). O estudo transversal, realizado de janeiro de 2020 a janeiro de 2024, abrangeu um hospital de referência para doenças infectocontagiosas, localizado em São Luís-MA. Catorze amostras biológicas foram coletadas por profissionais experientes, habilitados e enviadas para um Laboratório de Análises Clínicas em São Luís-MA para identificação fúngica.

Os fungos foram identificados usando a técnica automatizada MALDI-TOF e enviados ao Laboratório de Microbiologia Ambiental da Universidade CEUMA, onde foram mantidos em meio Ágar Sabouraud e incubados a 28 e 37°C. Posteriormente, foram armazenados em meio BHI + glicerol (10%) na Coleção de Culturas do Laboratório, congelados a -20°C e refrigerados para testes de virulência e susceptibilidade a antifúngicos.

A análise de susceptibilidade *in vitro* foi realizada pela técnica de microdiluição usando o protocolo padronizado pelo CLSI (2008). Antes dos testes, os isolados foram subcultivados em Agar Sabouraud Dextrose, por um período de 24 horas a 7 dias, a 28° e a 37°C. Todos os testes foram realizados em duplicata para cada isolado no meio RPMI-1640. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada para os antifúngicos Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol, Anfotericina B. As placas foram incubadas a 28°C ou a 37°C, por até 72 horas para determinação da CIM, por meio da leitura visual para inibição do crescimento quando comparado ao controle.

Os pontos de corte foram: Fluconazol: CIM ≤ 8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (S-Sensível), 16-32 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (SDD- Sensível Dose-Dependente) e ≥ 64 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (R-Resistente); Itraconazol: CIM $< 0,125$ (S), 0,25-0,5 (SDD) e > 1 (R); Voriconazol: CIM $< 0,125$ (S), 0,25-0,5 (SDD) e > 1 (R); Anfotericina B: CIM < 1 (S) e > 1 (R) (CLSI, 2008).

A formação de biofilme foi avaliada em microplacas de 96 poços pela metodologia sugerida por Shin JH et al. (2002), com modificações. Primeiramente, as amostras foram semeadas em meio ágar Sabourand e incubadas em estufa a 37°C por 48 horas. Em seguida, os isolados foram diluídos em salina de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland que corresponde a 1 a 5 x 10⁶ células por mL (CLSI, 2008). Os poços das placas foram preenchidos sequencialmente em triplicatas. No controle negativo, foi transferido somente 200 μL do meio e no restante dos poços, 180 μL de meio mais 20 μL da suspensão fúngica em salina. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas em estufa. Posteriormente, foram lavadas duas vezes com soro fisiológico estéril e adicionado em cada poço 200 μL de metanol por quinze minutos para fixação. As placas foram lavadas com soro fisiológico por duas vezes e em seguida adicionou-se 200 μL de cristal violeta para coloração, e por fim foi acrescentado 250 μL de etanol para lavagem dos poços, então submetidas à

espectrofotometria com um filtro de 550 nm para medir a respectiva absorbância para cada poço.

Baseado na densidade óptica dos isolados (D.O.i), e tomando como base a do controle negativo (D.O.c), os isolados foram classificados nas seguintes categorias: Não-Produtor: $D.O.i < D.O.c$; Produtor Fraco: $D.O.c < D.O.i \leq (2X D.O.c)$; Produtor Moderado: $(2X D.O.c) < D.O.i \leq (4X D.O.c)$; Produtor Forte: $(4X D.O.c)$.

O ensaio de biofilme em cateter foi realizado seguindo a metodologia de Souza *et al.* (2015), com algumas alterações. Cateteres de poliestireno estéreis, cortados em 4 cm, foram imersos em Caldo Sabouraud e as cepas em estudo e incubados por 48 horas a 37°C. Depois, foram lavados com PBS e vortexados para remover células não aderidas. Para análise semiquantitativa, os cateteres foram rolados em placas de ágar Sabouraud. Na análise quantitativa, o sobrenadante da última lavagem foi diluído e plaqueado em ágar Sabouraud. Ambas as placas foram incubadas por 48 horas a 37°C para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC).

RESULTADOS

A partir das amostras clínicas, sete isolados foram identificados como *Candida albicans*, uma como *C. africana*, três como *C. tropicalis*, uma como *C. parapsilosis*, uma como *C. guilliermondii* e um como *Cryptococcus gattii*. No teste de sensibilidade às drogas antifúngicas de escolha para o tratamento das infecções, aproximadamente 92,8% das amostras apresentaram sensibilidade à anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol (Tabela 1) que são fármacos antifúngicos utilizados para o tratamento de micoses como a criptococose e a candidíase. Um dos isolados (LRS) apresentou resistência ao fluconazol, tendo em vista que o mesmo faz parte do gênero *Candida*, e que tal droga é escolha para o tratamento da candidíase.

Tabela 1: Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/ml}$).

Isolados	Origem	Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/ml}$)			
		Fluconazol	Voriconazol	Itraconazol	Anfotericina B
GCM (Ca)	Escarro	0,5	0,12	0,25	0,25
MSMM (Ca)	Urina	0,5	0,25	0,12	0,25
IJST (Ca)	Urina	0,25	0,12	0,12	0,5
LGH (Ca)	Urina	0,5	0,12	0,25	0,5
BCCF (Caf)	Escarro	0,5	0,12	0,25	0,25
FFS (Ct)	Escarro	0,25	0,12	0,25	0,25
JM (Ca)	Escarro	0,25	0,25	0,25	0,25
CASA (Cg)	Líquor	4	0,12	0,12	0,12
HSC (Ct)	Urina	2	0,12	0,25	0,25
RJG(Cp)	Urina	1	0,12	0,25	0,25
GBC (Cgu)	Urina	1	0,25	0,12	0,12

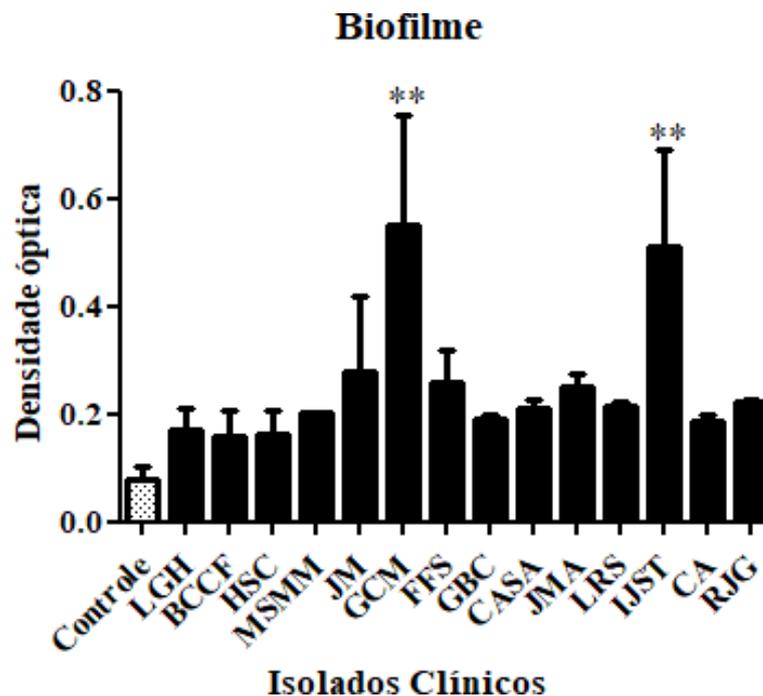
JMA (Ct)	Urina	0,5	0,25	0,12	0,12
CA (Ca)	Escarro	0,5	0,25	0,12	0,12
LRS (Ca)	Escarro	>64	2	2	1

Legenda: Ca: *Candida albicans*; Ct: *Candida tropicalis*; Caf: *Candida africana*; Cp: *Candida parapsilosis*; Cgu: *Candida guilliermondii*; Cg: *Cryptococcus gattii*.

Fonte: Fontenelle PHC, et al., 2024.

Tendo em vista a importância formação de biofilme, realizou-se o teste de produção de biofilme em superfícies abióticas. Baseado na densidade óptica dos isolados (D.O.i), e tomando como base a do controle negativo (D.O.c), todos os isolados foram formadores de biofilme (Figura 1). Isolados como LGH, BCCF e HSC mostraram-se produtores fracos de biofilme. Em contrapartida as amostras JM e FFS foram consideradas produtores moderados de biofilme. As cepas GCM e IJST foram caracterizadas como produtoras fortes de biofilme em placa.

Figura 1: Produção de biofilme dos isolados fúngicos em placa de 96 poços.



Legenda: **p<0,01; ***p<0,001; Ca: *Candida albicans*; Ct: *Candida tropicalis*; Caf: *Candida africana*; Cp: *Candida parapsilosis*; Cgu: *Candida guilliermondii*; Cg: *Cryptococcus gattii*

Fonte: Fontenelle PHC, et al., 2024.

Para avaliação da formação de biofilme na superfície do cateter de poliuretano foram aplicados os métodos qualitativos e quantitativos de acordo com metodologia utilizada. Na Tabela 2 observa-se o crescimento dos isolados fúngicos após a diluição seriada.

Tabela 2: Formação de Biofilme em Cateter de Poliuretano (Método Qualitativo)

Amostras	UFC/Placa		
	1:10	1:100	1:1000
GBC	5	3	0
HSC	8	7	1
CASA	4	3	1
JMA	4	3	1
RJG	12	10	1
GCM	3	2	1
LGH	6	5	3
BCCF	5	4	3
FFS	9	8	4
MSMM	8	7	5
ISST	9	7	3
JM	10	9	2
LRS	6	5	2
CA	3	2	0
CN	0	0	0

Fonte: Fontenelle PHC, 2024. CN: controle negativo

Por meio do método semi-quantitativo observou-se a formação de colônias por meio do rolamento do cateter de poliuretano em placa, como mostra a Tabela 3. Em relação às amostras BCCF, RJG, GCM, observou-se colonização baseada no crescimento fúngico em placa (com crescimento ≥ 15 UFC/placa) indicativo de aderência do microrganismo na superfície abiótica. Entretanto em relação à amostra CASA, notou-se que o microrganismo formou biofilme, porém em uma quantidade inferior as demais amostras testadas.

Tabela 3: Formação de Biofilme em Cateter de Poliuretano (Método Semi-quantitativo).

Amostra	UFC/Placa	Classificação
GBC	671	Colonização
HSC	157	Colonização
CASA	16	Colonização

JMA	179	Colonização
RJG	399	Colonização
GCM	400	Colonização
LGH	90	Colonização
BCCF	523	Colonização
FFS	432	Colonização
MSMM	272	Colonização
ISST	342	Colonização
JM	36	Colonização
LRS	270	Colonização
CA	206	Colonização
CN	0	Não Colonização

Fonte: Fontenelle PHC, et al., 2024. **Legenda:** CN: controle negativo.

DISCUSSÃO

As micoses são doenças frequentemente negligenciadas e, na maioria das vezes, subdiagnosticadas, configurando um grave problema de saúde pública, uma vez que a maioria não possui notificação obrigatória no Brasil. Há uma escassez de dados acerca das áreas endêmicas, prevalência, incidência e morbidade associadas às micoses em áreas endêmicas. No presente estudo, foram isoladas diferentes espécies de *Candida* e uma de *Cryptococcus gattii*. Segundo Shikanai-Yasuda MA et al. (2018), a região Nordeste do Brasil tem o maior número de casos de micoses invasivas, com destaque para os estados do Piauí, Ceará, Maranhão e Bahia. Além disso, foram registrados casos em áreas de desmatamento, como partes dos estados do Maranhão, Tocantins, Pará e regiões da Amazônia.

A proliferação urbana de pombos constitui um grave problema de saúde pública devido ao risco de transmissão de doenças, especialmente fúngicas. De acordo com Fonseca AR et al. (2018), as fezes desses pássaros oferecem um ambiente ideal para o crescimento de fungos como *Cryptococcus neoformans*, responsável pela criptococose. Esta doença pode ser particularmente perigosa para pessoas imunocomprometidas, levando a infecções graves. Além disso, a presença de pombos pode agravar problemas respiratórios em grupos vulneráveis. Controlar a população de pombos e manter a limpeza urbana são medidas essenciais para reduzir esses riscos, protegendo a saúde comunitária e prevenindo surtos de doenças.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta que as doenças infecciosas são as principais responsáveis por mortalidade e incapacidade global, com uma estimativa de 4,95 milhões de mortes anuais, das quais 1,27 milhão estão associadas à resistência a antimicrobianos. Infecções fúngicas estão crescendo globalmente,

especialmente em pacientes imunocomprometidos, e apresentam desafios no tratamento devido à escassez de antifúngicos e à resistência desenvolvida pelos microrganismos (Araújo RKS et al., 2023).

Nos últimos anos, os antifúngicos fluconazol, voriconazol, itraconazol e anfotericina B têm sido os importantes medicamentos utilizados para tratar infecções fúngicas invasivas, como candidíase e criptococose, tanto para profilaxia quanto para tratamento (Berto et al., 2018). No presente estudo, esses antifúngicos foram empregados, e a maioria das amostras clínicas foi sensível, enquanto algumas mostraram resistência *in vitro* ao fluconazol, com destaque para as espécies não-*albicans* que apresentaram maiores valores de CIM. Favalessa et al. (2018), também observaram que isolados não-*albicans* (*C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. africana*) tendem a ter valores de CIM mais altos para os azóis do que *C. albicans*, indicando menor suscetibilidade antifúngica.

Esses dados de resistência corroboram o estudo de Rodrigues DKB et al. (2021), que encontrou baixa suscetibilidade ao fluconazol em 6,4% dos isolados de *C. parapsilosis* (0,12 a >64 µg/mL), 50% de *C. guilliermondii* (64 µg/mL), 66,6% de *C. haemulonii* var. *vulnera* (16-32 µg/mL) e cepa *C. duobushaemulonii* (CIM 64 µg/mL) em 22 hospitais públicos do estado de São Paulo.

Um estudo realizado no Irã por Badiee P et al. (2022), encontrou que as espécies mais frequentemente isoladas foram *C. albicans* e *C. glabrata*, com valores de CIM 90 de 0,25 µg/mL para voriconazol, 0,5 µg/mL para anfotericina B, 2 µg/mL para itraconazol e 16 µg/mL para fluconazol. Darma S et al. (2020), estudaram 355 pacientes com presumível tuberculose multirresistente e encontraram 31,8% com escarro positivo para *Candida* spp., com suscetibilidade dos isolados a fluconazol, itraconazol e cetoconazol de 38,3%, 1,3% e 10,7%, respectivamente.

Microrganismos podem aderir a superfícies bióticas e abióticas, formando biofilmes, sendo um foco importante de pesquisa, com diversos estudos voltados para a desestabilização dessas estruturas (Cerqueira et al., 2024). Em nosso estudo, todos os isolados foram capazes de formar biofilmes tanto em superfícies abióticas (placas) quanto bióticas (cateteres).

A susceptibilidade aos antifúngicos e a formação de biofilme estão inter-relacionadas, como evidenciado no presente estudo. A capacidade dos fungos de formar biofilmes em superfícies abióticas, como cateteres e placas, aumenta significativamente a resistência aos tratamentos antifúngicos convencionais (De Paula MR et al., 2021).

Biofilmes proporcionam um ambiente protetor para os fungos, dificultando a penetração dos medicamentos e, assim, elevando os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM), especialmente para isolados não-*albicans*. Esses isolados, como *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, demonstram menor suscetibilidade a antifúngicos como fluconazol, refletindo uma resistência preocupante que agrava o desafio no tratamento das infecções. Além disso, a resistência adquirida devido ao uso inadequado de antifúngicos e a proliferação de biofilmes em ambientes hospitalares

contribuem para infecções persistentes e de difícil erradicação, exacerbando o impacto na saúde pública e os custos associados ao sistema de saúde (Vieira AJH e Santos JI, 2017; Oliveira et al., 2018; Fonseca MM et al., 2023).

El-Baz AM et al. (2021) também investigaram a capacidade de *C. albicans* de formar biofilmes, utilizando o ensaio com violeta de cristal. Dos 21 isolados testados, 11 foram identificados como fortes produtores de biofilme, um como moderado e nove como fracos, com oito dos 11 isolados fortes sendo de infecção do trato urinário. Na pesquisa de Bisso et al. (2023), todos os isolados formaram biofilmes, com 4 isolados de *C. neoformans* classificados como fortes produtores e outros da mesma espécie como produtores moderados.

As internações decorrentes de micoses representam uma fonte significativa de despesas para o Sistema Único de Saúde, gerando um impacto financeiro substancial que reverbera por toda a economia. Os altos custos associados ao tratamento hospitalar, incluindo medicamentos específicos, procedimentos cirúrgicos e acompanhamento médico especializado, sobrecarregam os recursos financeiros já limitados destinados à saúde pública. Além disso, essas internações acarretam uma perda adicional em termos de produtividade econômica, uma vez que tanto os pacientes quanto seus familiares muitas vezes precisam se afastar do trabalho para lidar com a situação de saúde (Russo LX, 2019; Freire CP, 2021).

Assim, a partir deste estudo, podemos observar que o aumento na incidência do número de casos de micoses invasivas vem acarretando concomitantemente na elevação de pacientes em ambientes nosocomiais e isso traz grandes prejuízos à população, pois as micoses sistêmicas e oportunistas não são doenças de notificação compulsória.

Desta forma, é de suma relevância a necessidade de mais estudos acerca da influência dos fatores socioambientais e de virulência dos fungos patogênicos nas micoses invasivas. Além disso, algumas cepas mostraram-se resistentes a drogas de escolha para tratamento de doenças provocadas por fungos, confirmando o impacto do uso inadequado de drogas antimicrobianas.

CONCLUSÃO

Este estudo destaca que as micoses invasivas são um crescente problema de saúde pública no Brasil, frequentemente negligenciadas e erroneamente diagnosticadas devido à falta de notificação obrigatória. As infecções como candidíase e criptococose estão se tornando mais comuns, especialmente em áreas endêmicas e em locais afetados por desmatamento. A resistência antifúngica emergente e a proliferação de pombos, que contribuem para infecções como a criptococose, exacerbam a situação. Dada a importância econômica e o impacto das internações, é essencial intensificar os esforços para monitorar, prevenir e tratar essas infecções.

AGRADECIMENTOS E FINANCIAMENTO

Ao Laboratório CEDRO pelo fornecimento das amostras fúngicas. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão (FAPEMA), pela Universidade CEUMA e com apoio da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), pelo Programa Bionorte (Programa de Pós-Graduação da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal) e da Universidade de Pernambuco. J.R.A.S. é bolsista de produtividade em Pesquisa do CNPq – Nível 2 (Processo número: 317049/2023-2).

REFERÊNCIAS

1. ARAÚJO RKS et al. Risco emergente das infecções fúngicas invasivas: revisão da literatura. *Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação*, 2023; v. 9, n. 8, p. 1111-1125.
2. BADIEE P. et al. Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from 10 tertiary care hospitals in Iran. *Microbiology spectrum*, 2022; v. 10, n. 6, p. e02453-22.
3. BALDE MS. Ocorrência de infecções fúngicas em pacientes internados com Covid-19 em dois centros do Nordeste do Brasil, 2023; 40p.
4. BISSO et al. Biofilm formation and phospholipase and proteinase production in *Cryptococcus neoformans* clinical isolates and susceptibility towards some bioactive natural products. *The Scientific World Journal*, 2023; v. 2023.
5. CARDOSO CM et al. *Criptococose por espécies de Cryptococcus não-neoformans/não-gattii*. 2020; 50p.
6. CAVALCANTE SB et al. Produção de pigmentos por fungos antárticos e seu potencial antimicrobiano. 2022.
7. CERQUEIRA et al. A Cyclam Salt as an Antifungal Agent: Interference with *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* Mechanisms of Virulence. *Antibiotics*, 2024; v. 13, n. 3, 222p.
8. CORRÊIA CEB et al. Cryptococcal infections in individuals with diabetes: an epidemiological analysis of SUS data in Brazil from 2011 to 2020: Infecções criptocócicas em indivíduos com diabetes: uma análise epidemiológica dos dados do SUS no Brasil no período de 2011 a 2020. *Concilium*, 2023; v. 23, n. 18, 586-600p.
9. DA SILVA BC et al. Aspergilose: Uma análise dos riscos de sua não notificação em ambientes hospitalares. *Revista Transformar*, 2020; v. 14, n. 1, 448-473p.
10. DARMA S. et al. High frequency of azole resistant *Candida* spp. colonization among presumptive multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB) patients. *Plos one*, 2020; v. 15, n. 11, p. e0242542.
11. DE PAULA MR et al. Perfil de susceptibilidade e produção de biofilme de espécies *Candida* isoladas de corrente sanguínea de neonatos críticos. *Revista Multidisciplinar em Saúde*, 2021; v. 2, n. 2, 29-29p.
12. EL-BAZ AM. et al. Back to nature: Combating *Candida albicans* biofilm, phospholipase and hemolysin using plant essential oils. *Antibiotics*, 2021; v. 10, n. 1, 81p.

13. FONSECA AR et al. Levantamento de ratos, morcegos, pombos e cobras pelo setor de vigilância ambiental do município de Divinópolis–MG. *Hygeia: Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde*, 2018; v. 14, n. 27, 41p.
14. FONSECA MM et al. Perfil de sensibilidade do gênero *Candida* a antifúngicos em um hospital de referência de alta complexidade na região nordeste do Brasil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2023; v. 27, p. 103312.
15. FREIRE CP. Análise clínica e de custos do tratamento de pacientes coinfectados com meningite criptocócica e HIV em um Hospital do Nordeste do Brasil, 2021; 35p.
16. LIMA ERA. Meningite Criptocócica: uma revisão sobre o aspecto epidemiológico, patogênese, manifestações clínicas, diagnóstico e propostas terapêuticas. 2023; 55p.
17. MACHADO et al. *Candida auris*–fungo emergente que ameaça a saúde global. **Brazilian Journal of Development**, 2021; v. 7, n. 1, p. 9673-9681.
18. OLIVEIRA JMV, et al. Detecção e quantificação da expressão do gene ERG11 de *Candida albicans* sob diferentes concentrações de fluconazol. 2018.
19. RODRIGUES DKB et al. Antifungal susceptibility profile of *Candida* clinical isolates from 22 hospitals of São Paulo State, Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2021; v. 54,. e10928p.
20. RUSSO LX et al. Análise da eficiência dos tratamentos hospitalares de HIV/AIDS e seus determinantes nas unidades federativas do Brasil. *Revista Econômica do Nordeste*, 2019; v. 50, n. 4, 79-95p.
21. SHIKANAI-YASUDA MA et al. Brazilian guidelines for the clinical management of *paracoccidioidomycosis*. **Epidemiologia e Serviços de Saude**, 2018.
22. SHIN JH et al. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. **J. Clin. Microbiol**, 2002; 40 (4): 1244-48.
23. SOUTO SRL et al. Estudo da interação fungo-hospedeiro na esporotricose felina por meio da citologia por Imprint. 2023; 49p.
24. VERÍSSIMO C et al. Infecção fúngica em Portugal-o gigante adormecido. **Infeção e Sepsis**, 2016; v. 2, 19-27p.
25. IEIRA AJH e SANTOS, JI. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **Rbac**, 2017; v. 49, n. 3, p. 235-9.
26. ILAR DNS et al. Casos de Candidemia no Brasil, entre os anos de 2018 a 2021: Uma Revisão Narrativa. **Infeção e Sepsis**, 2023; v. 4, 19-27p.

ANEXO I

APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da Prevalência e sazonalidade de Infecções Fúngicas invasivas em Hospital de Referência no Estado do Maranhão e a influência dos fatores socioambientais

Pesquisador: JULIANA RIBEIRO ALVES DOS SANTOS

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 99142118.5.0000.5084

Instituição Proponente: CEUMA-ASSOCIACAO DE ENSINO SUPERIOR

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.927.864

Apresentação do Projeto:

A presente pesquisa propõe avaliar a Prevalência e sazonalidade de Infecções Fúngicas invasivas em Hospital de Referência no Estado do Maranhão e a influência dos fatores socioambientais. Será feito um estudo transversal, com amostra de conveniência e abordagem quantitativa e qualitativa, no período de Dezembro de 2018 a

Dezembro de 2019, na Unidade Hospitalar Presidente Vargas (São Luís-MA) que é referência para doenças infecto-contagiosas, como tuberculose, HIV e doenças tropicais (nestas incluídas as micoses) do Estado do Maranhão. Como critérios de inclusão: participarão da pesquisa todos os pacientes internados na Unidade Hospitalar com suspeita e/ ou confirmação de infecções fúngicas invasivas que concordarem em participar da pesquisa. Como critérios de exclusão: serão excluídos os pacientes que não apresentarem diagnóstico confirmado para infecções fúngicas invasivas ou que não concordarem em participar da pesquisa. Cada paciente selecionado previamente pelo Corpo Clínico do Hospital será convidado a participar da pesquisa por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). As amostras biológicas (soro, escarro, lavado brônquico, secreção traqueal, sangue total, soro, urina, liquor e biópsia) serão coletadas por profissionais experientes e serão encaminhadas ao Laboratório CEDRO (que já possui convênio com o Hospital

e realiza o diagnóstico dos pacientes da Unidade Hospitalar. Será avaliada a prevalência e a

Endereço: DOS CASTANHEIROS	CEP: 65.075-120
Bairro: JARDIM RENASCENCA	
UF: MA Município: SAO LUIS	
Telefone: (98)3214-4212	E-mail: cep@ceuma.br



CENTRO UNIVERSITÁRIO DO
MARANHÃO - UNICEUMA



Continuação do Parecer: 2.927.864

sazonalidade das infecções fúngicas no período de 12 meses. Para efetuar a associação das variáveis classificatórias com a presença ou ausência de infecção fúngica invasiva será feita pelo teste não paramétrico de qui-quadrado de independência. A análise estatística será avaliada pelo programa NCSS 11 (2016), com gráficos e tabelas de frequência, estimativa de média, desvio padrão, máximo e mínimo das variáveis numéricas. As variáveis numéricas em relação aos 2 grupos serão analisadas pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk e o teste t de student independente.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a influência das condições socioeconômicas e climáticas na prevalência e na sazonalidade de infecções fúngicas invasivas em Hospital de Referência para infectologia no Estado do Maranhão.

Objetivo Secundário:

Isolar e identificar os fungos causadores de micoses sistêmicas ou oportunistas em pacientes atendidos na Unidade Hospitalar Presidente Vargas (São Luís-MA).

Descrever o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e a virulência dos fungos isolados, obtidos a partir de amostras biológicas (escarro, lavado brônquico, secreção traqueal, hemocultura, soro, urina, líquido e biópsia).

Verificar a ocorrência de sazonalidade das infecções fúngicas invasivas e correlacionar com aspectos climáticos e socioeconômicos no Estado (MA).

Descrever o perfil epidemiológico das micoses oportunistas e sistêmicas e os fatores socio-demográficos dos pacientes em estudo.

Avaliar a prevalência das infecções fúngicas em pacientes atendidos em um hospital de Referência no Estado do Maranhão.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Existe um pequeno incômodo no momento da coleta dos materiais biológicos. O risco de infecção é desprezível, pois a coleta será realizada por profissional habilitado e com materiais estéreis e descartáveis do próprio hospital. Você contará com a assistência do pesquisador, se necessário em todas as etapas de sua participação no estudo.

Benefícios:

Os benefícios que você deverá esperar com a sua participação serão: avaliação médica e

Endereço: DOS CASTANHEIROS	CEP: 65.075-120
Bairro: JARDIM RENASCENÇA	
UF: MA	Município: SÃO LUIS
Telefone: (98)3214-4212	E-mail: cep@ceuma.br



CENTRO UNIVERSITÁRIO DO
MARANHÃO - UNICEUMA



Continuação do Parecer: 2.927.864

laboratorial mais ampliada da sua saúde, escolha da melhor terapia e orientação de medidas preventivas e terapêuticas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta relevância científica e certamente contribuirá para esclarecer aspectos importantes a respeito do tema.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos obrigatórios foram apresentados entretanto nem todos encontram-se corretamente preenchidos.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

O pesquisador deverá apresentar a este CEP relatório final da pesquisa

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1220736.pdf	15/09/2018 00:54:58		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDetalhado.pdf	15/09/2018 00:53:08	JULLIANA RIBEIRO ALVES DOS SANTOS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	15/09/2018 00:28:41	JULLIANA RIBEIRO ALVES DOS SANTOS	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoPesquisaHospital.pdf	14/09/2018 22:56:53	JULLIANA RIBEIRO ALVES DOS SANTOS	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	14/09/2018 22:54:46	JULLIANA RIBEIRO ALVES DOS SANTOS	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DeclaracaodePesquisadores.pdf	14/09/2018 22:51:24	JULLIANA RIBEIRO ALVES DOS SANTOS	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaodeInstituicaoInfraestrutura.pdf	14/09/2018 22:50:05	JULLIANA RIBEIRO ALVES DOS SANTOS	Aceito

Endereço: DOS CASTANHEIROS
Bairro: JARDIM RENASCENCA CEP: 65.075-120
UF: MA Município: SAO LUIS
Telefone: (98)3214-4212 E-mail: cep@ceuma.br



CENTRO UNIVERSITÁRIO DO
MARANHÃO - UNICEUMA



Continuação do Parecer: 2.927.864

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO LUIS, 30 de Setembro de 2018

Assinado por:

RUDYS RODOLFO DE JESUS TAVAREZ
(Coordenador(a))

Endereço: DOS CASTANHEIROS

Bairro: JARDIM RENASCENCA

CEP: 65.075-120

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)3214-4212

E-mail: cep@ceuma.br

ANEXO II

Comprovantes de Aceitação e Artigo Publicada na Revista Observatorio de La Economía Latinoamericana dos Artigos, Qualis A4 2017-2020.



REVISTA
OBSERVATORIO
DE LA ECONOMÍA
LATINOAMERICANA

REVISTA OBSERVATORIO DE LA ECONOMIA LATINOAMERICANA

ISSN: 1696-8352

**Fatores de virulência de isolados fúngicos de ambiente hospitalar em
uma região de transição Amazônia-Cerrado**

**Virulence factors of fungal isolates from hospital environments in
Amazon-Savanna transition region**

**Factores de virulencia de aislamientos fúngicos provenientes de
ambientes hospitalarios en una región de transición Amazon-Cerrado**

DOI: 10.55905/oelv22n6-123

Receipt of originals: 05/03/2024

Acceptance for publication: 05/31/2024

Pedro Henrique Cunha Fontenelle
Mestre em Meio Ambiente
Instituição: Universidade Ceuma



*Observatorio de La Economía
Latinoamericana*

DECLARAÇÃO

A Revista Observatorio de La Economía Latinoamericana, ISSN 1696-8352 declara para os devidos fins, que o artigo intitulado “Fatores de virulência de isolados fúngicos de ambiente hospitalar em uma região de transição Amazônia-Cerrado” de Pedro Henrique Cunha Fontenelle, Sirlei Garcia Marques, Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo, Yankee Costa Magalhães Diniz, Beatriz Gomes dos Santos, Rodrigo Assuncao Holanda, Julliana Ribeiro Alves Santos, foi publicado no v. 22, n .6, p. 01-16.

A revista é on-line, e os artigos podem ser encontrados ao acessar o link:

<https://ojs.observatoriolatinoamericano.com/ojs/index.php/olel/issue/view/40>

DOI: <https://doi.org/10.55905/oelv22n6-123>

Por ser a expressão da verdade, firmamos a presente declaração.

São José dos Pinhais, 13 de Junho de 2024.

Equipe editorial



Fatores de virulência de isolados fúngicos de ambiente hospitalar em uma região de transição Amazônia-Cerrado

Virulence factors of fungal isolates from hospital environments in Amazon-Savanna transition region

Factores de virulencia de aislamientos fúngicos provenientes de ambientes hospitalarios en una región de transición Amazon-Cerrado

DOI: 10.55905/oelv22n6-123

Receipt of originals: 05/03/2024

Acceptance for publication: 05/31/2024

Pedro Henrique Cunha Fontenelle

Mestre em Meio Ambiente

Instituição: Universidade Ceuma

Endereço: São Luis, Maranhão, Brasil

E-mail: pedrohfontenelle@hotmail.com

Sirlei Garcia Marques

Doutora em Microbiologia

Instituição: Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Endereço: São Luis, Maranhão, Brasil

E-mail: sirleigmarques@gmail.com

Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo

Doutora em Microbiologia

Instituição: Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Endereço: São Luis, Maranhão, Brasil

E-mail: conceicaopedrozo@gmail.com

Yankee Costa Magalhães Diniz

Mestre em Ciências da Saúde

Instituição: Laboratório CEDRO e Hospital Universitário (HU - UFMA)

Endereço: São Luis, Maranhão, Brasil

E-mail: yankeecm@gmail.com

Beatriz Gomes dos Santos

Graduanda em Ciências Biológicas

Instituição: Universidade de Pernambuco (UPE)

Endereço: Recife, Pernambuco, Brasil

E-mail: beatriz.gsantos@upe.br

Rodrigo Assuncao Holanda

Doutor em Microbiologia

Instituição: Universidade de Pernambuco (UPE)

Endereço: Fortaleza, Ceará, Brasil

E-mail: raholanda@yahoo.com.br

Julliana Ribeiro Alves Santos

Doutora em Microbiologia

Instituição: Universidade de Pernambuco (ICB - UPE)

Endereço: Recife, Pernambuco, Brasil

E-mail: julliana.rasantos@upe.br

RESUMO

As micoses são doenças negligenciadas e representam um importante problema de saúde pública, apresentando uma alta morbimortalidade, embora a maioria delas não seja de notificação compulsória no Brasil. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar os fatores de virulência de isolados fúngicos em um hospital de referência em uma região de transição Amazônia-Cerrado. O estudo foi realizado com amostras biológicas de pacientes internados em Unidades Hospitalares de São Luis-MA, no período de Janeiro de 2020 a Janeiro de 2024. As amostras foram coletadas para identificação das espécies fúngicas pelo MALDI-TOF. Em seguida, foram realizados os testes de virulência. Dos isolados testados, todas as cepas apresentaram formação do halo, indicando uma maior produção significativa ($p < 0,05$) da fosfolipase. Observou-se que as amostras apresentaram a capacidade de produzir as exoenzimas proteinase, no qual destaca-se que todas as amostras apresentaram a Zona de Precipitação (PZ) $< 0,70$ sendo consideradas, de acordo com sua intensidade, como muito forte produtoras de proteinase e catalase positiva. Logo, este trabalho foi concebido com o propósito de adquirir entendimento acerca da patogenicidade dos fungos responsáveis pelas micoses invasivas e seu significado primordial para a saúde pública, visto que tais agentes causam infecções fúngicas graves que, lamentavelmente, conduzem um número substancial de pacientes ao óbito e geram custos elevados para o sistema único de saúde.

Palavras-chave: Biodiversidade, Fungos, Negligência, Virulência.

ABSTRACT

Mycoses are neglected diseases and represent an important public health problem, presenting high morbidity and mortality, although most of them are not mandatory notification in Brazil. Therefore, the objective of this work was to evaluate the virulence factors of fungal isolates in a reference hospital in Amazon-Savanna transition region. The study was carried out with biological samples from patients admitted to Hospital Units in São Luis-MA, from January 2020 to January 2024. The samples were collected to identify the fungal species using MALDI-TOF. Then, virulence tests were carried out. Of the isolates tested, all strains showed halo formation, indicating a significant ($p < 0.05$) greater production of phospholipase. It was observed that the samples presented the ability to produce proteinase exoenzymes, in which it is highlighted that all samples



presented a Precipitation Zone (PZ) < 0.70 and were considered, according to their intensity, as very strong producers of proteinase and catalase positive. Therefore, this work was conceived with the purpose of acquiring understanding about the pathogenicity of the fungi responsible for invasive mycoses and their primary significance for public health, since such agents are the instigators of serious fungal infections that unfortunately lead a substantial number of patients to death and generate high costs for the SingleHealthcare System.

Keywords: Biodiversity, Fungi, Neglect, Virulence.

RESUMEN

Las micosis son enfermedades desatendidas y representan un importante problema de salud pública, presentando alta morbilidad y mortalidad, aunque la mayoría de ellas no son de notificación obligatoria en Brasil. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar los factores de virulencia de aislados de hongos en un hospital de referencia del estado de Maranhão. El estudio se realizó con muestras biológicas de pacientes ingresados en Unidades Hospitalarias de São Luis-MA, entre enero de 2020 y enero de 2024. Las muestras fueron recolectadas para identificar las especies de hongos mediante MALDI-TOF. Luego se realizaron pruebas de virulencia. De los aislados probados, todas las cepas mostraron formación de halo, lo que indica una producción significativamente mayor ($p < 0,05$) de fosfolipasa. Se observó que las muestras presentaron capacidad de producir exoenzimas proteinasas, en lo que se destaca que todas las muestras presentaron una Zona de Precipitación (PZ) $< 0,70$ y fueron consideradas, según su intensidad, muy fuertes productoras de proteinasa y catalasa positivas. Por lo tanto, este trabajo fue concebido con el propósito de adquirir conocimiento sobre la patogenicidad de los hongos responsables de las micosis invasoras y su importancia primordial para la salud pública, ya que dichos agentes son los instigadores de infecciones fúngicas graves que lamentablemente llevan a la muerte a un número importante de pacientes y generar altos costos para el Sistema Único de Salud.

Palabras clave: Biodiversidad, Hongos, Abandono, Virulencia.

1 INTRODUÇÃO

Os fungos têm sido foco de estudos por cientistas e pesquisadores devido ao seu potencial perigo à saúde humana e animal. Desta forma, através de tais pesquisas, foi possível avaliar e estudar a diversidade e complexidade de múltiplas espécies de fungos buscando sempre avaliar a patogenicidade de vários grupos desses microrganismos. A maioria dos fungos é cosmopolita e podem ser encontrados em praticamente todos os



lugares da natureza entre eles: solo, seres humanos, vegetais, materiais em decomposição e em animais domésticos (Favalessa *et al.*, 2010; Cavalcante, Campos, De Lima, 2024).

A forma principal de propagação dos fungos é através do ar, desta forma, esses microrganismos possuem uma capacidade de propagação elevada com uma taxa de colonização que pode variar de acordo com determinadas superfícies e habitats (Calumby *et al.*, 2022). As micoses sistêmicas são infecções contraídas através da inalação de propágulos de fungos que podem acabar lesionando, por exemplo, o tecido pulmonar (Cavalcante, Campos, De Lima, 2024).

Atualmente, muitas internações são recorrentes em hospitais e em postos de saúde, devido à elevada incidência de casos de micoses sistêmicas e oportunistas no Brasil. Duas importantes micoses endêmicas no país são a criptococose e a candidíase (Barbosa *et al.* 2014).

As internações decorrentes de micoses representam um ônus significativo para o Sistema Único de Saúde (SUS), acarretando custos substanciais que reverberam negativamente na economia. A necessidade de tratamentos prolongados, muitas vezes envolvendo terapias complexas e medicamentos de alto custo, impõe uma pressão financeira considerável sobre os recursos públicos destinados à saúde (Silva, 2013; Shikanai-Yasuda, 2018).

Além disso, o impacto negativo se estende para além dos gastos diretos com assistência médica, abrangendo também os custos indiretos associados à perda de produtividade, tanto dos pacientes afetados quanto de seus familiares que precisam se ausentar do trabalho para prestar cuidados. Essa conjunção de fatores ressalta a importância de estratégias eficazes de prevenção e controle das micoses, visando mitigar seu impacto tanto na saúde pública quanto na estabilidade econômica do país (Russo *et al.*, 2018; Freire, 2021).

Com isso, considerando que as infecções fúngicas são doenças negligenciadas, mas de importância para a saúde pública, e que estes microrganismos possuem grande biodiversidade e estão presentes em inúmeros ambientes, ressalta-se a necessidade do estudo sobre os fatores de virulência a fim de aumentar o conhecimento científico tanto



população, influenciando a tomada de decisões em nível municipal, estadual, federal. Logo, o objetivo deste trabalho foi avaliar os fatores de virulência dos isolados de pacientes nosocomiais atendidos em um Hospital de Referência do Estado do Maranhão.

2 METODOLOGIA

2.1 COMITÊ DE ÉTICA, TIPO, LOCAL E POPULAÇÃO DE ESTUDO

Em cumprimento aos requisitos exigidos pela Resolução 466/12 e suas complementares do Conselho Nacional de Saúde para pesquisas envolvendo seres humanos, o Projeto de Pesquisa foi submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade (Número do Parecer 2.927.864), com adição do modelo de questionário e o termo de consentimento livre e esclarecido.

Foi feito um estudo transversal, com amostragem aleatória simples e abordagem quantitativa e qualitativa, no período de Janeiro de 2020 a Janeiro de 2024, em hospitais de uma região de transição Amazônia-Cerrado, localizados em São Luís-MA, na área para doenças infecto-contagiosas, como tuberculose, HIV e doenças tropicais (nestas incluídas as micoses) do Estado do Maranhão.

Como critérios de inclusão: participaram da pesquisa todos os pacientes com suspeita e/ou confirmação de infecções fúngicas invasivas que assinaram o termo de consentimento livre esclarecido. Como critérios de exclusão: foram excluídos os pacientes que não apresentarem diagnóstico confirmado para infecções fúngicas invasivas ou que se recusarem a participar da pesquisa.

Para o cálculo do tamanho amostral do número de pacientes que foram incluídos no estudo, foi utilizado o programa estatístico PASS 15 (2017) com os seguintes parâmetros: tamanho da população atendida no hospital, prevalência de infecções fúngicas invasivas, nível de significância (α) de 5%, erro tolerável (erro padrão) de 4%, mais 5% de possíveis perdas.



2.2 COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS E DOS DADOS CLÍNICOS

Cada paciente selecionado previamente foi convidado a participar da pesquisa por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). As amostras biológicas (soro, escarro, lavado brônquico, secreção traqueal, sangue total, soro, urina, liquor e biópsia) foram coletadas por profissionais experientes e encaminhadas a um Laboratório de Análises Clínicas (São Luís-MA) para identificação da espécie fúngica. Os dados clínicos foram obtidos a partir dos prontuários dos pacientes que participaram do estudo.

Os fungos foram identificados por meio da técnica automatizada MALDI-TOF e encaminhados ao Laboratório de Microbiologia Ambiental da Universidade CEUMA, onde foram mantidos em meio Agar Sabouraud e incubados a 28 e a 37°C. Em seguida, foram mantidos em meio BHI + glicerol (10%) na Coleção de culturas do Laboratório, sob congelamento em -20°C e sob refrigeração para subsequentes testes de virulência e de susceptibilidade aos antifúngicos de uso clínico.

2.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Os fatores de virulência dos isolados fúngicos foram avaliados por meio da determinação das atividades enzimáticas da proteinase, fosfolipase e catalase.

Para análise de produção de proteinases, usou-se o método de AOKI *et al.* (1990) com modificações de D'ECA *et al.* (2011). Na determinação da proteinase o teste foi feito em placas com 140 mL do meio de cultura ágar Sabouraud dextrose contendo 60 mL de solução composta por 0,04g de $MgSO_4 \cdot H_2O$; 0,5 g de K_2HPO_4 ; 1g de NaCl; 0,2g de extrato de levedura; 4g de glicose e 0,5g de BSA, pH ajustado para 4,0 e esterilizada por filtração. As placas foram inoculadas com 3µL de salina 0,85 % contendo células de leveduras, comparada a escala de McFarland 0.5 (1×10^6 células/mL), e incubadas a 37°C por 7 dias. A atividade de proteinases foi medida e calculada de acordo com o método descrito em termos da proporção de diâmetro da colônia e a colônia mais a zona de precipitação (Pz) das proteinases. Os testes foram feitos em duplicata e foi calculada a



média do valor de Pz, agrupando-os em 5 grupos: Pz=1, negativo; Pz entre 0.9 e 0.99, fraco; Pz entre 0.80 e 0.89, moderado; Pz entre 0.70 e 0.79, forte; PZ < 0.70 muito forte.

Para a determinação da atividade fosfolipídica, foi preparado um meio de cultura que consiste em 180 mL de ágar Sabouraud dextrose acrescido de 11,40g de cloreto de sódio; 0,11g de cloreto de cálcio; 4 % de glicose e 20 mL de gema de ovo. O meio foi inoculado com 3 µL de inóculo fúngico preparado em salina 0,85%, comparado com a escala de McFarland 0.5 (1 a 5 x 10⁸ células/mL). As placas de Petri foram incubadas a 37°C e o diâmetro das colônias e da área de precipitação mais a colônia foram medidos 96 horas após a inoculação. Os experimentos foram feitos em duplicata. As medidas e cálculos da zona de precipitação (Pz) da fosfolipase foram feitos de acordo com o descrito por Price et al. (1982), a partir da média dos valores obtidos na duplicata, os coeficientes encontrados foram classificados em 5 grupos: Pz=1, negativo; Pz entre 0.9 e 0.99, fraco; Pz entre 0.80 e 0.89, moderado; Pz entre 0.70 e 0.79, forte; PZ<0.70, muito forte (PRICE et al, 1982).

A atividade da catalase foi constatada em meio Sabouraud com adição de solução de peróxido de hidrogênio a 3% sobre a cultura fúngica, segundo metodologia modificada de Shin & Kim (1998).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

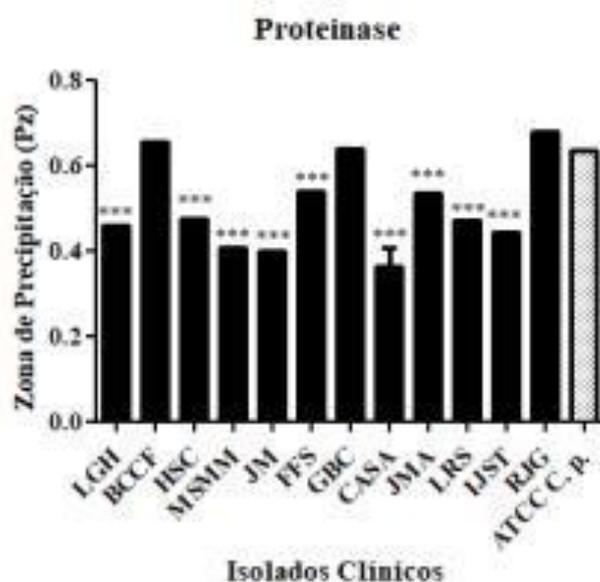
A proteinase é uma enzima que desintegra as proteínas vitais. As proteinases são divididas em quatro tipos: serina proteinase, aspartil proteinase, cisteína proteinase e metaloproteinase. *Candida* secreta aspartil proteinases secretoras (SAP), que é uma das moléculas multifuncionais envolvidas na patogênese da *Candida*, a produção dessa molécula por fungos aumenta a colonização e penetração do mesmo no tecido do hospedeiro (Gonçalves et al, 2016).

Os genes SAP que variam de SAP1-SAP10 foram identificados em *C. albicans*. A SAP é um dos principais marcadores para determinar os diferentes tipos de candidíase (Gonçalves et al 2016).



Para observar a presença da exoenzima com capacidade de degradar proteínas realizou-se o teste de proteinase como mostra a Figura 1.

Figura 1. Produção de proteinase dos isolados fúngicos



Negativo: Pz = 1; Fraco: Pz entre 0,9 e 0,99; Moderado: Pz entre 0,80 e 0,89; Forte: Pz entre 0,70 e 0,79; Muito forte: Pz < 0,70. *** p < 0,05.

Fonte: Elaboradas pelos próprios Autores.

De acordo com a Figura 1, observou-se que todos os isolados fúngicos foram positivos para a produção da exoenzima. Destaca-se que todas as amostras apresentaram a Zona de Precipitação (PZ) < 0,70 sendo consideradas de acordo com sua intensidade muito forte produtoras de proteinase.

As fosfolipases fazem parte de um grupo de hidrolises que quebram os fosfolipídeos em ácidos graxos e outras substâncias lipofílicas. A produção de fosfolipase é vista como um dos principais critérios para identificar cepas invasivas, virulentas e não virulentas de *Candida* (Motenegro, 2018).



Segundo Junior e De Andrade Monteiro (2012), as atividades de fosfolipase são consideradas como um papel importante na patogênese de fungos oportunistas. A presença de fosfolipase em amostras de *C. albicans* e outras espécies de fungos invasivos estão relacionados à virulência das espécies.

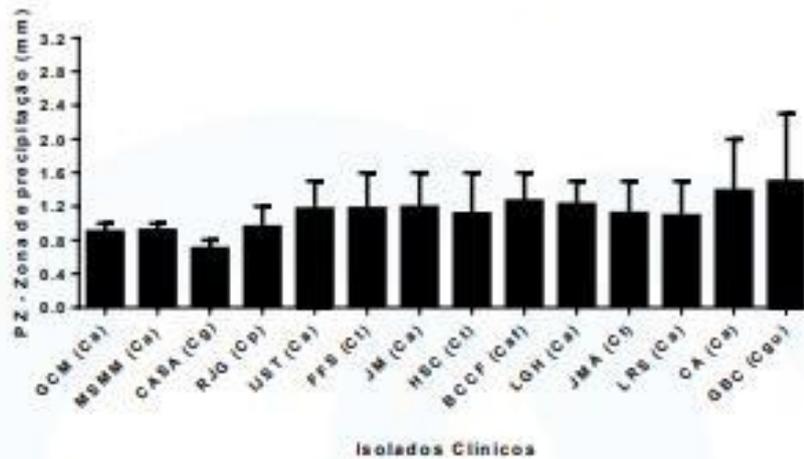
De acordo com o trabalho de Campos e Baroni (2010) a maioria das cepas apresentaram atividade muito forte para produção de fosfolipase (75%). No estudo de Costa *et al.* (2010), a maioria dos isolados apresentaram atividade enzimática para produção de fosfolipase, o que corrobora os resultados obtidos no presente estudo. Da mesma forma, no estudo de Hartmann *et al.* (2016), através da determinação da atividade fosfolipídica dos 24 isolados fúngicos foi possível observar que 37,5% das cepas dispunham de atividade positiva para exoenzimas.

A atividade enzimática dos isolados fúngicos possibilita confirmar o aumento da patogenicidade dos microrganismos, pois a presença de tais fatores de virulência auxilia os mesmos na penetração e colonização de tecidos mais profundos causando quadros mais abrasivos para o hospedeiro, tendo em vista, que as micoses invasivas são negligenciadas e acabam levando o indivíduo portador a óbito. Logo, um maior potencial de virulência manifestado associado, por exemplo, a possíveis quadros de imunossupressão, eleva o número de quadros da doença (Andreola *et al.* 2016).

A avaliação da produção de exoenzimas como a fosfolipase para isolados fúngicos é relevante para a verificação do potencial de virulência dos fungos, tendo em vista que conferem ao microrganismo mecanismos que facilitam sua penetração em tecidos mais profundos (Junior, De Andrade Monteiro, 2012), causando micoses invasivas. Os resultados são apresentados na Figura 2.



Figura 2. Produção de fosfolipase dos isolados fúngicos



Ca: *Candida albicans*; Ct: *Candida tropicalis*; Cuf: *Candida africana*; Cp: *Candida parapsilosis*; Cgu: *Candida guilliermondii*; Cg: *Cryptococcus gattii*; * P < 0,05.

Fonte: Elaboradas pelos próprios Autores.

O resultado positivo para o teste de fosfolipase é confirmado através da formação de um halo opaco ao redor da colônia. Dos isolados testados, todas as cepas apresentaram formação do halo, indicando uma maior produção significativa ($p < 0,05$) da enzima, como ressalta a Figura 3.

Figura 3. Placa de Petri com formação do Halo



Fonte: Elaboradas pelos próprios Autores.

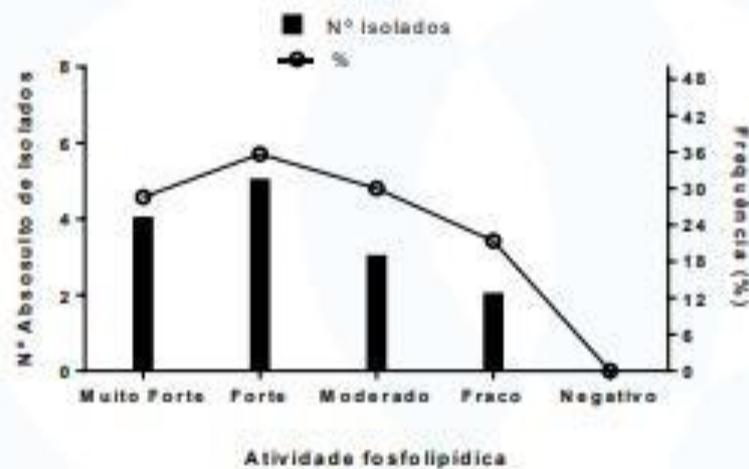
É interessante destacar que isolados como CA e GBC foram as cepas que apresentaram maior halo (PZ) e isso explica um potencial significativo para o fungo, pois



a presença da fosfolipase funciona como um mecanismo auxiliador na colonização e infecção de tecidos mais profundos. Porém, em contrapartida, houve isolados que a presença da enzima foi tida como moderada como nas amostras GCM e MSMM e outros apresentaram a exoenzima, porém com PZ inferiores, como no isolado CASA.

A classificação da intensidade da produção das enzimas fosfolipase encontra-se na figura 4.

Figura 4. Intensidade da Produção de fosfolipase (Pz) dos isolados fúngicos.

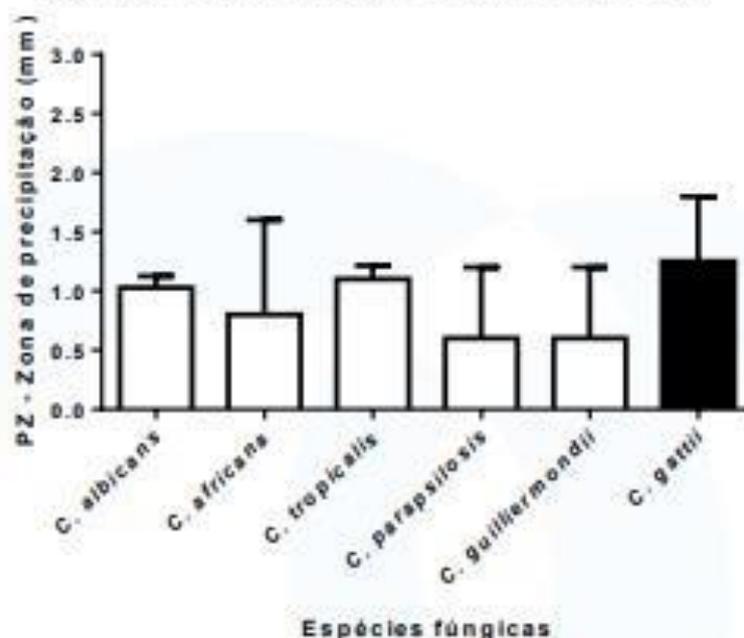


Negativo: Pz = 1; Fraco: Pz entre 0.9 e 0.99; Moderado: Pz entre 0.80 e 0.89; Forte: Pz entre 0.70 e 0.79; Muito forte: Pz < 0.70.

Fonte: Elaboradas pelos próprios autores.

Na figura 5, observa-se a comparação da média da Zona de Precipitação entre as diferentes espécies fúngicas.

Figura 5. Zona de Precipitação (PZ) das diferentes espécies fúngicas.



Barra branca: isolados de *Candida*spp; Barra preta: isolados de *Cryptococcus* spp. *P<0,05.

Fonte: Elaboradas pelos próprios Autores.

Observa-se na Figura 5, a comparação da Zona de Precipitação das diferentes espécies fúngicas, em que os isolados de *C.tropicalis* apresentaram PZ mais elevada se comparada às outras espécies desse mesmo gênero. Já em relação ao gênero *Cryptococcus*spp, observou-se que a espécie *C.gattii* foi a que apresentou a maior PZ em detrimento das demais espécies de fungos leveduriformes. Houve diferença significativa ($p=0,0131$) entre a PZ média de *C. albicans* e a PZ média de *C. gattii*.

Isolados de *C. neoformans* e de *Candida* spp. possuem vários constituintes imunes inatos, incluindo a fosfolipase e catalase com o papel de colonização de tecidos como o cérebro e pulmões (Yang et al, 2017).

Conforme Souza (2022), a maioria das cepas positivas para produção de fosfolipase foi de amostras provenientes de secreção urinária e traqueal, apesar de não ser notada proporcionalidade no arranjo distribucional das espécies de *Candida* entre os materiais



clínicos, visto que a maior atividade da fosfolipase foi definida nos isolados do trato respiratório.

A avaliação da produção de catalase pelos microrganismos foi confirmada pela conversão de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio por todos os isolados, favorecendo o potencial de virulência dos mesmos e auxiliando na penetração de tecidos mais profundos (Osorio *et al* 2021).

De acordo com Rodrigues *et al* (2008), a presença de catalase positiva permite com que o microrganismo invada tecidos mais profundos. Além disso, a catalase é uma metaloenzima antioxidante que converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular, tal exoenzima auxilia o fungo na driblagem imunológica contra o estresse oxidativo imposto pelo sistema imune do hospedeiro (Pinto, 2021).

As internações decorrentes de micoses representam uma fonte significativa de despesas para o Sistema Único de Saúde, gerando um impacto financeiro substancial que reverbera por toda a economia. Os altos custos associados ao tratamento hospitalar, incluindo medicamentos específicos, procedimentos cirúrgicos e acompanhamento médico especializado, sobrecarregam os recursos financeiros já limitados destinados à saúde pública. Além disso, essas internações acarretam uma perda adicional em termos de produtividade econômica, uma vez que tanto os pacientes quanto seus familiares muitas vezes precisam se afastar do trabalho para lidar com a situação de saúde (Russo, 2019; Freire, 2021).

4 CONCLUSÃO

Mediante esta pesquisa, ressalta-se uma preocupação diante da análise das micoses invasivas/opportunistas, tais quais a candidíase e criptococose, especialmente quando se entrelaça as infecções fúngicas à manifestação das exoenzimas que nelas se perfazem, notadamente a proteinase, fosfolipase e catalase.

Essas enzimas desempenham um papel crucial na patogenicidade desses fungos, aumentando sua capacidade de invasão e colonização de tecidos dos hospedeiros, especialmente em pacientes imunocomprometidos. Esses achados são ainda mais alarmantes



quando se considera as altas taxas de infecções hospitalares, onde os pacientes estão frequentemente expostos a ambientes propícios à disseminação desses agentes patogênicos.

A compreensão da importância dessas exoenzimas na virulência dos fungos invasivos é essencial para o desenvolvimento de estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento. Intervenções direcionadas para a descoberta de cepas positivas para tais atividades enzimáticas podem oferecer novas perspectivas no controle dessas infecções e na melhoria dos resultados clínicos para os pacientes afetados.

Além disso, a conscientização sobre os riscos associados às infecções fúngicas invasivas e a implementação de medidas preventivas adequadas são cruciais para mitigar o impacto dessas doenças na saúde pública, especialmente em ambientes hospitalares.

As internações por micoses geram altos custos para o Sistema Único de Saúde, afetando negativamente a economia. Esses gastos, somados à perda de produtividade devido ao afastamento do trabalho, evidenciam a necessidade urgente de medidas preventivas eficazes. Investimentos em saúde preventiva e acesso equitativo ao tratamento são essenciais para aliviar a pressão sobre os recursos de saúde e promover uma economia mais sustentável.

Com isso, mais estudos na área devem ser realizados a fim de prevenir e tratar tais doenças que tanto afetam a população mundial, em especial a de países subdesenvolvidos como o Brasil, onde o saneamento básico e a saúde pública enfrentam importantes desafios.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório CEDRO pelo fornecimento das amostras fúngicas. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão (FAPEMA), pela Universidade CEUMA e com apoio da Universidade Federal do Maranhão, pelo Programa Bionorte (Programa de Pós-Graduação da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal). J.R.A.S. é bolsista de produtividade em Pesquisa do CNPq – Nível 2 (Processo número: 317049/2023-2).

REFERÊNCIAS

- ANDREOLA, Patricia et al. Estudo comparativo entre a produção de fosfolipases extracelulares e proteinases do gênero *Candida* isoladas a partir de infecções de cavidade oral. **Rev. odontol. UNESP (Online)**, v. 45, n. 4, p. 219-226, 2016.
- AOKI, S.; ITO-KUWA, S.; NAKAMURA, Y.; MASUHARA, T. Comparative pathogenicity of wild-type strains and respiratory mutants of *Candida albicans* in mice. **Zentralblatt-Bakteriol** 273: 332-343, 1990.
- BARBOSA, Monica Santiago et al. Análise das principais micoses encontradas na rotina de um laboratório de análises clínicas na cidade de Jataí, Estado de Goiás, Brasil. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 9, n. 1, p. 108-114, 2014.
- CALUMBY, Rodrigo José Nunes et al. Microbiota fúngica dos filtros do condicionador de ar e de superfícies em uma Unidade de Terapia Intensiva. **Revista Principia**, v. 59, n. 1, p. 10-19, 2022.
- CAMPOS, Felipe Lopes; BARONI, Francisco De Assis. Isolados de *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii* e *C. laurentii* produtores de protease e fosfolipase. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 39, n. 2, p. 83-90, 2010.
- CAVALCANTE, Felipe Sant'Anna; CAMPOS, Milton César Costa; DE LIMA, Janaina Paolucci Sales. A IMPORTÂNCIA DOS MACROFUNGOS PARA O MEIO AMBIENTE. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental**, v. 13, n. 1, 2024.
- COSTA, C. R.; PASSOS, X. S.; SOUZA, L. K. H.; LUCENA, P. A.; FERNANDES, O. F. L.; SILVA, M. R. R. Differences in exoenzyme production and adherence ability of *Candida* spp. Isolates from catheter, blood and oral cavity. **Rev. Inst. Med. trop.**, São Paulo, v. 52, n. 3, p. 139-143, June 2010.
- DECA JUNIOR, A.; SILVA, A. F.; ROSA, F. C.; MONTEIRO, S. G. IGUEIREDO, P. M. S.; MONTEIRO, C. A. In vitro differential activity of phospholipases and acid proteinases of clinical isolates of *Candida*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 44, n. 3, p. 334-338, June 2011.
- FAVALESSA, Olívia Cometti; DOS ANJOS MARTINS, Marilena; HAHN, Rosane Christine. Aspectos micológicos e suscetibilidade in vitro de leveduras do gênero *Candida* em pacientes HIV-positivos provenientes do Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, p. 673-677, 2010.
- FREIRE, Claudévan Pereira. **Análise clínica e de custos do tratamento de pacientes coinfectados com meningite criptocócica e HIV em um Hospital do Nordeste do Brasil**. 2021.
- GONÇALVES, Bruna et al. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. **Critical reviews in microbiology**, v. 42, n. 6, p. 905-927, 2016.



HARTMANN, Andreia et al. Incidência de *Candida* spp. na mucosa oral de pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) no município de Santo Angelo-RS. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 6, n. 3, p. 125-130, 2016.

JUNIOR, Aurean Deca; DE ANDRADE MONTEIRO, Cristina. Atividade diferencial in vitro de fosfolipases e proteinases ácidas de isolados clínicos de *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, 2012.

MONTENEGRO, Caroline de Souza. Papel da fosfolipase A2 secretória do grupo V na indução de eosinofilia sistêmica pela infecção por *Schistosoma mansoni* em camundongos. **Repositório Institucional Pantheon**, 2018.

OSORIO, Rodrigo de Paulo et al. **Análise da relação entre o potencial antioxidante dos ácidos ferúlico e p-cumárico e a enzima catalase de *Saccharomyces cerevisiae***. 2021.

PINTO, Gabriel Vitor da Silva. Análise e identificação dos microrganismos presentes em fones de ouvido. **Revista InterSaúde**, v. 1, n. 5, p. 37-51, 2022.

PRICE, M.F.; WILKINSON, L.D.; GENTRY, L.O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia** 20: 7-14.1982.

RODRIGUES, Marcio L. et al. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 1, p. 58-67, 2008.

RUSSO, Leticia Xander et al. Análise da eficiência dos tratamentos hospitalares de HIV/AIDS e seus determinantes nas unidades federativas do Brasil. **Revista Econômica do Nordeste**, v. 50, n. 4, p. 79-95, 2019.

SHIKANAI-YASUDA, Maria Aparecida et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, 2018.

SHIN K-SOO, Kim C-Jin (1998) Decolorisation of artificial dyes by peroxidase from the white-rot fungus, *Pleurotus ostreatus*. **Biotechnology Letters** 20:569-572.

SILVA, Clécia Patrocínio da. **Quem é o doente? Um estudo sobre as vivências dos acompanhantes de pacientes adultos em hospital público no Rio Grande do Norte**. 2013. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

SOUZA, Misma Kilvia Frazão de. ***Candida krusei*: aspectos atuais sobre epidemiologia, fatores de virulência e resistência antifúngica**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Comprovantes Aceitação dos Artigo na Revista Eletrônica Acervo em Saúde, Qualis B1 2017-2020.



CARTA DE ACEITE DE MANUSCRITO

REAS, Revista Eletrônica Acervo Saúde (ISSN 2178-2091)

Informamos que o artigo abaixo foi considerado para publicação na revista.

Título do artigo:

Avaliação da suscetibilidade a antifúngicos e formação de biofilme de amostras clínicas em hospital de referência no Estado do Maranhão

Autor/Coautores:

Pedro Henrique Cunha Fontenelle

Haryne Lizandrey Azevedo Furtado

Heylane Ferreira Cutrim Almeida

Sirlei Garcia Marques

Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo

Beatriz Gomes dos Santos

Rodrigo Assunção Holanda

Julliana Ribeiro Alves dos Santos

terça-feira, agosto 13, 2024

Dr. Andreazzi Duarte
Editor-líder da Revista

NOTA:

* O aceite do artigo está sujeito a confirmação do pagamento e documentação conforme as normas da revista.

** O aceite não extingue a possibilidade de correções ou adequações no conteúdo do trabalho.