UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ARISTIDES ÁVILO DO NASCIMENTO

**FREQUÊNCIA E SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE *Candida* spp. ISOLADAS
DE ÚLCERAS DE PÉ DIABÉTICO**

SOBRAL

2017

ARISTIDES ÁVILO DO NASCIMENTO

FREQUÊNCIA E SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE *Candida* spp. ISOLADAS DE
ÚLCERAS DE PÉ DIABÉTICO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, *campus* Sobral, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de Concentração: Biologia Molecular e Microrganismos.

Orientadora: Profa. Dra. Camila Gomes
Virginio Coelho

SOBRAL

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- N193f Nascimento, Aristides Ávila do.
Frequência e Sensibilidade Antifúngica de *Candida* spp. isoladas de úlceras de Pé Diabético /
Aristides Ávila do Nascimento. – 2017.
110 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde, Sobral, 2017.
Orientação: Profa. Dra. Camila Gomes Virginio Coelho.
1. Pé Diabético. 2. Leveduras. 3. *Candida*. 4. Teste de Sensibilidade. 5. *Candida albicans*. I. Título.
CDD 610
-

ARISTIDES ÁVILO DO NASCIMENTO

FREQUÊNCIA E SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE *CANDIDA* SPP. ISOLADAS
DE ÚLCERAS DE PÉ DIABÉTICO

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde, *campus* Sobral, da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial para
obtenção do Título de Mestre em Ciências da
Saúde. Área de Concentração: Biologia
Molecular e Microrganismos

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Camila Gomes Virginio Coelho (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Ana Karoline da Costa Ribeiro (Examinadora Externa)
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Prof. Dr. Paulo Roberto Santos (Examinador Interno)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Agradecer à Deus, nosso Senhor, por todas as conquistas realizadas até o momento, bem como as futuras, que virão.

Agradecer a minha família, pelo apoio e incentivo.

Agradecer e parabenizar toda à Equipe de Enfermagem do Centro Cirúrgico do HRN, pela sua dedicação à estes pacientes e sua trabalhosa rotina neste hospital.

Agradecer à minha querida orientadora, Profa. Camila Coelho, pela paciência, dedicação e por transmitir um pouco de seus conhecimentos em micologia para o autor.

Agradecer à Profa. Raquel Fontenelle e seus alunos de iniciação científica, Samuel Souza Oliveira e Patrícia Silva Costa, pela ajuda a este trabalho.

Agradecer ao Prof. Silvando Scaoli, pela sua inestimável contribuição na parte estatística desse trabalho.

Agradecer à minha noiva e amada, Leydiane Farias, pelo incentivo e paciência que vezes que tive que dividi-la com o mestrado.

Agradecer aos acadêmicos e futuros cientistas, Wevely Ferreira, Marcela Paiva, Rosi Aquino e Ludimila Gomes, pela inestimável ajuda e contribuição a este trabalho.

Agradecer a um grande amigo, Rúlio Rocha, por ter dado o pontapé inicial à esta pesquisa.

Agradecer aos meus amigos de mestrado, Shirley Alves, Jisbaque Melo e Izabelly Linhares, pela ajuda incontestável e compartilhar momentos difíceis.

EPÍGRAFE

Esta pesquisa foi fruto da minha vivência e de minhas reflexões quanto ao Diabetes *Mellitus* e às suas complicações relacionadas aos membros inferiores.

“Amputação é sinônimo de restauração, de vitória para uma nova vida, de conscientização que você não é um pedaço de braço ou de perna, mas um ser tão completo que, mesmo sem uma pequena parte do seu corpo, pode: pensar, falar, comer, enxergar, cheirar, ouvir, sorrir, ler, estudar, andar, trabalhar, namorar, casar, ter filhos, brincar, praticar esportes, viajar, e tantas outras coisas que talvez agora neste momento você nem possa acreditar, exceto se você acreditar em você mesmo e em Deus!”

(Andréa Madeira Albuquerque, Erilene Alves de Sousa, Alberlane Matos - Serviço Social HRN)

RESUMO

Pacientes com diabetes representam um grupo único de indivíduos que parecem ser mais propensos a desenvolver infecções do que outros. Os problemas com os pés representam uma das mais importantes complicações crônicas do diabetes *mellitus*. O risco de amputação de membros inferiores pode ser aumentado se a ulceração é seguida por infecções bacterianas, fúngicas e, em casos mais graves, sinergismo entre infecções bacterianas e fúngicas. Entretanto, há escassez de relatos na literatura da incidência de patógenos fúngicos nessas amostras. Este estudo tem por objetivo descrever, através de um estudo prospectivo, a cultura, isolamento, identificação e teste de sensibilidade de *Candida* spp. presentes em úlceras dos pés de pacientes diabéticos. A coleta das amostras foi realizada no Hospital Regional Norte, entre setembro de 2015 a setembro de 2016. Foram coletadas 154 amostras de 77 pacientes, onde 50,65 % eram do gênero feminino e 49,35 % eram do gênero masculino. Do total de pacientes, 59,74 % foram diagnosticados com diabetes *mellitus* tipo 2, onde a hipertensão foi a comorbidade de maior prevalência. Pacientes entre 71-80 anos foram mais susceptíveis às complicações do diabetes e a maioria dos pacientes (70,13 %) estava com valores de glicemia de jejum acima do valor de referência. A doença vascular periférica estava presente em todos os pacientes, onde 97,40 % apresentavam lesões necrosadas e infectadas nos pés, aumentando os casos de desbridamentos e revascularizações. Do total de pacientes, 70,13 % tinham amputação local ou generalizada, sendo classificados em grau 4 ou 5, pela Classificação de Wagner, onde, consequentemente, todos estes estavam em uso de antibacterianos, porém nenhum estava em uso de antifúngico. No total, 59,74 % e 54,54 % dos pacientes nunca receberam orientação para os cuidados ou fizeram autoexame diário dos pés, respectivamente; e 97,40 % tiveram suas feridas reinfetadas, sendo necessário realizar novos procedimentos vasculares. As espécies fúngicas que cresceram em cultivo foram identificadas através da metodologia micológica convencional. A maioria das amostras identificadas foram *C. tropicalis* (44,33 %) e todas as amostras de *C. albicans* identificadas e isoladas no estudo foram realizadas testes de sensibilidade antifúngica. Espécies de *Candida* não *albicans* estão sendo mais incidentes que a espécie de *C. albicans*. Todas as amostras de *C. albicans* deste estudo foram consideradas sensíveis ao teste de sensibilidade, segundo a metodologia e referências do CLSI-M27A2. Foi preocupante a quantidade de óbitos dos pacientes relacionados ao pé diabético neste estudo (14,29 %). Medidas preventivas e primárias devem ser tomadas para diminuir a elevada taxa de mortalidade em pacientes diabéticos com úlceras nos pés. O autocuidado é fator importante na prevenção de complicações em pés diabéticos e, para bom controle da doença, é preciso autogerenciamento efetivo. Nós acreditamos que nossos resultados têm implicações importantes para a prevenção e reconhecimento sobre as infecções fúngicas no pé diabético e recomendamos que pacientes diabéticos com problemas nos pés devam ser examinados rotineiramente para avaliação micológica, pois os fungos possuem papel potencial na patogênese da ulceração.

Palavras-chave: Pé Diabético, Leveduras, *Candida*, Teste de Sensibilidade, *Candida albicans*.

ABSTRACT

Patients with diabetes represent a unique group of individuals who appear to be more likely to develop infections than others. Foot problems represent one of the most important chronic complications of diabetes *mellitus*. The risk of lower limb amputation can be increased if ulceration is followed by bacterial, fungal, and, in more severe cases, synergism between bacterial and fungal infections. However, there is a lack of reports in the literature of the incidence of fungal pathogens in these samples. This study aims to describe, through a prospective study, the culture, isolation, identification and sensitivity test of *Candida* spp. present in diabetic patient's foot ulcers. Samples were collected at the North Regional Hospital from September 2015 to September 2016. A total of 154 samples were collected from 77 patients, where 50.65 % were female and 49.35 % were male. Of the total number of patients, 59.74 % were diagnosed with type 2 diabetes *mellitus*, where hypertension was the most prevalent comorbidity. Patients aged 71-80 years were more susceptible to complications of diabetes and the majority of patients (70.13 %) had fasting glycemia values above the reference value. Peripheral vascular disease was present in all patients, where 97.40 % had necrotic and infected lesions in the feet, increasing cases of debridement and revascularization. Of the total number of patients, 70.13 % had local or generalized amputation, being classified in grade 4 or 5, by Wagner's Classification, where, consequently, all of them were in antibacterial use, but none were using antifungal. In total, 59.74 % and 54.54 % of the patients never received care orientation or did daily self-examination of the feet, respectively; and 97.40 % had their wounds reinfected, being necessary to perform new vascular procedures. The fungal species that grew in culture were identified through the conventional mycological methodology. Most of the samples identified were *C. tropicalis* (44.33 %) and all samples of *C. albicans* identified and isolated in the study were tested for antifungal sensitivity. Species of *Candida* non-*albicans* are being more incident than the species of *C. albicans*. All *C. albicans* samples from this study were considered sensitive to the sensitivity test, according to the methodology and references of CLSI-M27A2. The number of deaths of patients related to diabetic foot in this study was worrisome (14.29 %). Preventive and primary measures should be taken to decrease the high mortality rate in diabetic patients with foot ulcers. Self-care is an important factor in the prevention of complications in diabetic feet and, for good disease control, effective self-management is necessary. We believe that our results have important implications for the prevention and recognition of fungal infections in diabetic foot and we recommend that diabetic patients with foot problems should be routinely examined for mycological evaluation because fungi play a potential role in the pathogenesis of ulceration.

Keywords: Diabetic Foot, Yeasts, *Candida*, Sensitivity Test, *Candida albicans*.

LISTA DE QUADROS

Quadro 01 -	Escala de Wagner, utilizada para classificar as úlceras em pés de pacientes diabéticos, de acordo com a gravidade da lesão	23
Quadro 02 -	Classificação da Universidade do Texas, utilizada para classificar as úlceras em pés de pacientes diabéticos, de acordo com profundidade da lesão, presença de infecção e sinais de isquemia	24
Quadro 03 -	Diretrizes de interpretação dos testes de sensibilidade <i>in vitro</i> das espécies de <i>Candida</i>	42
Quadro 04 -	Informações pessoais e do histórico clínico dos pacientes portadores de úlceras no pé diabético	48
Quadro 05 -	Informações sobre os parâmetros clínicos, bioquímicos e vasculares dos pacientes portadores de diabetes	50
Quadro 06 -	Informações sobre o pé do paciente portador de diabetes	51
Quadro 07 -	Informações sobre os hábitos e autocuidados do paciente portador de diabetes	52
Quadro 08 -	Informações quantitativas e percentuais dos resultados do microcultivo e cromoágar das espécies de <i>Candida</i> isoladas e identificadas neste estudo	56
Quadro 09 -	Informações quantitativas e percentuais da identificação das bactérias em úlceras do pé diabético	57
Quadro 10 -	Concentração inibitória mínima (CIM) de Anfotericina B, Cetoconazol, Fluconazol, e Itraconazol, de <i>Candida albicans</i> isoladas de pacientes diabéticos	58
Quadro 11 -	Informações sobre os exames de cultura, recidivas, revascularizações, altas e óbitos dos pacientes portadores de diabetes	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 -	Realização do teste de sensibilidade a antifúngicos por microdiluição em placas de 96 poços	44
Figura 02 -	Cultura de <i>Candida</i> spp. obtida a partir da amostra de tecidos profundos de pacientes diabéticos com úlceras nos pés inoculada no meio ágar Sabouraud com cloranfenicol	53
Figura 03 –	Ilustração das leveduras apresentando características morfo-tinturiais de Gram positivas	54
Figura 04 –	Visualização do microcultivo no meio ágar fubá adicionado de tween 80, na concentração de 1 %	55
Figura 05 –	Inoculação das amostras do estudo no meio ágar Hicrome <i>Candida</i> diferencial®. A figura ilustra uma amostra de <i>C. albicans</i> , com sua coloração característica esverdeada no meio cromogênico	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HRN	Hospital Regional Norte
UFC	Universidade Federal do Ceará
FAMED	Faculdade de Medicina da UFC
PPGCS	Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
LAMP	Laboratório de Microbiologia e Parasitologia da UFC
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
EASD	<i>European Association for the Study of Diabetes</i>
IFD	<i>International Diabetes Federation</i>
DCCT	<i>Diabetes Control and Complications Trial</i>
NGSP	<i>National Glycohemoglobin Standardization Program</i>
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
KOH	Hidróxido de Potássio
Na ₂ HCO ₃	Bicarbonato de Sódio
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
MOPS	Ácido 2-[N-morfolino]-propanossulfônico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
HbA _{1c}	Hemoglobina Glicada ou Glico-hemoglobina
ND	Neuropatia Diabética
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
DVP	Doença Vascular Periférica
CNS	Conselho Nacional de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Diabetes <i>Mellitus</i>	16
2.2	Relação entre Neuropatia Periférica e Infecções Microbianas	20
2.3	Pé Diabético	21
2.4	Classificação de Úlceras no Pé Diabético	22
2.5	Infecções Bacterianas no Pé Diabético	24
2.6	Infecções Fúngicas no Pé Diabético	26
2.7	Diagnóstico das Infecções Fúngicas	28
2.8	Tratamento das Infecções Fúngicas	31
2.9	Resistência aos Antifúngicos	34
3.	OBJETIVOS	37
3.1	Objetivo Geral	37
3.2	Objetivos Específicos	37
4.	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	Local do Estudo	38
4.2	Desenho do Estudo	38
4.3	Período de realização do Estudo	38
4.4	População Estudada	39
4.5	Classificação das úlceras do pé diabético	39
4.6	Coleta e Transporte das Amostras	39
4.7	Cultura Fúngica	40
4.8	Isolamento e Identificação das Culturas	40
4.9	Identificação das bactérias presentes em úlceras do pé diabético	42
4.10	Teste de sensibilidade de <i>Candida albicans</i> aos antifúngicos	42
4.11	Desfecho clínico dos pacientes	44
4.12	Análise Estatística dos Dados	44
4.13	Estoque de Cepas Fúngicas	45
4.14	Normas de Biossegurança	45
4.15	Aspectos Éticos	45
5.	RESULTADOS	47

5.1	Coleta de informações clínicas sobre o paciente diabético portador de úlceras nos pés	47
5.2	Cultura fúngica de amostras biológicas de pacientes portadores de pé diabético	52
5.3	Isolamento e identificação das espécies de <i>Candida</i> presentes em úlceras do pé diabético	55
5.4	Identificação das bactérias presentes em úlceras do pé diabético	56
5.5	Teste de sensibilidade de <i>Candida albicans</i> aos antifúngicos	57
5.6	Desfecho clínico dos pacientes diabéticos portadores de úlceras nos pés	59
6.	DISCUSSÃO	61
7.	CONCLUSÃO	90
	REFERÊNCIAS	91
	APÊNDICE A - QUESTIONÁRIO ESTRUTURADO APLICADO AOS PACIENTES PORTADORES DE ÚLCERAS DE PÉ DIABÉTICO	106
	ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	108
	ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO	108
	ANEXO C - PARECER TÉCNICO DO COMITÊ DE ÉTICA	109

1. INTRODUÇÃO

Pacientes com diabetes representam um grupo único de indivíduos que parecem ser mais propensos a desenvolver infecções do que outros. O mecanismo pelo qual os microrganismos podem causar um atraso no processo de cicatrização não está completamente entendido. Uma das causas mais aceitas para este atraso é a produção de fatores de virulência por estes microrganismos, tais como proteínas aderentes, enzimas e toxinas. Além disso, alguns microrganismos, associados à doença vascular periférica, tornam-se mais virulentos em ambientes de alta glicose, ocasionando o chamado pé diabético (CARVALHO *et al.*, 2004; NAIR *et al.*, 2006-2007; FATA *et al.*, 2010; HEFNI *et al.*, 2012).

O pé diabético é o resultado de uma diabetes descontrolada e falta de cuidados sanitários, que leva a lesões necróticas, osteomielite e, conseqüentemente, a amputação do membro afetado, causado pela neuropatia periférica, também conhecida como neuropatia diabética, quando acomete pacientes diabéticos, uma síndrome que acomete os nervos periféricos ocasionada pela glicemia aumentada de longa duração, levando à perda da sensação protetora. Esta perda, associado a um ambiente de alta glicose, pode resultar em um aumento de infecções. O estado de hiperglicemia provoca um atraso no processo de quimiotaxia, fagocitose e apoptose das células polimorfonucleares, dificultando o aporte dessas células de defesa aos membros inferiores, agravando a doença vascular periférica (CARVALHO *et al.*, 2004; MLINARIC-MISSONI *et al.*, 2005; CHELLAN *et al.*, 2010).

A patogênese do pé diabético é altamente complexa, incluindo polineuropatia, comprometimento da imunidade, cicatrização mais lenta de feridas, doença vascular periférica, trauma e infecção, sendo os três últimos citados o início do processo de ulceração. As ulcerações nos pés representam uma das mais importantes complicações crônicas do diabetes *mellitus* (CARVALHO *et al.*, 2004; FATA *et al.*, 2010; SIDRIM; ROCHA, 2012, p. 266; CHADWICK, 2013; SINGH *et al.*, 2013).

As infecções são provavelmente iniciadas por modificações de defesas do paciente, que alteram o equilíbrio do binômio parasito/hospedeiro. As complicações associadas com o desenvolvimento da infecção e a síndrome do pé diabético são as principais causas de morbidade, hospitalização, amputações não traumáticas e mortalidade do paciente diabético. A ulceração, como consequência das infecções, é a causa mais

comum de amputações não traumáticas de membros inferiores em países industrializados, devido as más condições alimentares e sedentarismo, sendo resultados de múltiplos mecanismos fisiopatológicos, e a neuropatia é, de longe, o motivo mais comum de formação de ulcerações no pé, levando a infecção. O risco de amputação de membros inferiores pode ser aumentado se a ulceração é seguida por infecções bacterianas, fúngicas e, em casos mais graves, sinergismo entre infecções bacterianas e fúngicas. O sinergismo entre algumas espécies fúngicas, como espécies de *Candida* spp., com outros microrganismos, principalmente as enterobactérias, parecem aumentar o potencial patogênico e a habilidade de causar infecções em úlceras do pé diabético (CARVALHO *et al.*, 2004; MLINARIC-MISSONI *et al.*, 2005; CHELLAN *et al.*, 2010; SIDRIM; ROCHA, 2012, p. 266).

A bacteriologia das úlceras do pé diabético tem sido estudada por diversos pesquisadores, podendo ser de natureza monomicrobianas ou polimicrobianas, esta última ocorrendo na maioria dos pacientes e de natureza mais grave, tendo origem aeróbica e anaeróbica, as quais têm sido bem caracterizadas. As bactérias *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas* spp. são os isolados mais comuns isolados aeróbicos. Os anaeróbios *Bacteroides* spp. e *Peptostreptococcus* spp. são os isolados mais comuns em caso de necrose (CARVALHO *et al.*, 2004; MLINARIC-MISSONI *et al.*, 2005; NAIR *et al.*, 2006-2007; FATA *et al.*, 2010; CHELLAN *et al.*, 2010).

As infecções por fungos, associadas às infecções bacterianas, podem aumentar o risco de desenvolver a síndrome do pé diabético, principalmente através da produção de fatores de virulência, entretanto, há escassez de relatos na literatura sobre a incidência de patógenos fúngicos em amostras de pé diabético. Poucos dados estão disponíveis em relação à incidência das infecções fúngicas nos pés de pacientes com diabetes, observando-se predomínio das leveduras. Entre os isolados leveduriformes, a predominância foi das espécies de *Candida* spp., seguido da espécie *Tricosporon* spp. Com relação às espécies de *Candida*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondi* e *C. krusei* são as mais comumente encontradas em amostras de tecido profundo em pacientes diabéticos portadores de úlceras nos pés (MLINARIC-MISSONI *et al.*, 2005; NAIR *et al.*, 2006-2007; FATA *et al.*, 2010; CHELLAN *et al.*, 2010).

O gênero *Candida* spp. produz diversos fatores de virulência, dentre os quais se destacam as proteinases e lipases, que contribuem para a invasão do hospedeiro, contudo,

normalmente, o desenvolvimento das infecções é favorecido por uma combinação de fatores ligados ao hospedeiro e aos microrganismos, e não somente por um fator de virulência isolado (NAIR *et al.*, 2006-2007; FATA *et al.*, 2010; HEFNI *et al.*, 2012; SIDRIM; ROCHA, 2012, p. 266; SIMÕES *et al.*, 2013; DHANASEKARAN *et al.*, 2014).

Em virtude de poucos relatos na literatura sobre a incidência de fungos nos membros inferiores, bem como da maioria dos relatos no pé diabético ser da incidência de bactérias, além de direcionar para uma terapia antibacteriana e/ou antifúngica racional, através da realização dos testes de sensibilidade, o presente estudo demonstra grande importância para a comunidade científica, visando à redução da resistência bacteriana e fúngica, que já é uma preocupação mundial de saúde. Por tais motivos, é de suma importância notificar a incidência de fungos, como a *Candida*, no pé diabético, a fim de prevenir as complicações associadas com o desenvolvimento da infecção e a síndrome do pé diabético, que são as principais causas de morbidade, hospitalização, amputações não traumáticas e mortalidade do paciente diabético.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Diabetes *Mellitus*

O diabetes *mellitus* (DM) é uma doença crônica, que se configura como um dos mais importantes problemas mundiais de saúde na atualidade, tanto em termos de pessoas afetadas, incapacitações, mortalidade prematura, como dos custos envolvidos no seu controle e no tratamento de suas complicações (CARVALHO *et al.*, 2004). O diabetes representa um grupo de doenças metabólicas, com etiologias diversas, caracterizado por hiperglicemia, que resulta de uma destruição primária autoimune das células beta (β) pancreáticas, secreção deficiente de insulina pelas células beta, resistência periférica à ação da insulina ou ambas. As duas principais etiologias são o diabetes *mellitus* tipo 1 e o diabetes *mellitus* tipo 2 (VILAR, 2013).

O diabetes tipo 1, que corresponde a 5 a 10 % dos casos, caracteriza-se pela incapacidade ou pouca capacidade do pâncreas em secretar insulina, fazendo que o indivíduo necessite de insulina exógena para evitar descontrole metabólico (VILAR, 2013).

Em relação ao diabetes tipo 2, a maioria dos estudiosos considera a resistência insulínica como evento primário que leva à disfunção da célula beta por exaustão, outros afirmam que o evento inicial seja a hiperinsulinemia decorrente de uma disfunção primária da célula beta, causando secundariamente resistência insulínica compensatória para evitar hipoglicemia. Uma terceira possibilidade é que tanto a resistência insulínica quanto a disfunção da célula beta são secundárias a uma anormalidade comum, como níveis elevados de ácidos graxos livres (VIDAL, 2009; VILAR, 2013).

A maioria dos pacientes portadores de DM tipo 2 pode ser tratada somente com controle da dieta e hipoglicemiantes orais. Em condições de imenso *stress* físico ou no decorrer dos anos, poderá vir a utilizar a insulina para melhor controle metabólico. Aproximadamente 70 a 90 % dos pacientes acometidos por diabetes tipo 2 tem a chamada síndrome metabólica, caracterizada por um aglomerado de fatores que implicam no risco cardiovascular elevado (dislipidemia, obesidade abdominal, resistência insulínica, tolerância alterada à glicose ou diabetes, tabagismo e hipertensão) (VIDAL, 2009; VILAR, 2013).

O diabetes tipo 2 é responsável por 85 a 90 % dos casos, geralmente aparecendo após os 40 anos de idade e está associado à obesidade, sendo pacientes assintomáticos ou oligossintomáticos, diagnosticados em exames de rotina. A razão para isto é que a obesidade

diminui o número de receptores da insulina nas células-alvo para este hormônio por todo o corpo, fazendo assim, que a quantidade disponível de insulina seja menos eficaz na promoção de seus efeitos metabólicos usuais. Diferentemente do DM autoimune, não há indicadores específicos para o DM tipo 2 (VIDAL, 2009; VILAR, 2013).

O diabetes constitui-se em um dos mais sérios problemas de saúde na atualidade, tanto em número de pessoas afetadas, incapacitações, mortalidade prematura, como dos custos envolvidos no seu controle de tratamento e de suas complicações. Além disso, a prevalência mundial da doença tem crescido em proporções epidêmicas (VILAR, 2013). Em 1995, existiam 135 milhões de diabéticos no mundo, mas, conforme as projeções de King *et al.* (1998), este número poderá chegar a 300 milhões em 2025, afetando principalmente os países em desenvolvimento (CARVALHO *et al.*, 2004; FATA *et al.*, 2010). Segundo estimativas da Federação Internacional de Diabetes, existem atualmente cerca de 285 milhões de diabéticos no planeta (6,4 % da população adulta mundial) e esse número se elevará para, aproximadamente, 440 milhões até 2030. Esse aumento na prevalência do DM deve-se à maior longevidade das pessoas, associada a um crescente consumo de gorduras saturadas, sedentarismo e obesidade (VILAR, 2013).

Um estudo multicêntrico brasileiro, realizado nas capitais no final da década de 1980, mostrou uma prevalência de diabetes 7,6 % da população urbana brasileira entre 30 e 69 anos de idade. Essa taxa aumentou com a idade e alcançou 17,4 % no grupo etário de 60 a 69 anos. Aproximadamente a metade dos pacientes desconhecem o diagnóstico e 24 % dos pacientes conhecidamente portadores de diabetes não fazem qualquer tipo de tratamento, farmacológico ou não farmacológico. Em Ribeirão Preto (interior de São Paulo), a prevalência do DM em 1999 foi de 12,1 % na população urbana entre 30 e 69 anos de idade. Mais recentemente, em um estudo realizado no interior de Pernambuco, detectou-se a prevalência de 13,6 % para diabetes e 7,6 % para intolerância à glicose (VILAR, 2013). No estado do Ceará, a prevalência encontrada foi de 6,4 %, com índice de desconhecimento da doença de 64 % (CARVALHO *et al.*, 2004; VILAR, 2013).

Em outros países, um estudo com mais de 10.000 pacientes diabéticos realizados no Noroeste da Inglaterra, em 2002, reportou que 5 % tinham história de ulceração do pé, prévia ou atual, e quase 67 % tinha um ou mais fatores de risco, nomeadamente neuropatia diabética, com taxas de incidência anual que variam de 5 % a 7 %, doença arterial periférica (DAP), deformidades do pé, história prévia de ulceração do pé, idade avançada e outras complicações microvasculares. Dois estudos do Nordeste da Europa reportaram que a

incidência anual de úlcera de pé na população geral é ligeiramente acima de 2 % e que tem sido crescente nos doentes com fatores de risco predisponentes, como os citados anteriormente (DUARTE; GONÇALVES, 2011).

O diagnóstico do diabetes baseia-se fundamentalmente nas alterações da glicose plasmática de jejum ou após uma sobrecarga de glicose por via oral. Os critérios diagnósticos baseiam-se na glicose plasmática de jejum, nos pontos de jejum e de 2 horas após sobrecarga oral de 75 g de glicose anidra (chamado de teste oral de tolerância à glicose – TOTG) e na medida da glicose plasmática casual. O diagnóstico correto e precoce do diabetes *mellitus* e das alterações da tolerância à glicose é extremamente importante porque permite que sejam adotadas medidas terapêuticas que possam evitar o aparecimento de diabetes nos indivíduos com tolerância diminuída e retardar o aparecimento das complicações crônicas nos pacientes diagnosticados com diabetes (GROSS *et al.*, 2002).

O diagnóstico da doença, em geral, é feito tardiamente, com um atraso estimado de 4 a 7 anos. Com isso, as complicações micro e macrovasculares não raramente estão presentes quando há a detecção inicial da hiperglicemia. Em consequência das complicações crônicas, os diabéticos apresentam, em comparação à população não afetada pela doença, elevada morbidade (perda da visão, insuficiência renal em estágio terminal, amputação não-traumática de membros inferiores, infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, dentre outros), redução na expectativa de vida e mortalidade de duas a três vezes maior quando comparado. Essa evolução indesejada do diabetes poderia ser amenizada ou parcialmente evitada pelo diagnóstico e tratamento precoce da doença e de suas complicações (VILAR, 2013).

Outra forma de diagnóstico do diabetes é a determinação da hemoglobina glicosilada, também denominada glico-hemoglobina. A glico-hemoglobina (HbA_{1C}) é o produto da reação não-enzimática entre glicose e o grupo amino terminal de um resíduo de valina na cadeia β da hemoglobina. O termo inclui todas as hemoglobinas modificadas com a glicose, incluindo HbA_{1C} e suas frações, bem como as outras hemoglobinas anormais (HbS, HbF, HbC) que, eventualmente, possam estar presentes (NETTO *et al.*, 2009).

A percentagem de glico-hemoglobina depende da concentração de glicose no sangue, do tempo de duração da exposição da hemoglobina à glicose e ao tempo de meia vida dos eritrócitos (~120 dias). Quanto maior a concentração de glicose e maior o período de contato, maior a percentagem da glico-hemoglobina (GROSS *et al.*, 2002). A medida da glico-hemoglobina não apresenta acurácia diagnóstica adequada e não deve ser utilizada

para o diagnóstico de diabetes. A hemoglobina glicada representa 4 a 6 % da hemoglobina total. Os valores de HbA_{1C} refletem as médias das glicemias durante os últimos 3 a 4 meses, que é o tempo de sobrevivência das hemácias. Em termos de proporcionalidade, quanto maior a concentração de glicose plasmática, maior a porcentagem da HbA_{1C} (NETTO *et al.*, 2009).

A hemoglobina glicada tem sido considerada como representativa da média ponderada global das glicemias médias diárias (incluindo glicemias de jejum e pós-prandial), sendo o padrão-ouro na avaliação do controle glicêmico, devendo ser realizada a cada 3 a 4 meses (NETTO *et al.*, 2009). O valor de referência para a HbA_{1C} é menor que 7 % (ADA, 2001) ou, mais precisamente, 6,5 %, de acordo a Sociedade Brasileira de Diabetes (NETTO *et al.*, 2009), sendo valores acima desses patamar um elevado risco de complicações micro e macrovasculares, bem como aumento nas taxas de mortalidade cardiovascular e retinopatia diabética (VILAR, 2013).

Segundo Netto *et al.* (2009), as complicações relacionadas aos elevados índices de HbA_{1C} são retinopatia diabética, polineuropatia, insuficiência renal, catarata, hipertensão, acidente vascular cerebral, doenças vasculares periféricas e amputações. Com intuito de se evitar problemas na interpretação dos níveis de HbA_{1C}, obtidos pelos diversos métodos laboratoriais, foi criado um projeto especial intitulado *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP), onde este programa promove a padronização das determinações do teste de HbA_{1C}, com relação ao método utilizado pelo *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) (NETTO *et al.*, 2009).

Pessoas com DM tem o risco aumentado de amputação dos membros inferiores em cinco vezes, quando comparado ao indivíduo sem DM. A porcentagem de pacientes diabéticos que sofrem amputação é de 10 a 15 %, sendo que 40 % necessitam de uma segunda amputação no decurso dos cinco anos que se seguem à primeira. Cerca de 60 a 95 % das amputações dos membros inferiores são precedidas de uma lesão crônica e mais de 50 % das amputações não traumáticas do adulto são efetuadas em diabéticos (VIDAL, 2009).

Outro fator relevante quando se trata da diabetes é a mortalidade. Quando o paciente é submetido a uma amputação primária após três anos, a porcentagem de sobrevivência é de 50 %, e em um período de 10 anos o índice de mortalidade é de 39 % a 68 %. A hiperglicemia prolongada, longo tempo de doença, dislipidemia, neuropatia, doença vascular periférica, presença de lesões ulcerativas e maus hábitos rotineiros, como tabagismo e uso de bebidas alcoólicas, predispoem para amputações maiores, transtibiais ou amputações menores ou transmetatarsianas (VIDAL, 2009).

2.2 Relação entre Neuropatia Periférica e Infecções Microbianas

Pessoas diabéticas representam um grupo único de pacientes que parecem ser mais propensos a desenvolver infecções do que pessoas não diabéticas. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a associação entre o diabetes e infecções, entretanto, poucos estudos foram conclusivos e há uma considerável discussão ocorrendo devido à evidência dessa predisposição (NAIR *et al.*, 2006-2007). Na neuropatia periférica, também conhecida como neuropatia diabética (ND), em pacientes diabéticos, leva à perda da sensação protetora, que, associada à alta glicose, pode resultar em um aumento de infecções, em que ocorre uma diminuição ou ausência das sensibilidades tátil, térmica, pressão e propriocepção, sendo a ausência desta última levando à perda dos reflexos tendinosos profundos (FATA *et al.*, 2010; CHADWICK, 2013).

Na ND, o indivíduo perde a sensibilidade protetora para a percepção da dor ou pressão, expondo o pé a risco para o desenvolvimento de lesões em consequência de trauma repetitivo. Como o trauma repetitivo não é percebido em razão da perda da sensibilidade protetora plantar e da perda da sensação de dor, surgem os calos, que aumentam em até 30 % a pressão local. Se a remoção do calo não for efetuada, favorece o aparecimento de uma lesão na área de pressão, que geralmente, evolui com complicações infecciosas. Além disso, com o comprometimento das fibras autonômicas simpáticas, ocorre a diminuição ou ausência total da secreção sudorípara (anidrose), tornando o pé seco e favorecendo a formação de fissuras e rachaduras que são porta de entrada para infecções oportunistas (VIDAL, 2009; VILAR, 2013).

Vários mecanismos tem papel no desenvolvimento da ND, além de deficiências neuro-hormonais e fatores de crescimento, entretanto, a hiperglicemia persistente parece ser o fator causal primário mais importante com base na hipótese metabólica, criando um ambiente favorável ao crescimento e penetração de bactérias e fungos oportunistas (VIDAL, 2009; VILAR, 2013).

O manuscrito *The Seattle Prospective Foot Study* foi um estudo de observação delineado para avaliar a incidência e os determinantes dos problemas de pé entre portadores de diabetes nos Estados Unidos. Esse estudo demonstrou que a hiperglicemia persistente antecedeu o aparecimento de neuropatia periférica. A conclusão deste manuscrito foi que a ND é o agente causal, ou seja, que inicia o processo fisiopatológico, levando à ulceração e à amputação (GAGLIARDI, 2003).

As úlceras resultam de múltiplos mecanismos fisiopatológicos, e a neuropatia periférica é, de longe, o motivo mais comum de formação de ulcerações no pé, levando a infecção (SLOVENKAI, 1998; CARVALHO *et al.*, 2004). A detecção e identificação precoce do processo neuropático oferece uma oportunidade crucial para o paciente diabético no sentido de ativamente procurar o controle glicêmico ótimo e programar cuidados com seus pés antes de a morbidade se tornar significativa (GAGLIARDI, 2003).

A causa exata de a neuropatia periférica diabética acontecer no diabetes tipo 2 permanece em dúvida, mas há evidências experimentais e clínicas do papel patogênico da hiperglicemia prolongada. O fato de a neuropatia predominar no tipo 2 é uma dessas dúvidas clínicas, sendo a maioria desses pacientes com pés contendo ulcerações graves e de evolução rápida (conhecido como pé diabético), onde fazem parte do grande grupo de doentes oriundos da camada social com menos recursos econômicos e culturais, caracteristicamente com história de falta de controle glicêmico (DUARTE; GONÇALVES, 2011).

2.3 Pé Diabético

O pé diabético é caracterizado por lesões ulcerativas em que o paciente apresenta em seus pés, causado pela neuropatia periférica dos membros inferiores e agravadas pelas alterações circulatórias decorrentes da micro e macroangiopatia (VILAR, 2013). A patogênese do pé diabético é altamente complexa, incluindo polineuropatia, doença vascular periférica (DVP) e comprometimento da imunidade, cicatrização mais lenta de feridas, trauma e infecção (SIDRIM; ROCHA, 2012, p. 266).

A síndrome do pé diabético, como também é conhecida, engloba um número considerável de condições patológicas, incluindo a neuroartropatia de Charcot, a ulceração do pé, a osteomielite e, final e potencialmente previsível, a amputação do membro afetado (DUARTE; GONÇALVES, 2011).

A doença vascular periférica, em geral, não constitui fator de risco isolado para ulcerações, mas quando associada à neuropatia, é uma das principais causas não traumáticas de amputação, além de favorecer o aparecimento de úlceras, atrasa o processo de cicatrização pela dificuldade do organismo em fornecer nutrientes e oxigênio ao leito da ferida, bem como favorece a infecção pelo prejuízo da ação do antibiótico devido à isquemia (CARVALHO *et al.*, 2004).

A DVP, ligada aos processos ulcerativos, torna-se quatro vezes mais comum em diabéticos e ocorre precocemente em ambos os gêneros. Sua gravidade está diretamente relacionada ao inadequado controle glicêmico, duração da doença, idade, tabagismo, hipertensão, dislipidemia e obesidade. No pé diabético, a presença de neuropatia, pontos de hiperpressão plantar e diminuição do fluxo arterial aos membros inferiores podem ocorrer simultaneamente ou não, e cada complicação aumenta a suscetibilidade de ocorrência de úlcera e, conseqüentemente, a amputação (VIDAL, 2009).

Os problemas com os pés representam uma das mais importantes complicações crônicas do DM. A ulceração nos pés causa considerável morbidade entre os diabéticos, e a amputação dos pés ou da perna é a consequência mais temida. A ulceração ocorre em 15 % dos diabéticos e é responsável por 6 a 20 % das hospitalizações. Nos hospitais universitários brasileiros, 51 % dos pacientes diabéticos internados nas enfermarias dos serviços de endocrinologia são por lesões graves nos pés. No Rio de Janeiro, no período de 1990 a 1996, a incidência de amputação relacionada ao diabetes foi de 180 a cada 100.000 pacientes diabéticos, representando um risco de amputação 100 vezes maior do que em não diabéticos. Em Fortaleza, no período de 1994 a 1996, 63 % das amputações não traumáticas registradas ocorreram em diabéticos (CARVALHO *et al.*, 2004). Estima-se que 14 a 20 % dos pacientes com úlceras nos pés são submetidos a uma amputação e que 85 % das amputações são precedidas de úlceras. A neuropatia diabética é um dos fatores predisponentes mais comuns para o pé diabético, e 5 a 7 % dos pacientes com essa complicação apresentam lesões ulcerativas nos pés (VIDAL, 2009).

O diagnóstico do pé diabético é realizado clinicamente, sendo feito, principalmente, pelos sintomas da neuropatia, presença de deformidades, doença vascular periférica, limitação da mobilidade das articulações, pequenos traumas, história de ulceração, infecções ou amputação (VIDAL, 2009; VILAR, 2013).

As lesões ulcerativas são classificadas de acordo com sua etiologia, que pode ser de origem neuropática, vascular ou a combinação de ambas, semelhantes à classificação do pé diabético (VIDAL, 2009; OYIBO *et al.*, 2001; DUARTE; GONÇALVES, 2011).

2.4 Classificação de Úlceras no Pé Diabético

Vários sistemas foram desenvolvidos para a classificação das úlceras no pé diabético, porém nenhuma teve ampla aceitação, dificultando as comparações dos achados

científicos neste campo. Vale ressaltar alguns modelos, como o de Wagner (1981), conforme apresentado no quadro 01, é o mais utilizado, por sua aplicabilidade em qualquer tipo de lesão. Na classificação de Wagner, os primeiros 4 graus (0, 1, 2 e 3) baseiam-se na profundidade da ferida e no comprometimento de tecidos adjacentes, e os 2 últimos graus (4 e 5) baseiam-se na perfusão do pé (OYIBO *et al.*, 2001; VIDAL, 2009; DUARTE; GONÇALVES, 2011; VILAR, 2013).

QUADRO 01 - Escala de Wagner, utilizada para classificar as úlceras em pés de pacientes diabéticos, de acordo com a gravidade da lesão.

GRAU	CARACTERÍSTICAS DA LESÃO
0	SEM LESÃO
1	ÚLCERA SUPERFICIAL, SEM ENVOLVIMENTO DE TECIDOS ADJACENTES
2	ÚLCERA PROFUNDA, ENVOLVE MÚSCULOS, LIGAMENTOS SEM OSTEOMIELITE OU ABSCESSO
3	ÚLCERA PROFUNDA, COM CELULITE, ABSCESSO E OSTEOMIELITE
4	GANGRENA LOCALIZADA (DEDOS, CALCANHAR)
5	GANGRENA DE (QUASE) TODO O PÉ

Fonte: Wagner (1981) adaptado por Vidal (2009).

Outro sistema de classificação a ser destacado é o da Universidade do Texas (QUADRO 02), que avalia a profundidade da lesão, presença de infecção e sinais de isquemia, que relaciona com as estruturas lesadas. No entanto, esta classificação, não faz nenhuma referência à neuropatia porque sua presença não direciona o tratamento para a cicatrização da úlcera. Essa omissão limita seu uso na descrição de úlceras do pé diabético no cuidado clínico diário (VIDAL, 2009).

QUADRO 02 - Classificação da Universidade do Texas, utilizada para classificar as úlceras em pés de pacientes diabéticos, de acordo com profundidade da lesão, presença de infecção e sinais de isquemia.

GRAU	ASPECTO DA LESÃO	S/ INFECÇÃO S/ ISQUEMIA	C/ INFECÇÃO S/ ISQUEMIA	C/ ISQUEMIA S/ INFECÇÃO	C/ ISQUEMIA C/ INFECÇÃO
0	PELE ÍNTEGRA				
1	LESÃO SUPERFICIAL				
2	LESÃO PROFUNDA SEM ENVOLVER OSSO OU JUNTA				
3	LESÃO PROFUNDA ENVOLVE OSSO OU JUNTA				

Fonte: Vidal (2009).

Um estudo comparativo entre o sistema de Wagner e o da Universidade do Texas realizados com 194 pacientes com lesões, por Oyibo *et al.* (2001), aponta o sistema da Universidade de Texas melhor preditor de amputação do que o sistema de Wagner, por incluir risco de ulceração de acordo com as categorias clínicas (OYIBO *et al.*, 2001; VIDAL, 2009).

O sistema de Macfarlane e Jeffcoat, denominado SAD (S = *size*; A = *area*; D = *depht*) avalia o tamanho da lesão (área e profundidade), presença de infecção, arteriopatia e presença de neuropatia, adota e adapta os mesmos parâmetros do sistema do Texas, porém falha em definir a celulite e osteomielite, doença arterial periférica (resumida em palpação de pulso) e foram omitidos achados como as calosidades, deformidades e edema (VIDAL, 2009).

Não há consenso quanto à classificação das úlceras pela diversidade dos modelos utilizados na prática clínica, sendo o mais utilizado, inclusive nesse estudo, a Classificação proposta por Wagner (1981).

2.5 Infecções Bacterianas no Pé Diabético

A presença de úlceras infectadas nos pés é uma causa comum de morbidade em pacientes diabéticos, levando as complicações temidas como gangrena e amputações. A

ulceração é a principal consequência das infecções nos pés, que normalmente ocorre após um trauma em pacientes com neuropatia. A infecção pode ser causada por bactérias patogênicas provenientes do ambiente externo, bem como por bactérias que fazem parte da microbiota fisiológica da pele, por exemplo, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* e *Propionibacterium acnes* (CARVALHO *et al.*, 2004; HEFNI *et al.*, 2012).

Infecções bacterianas em úlceras do pé diabético são de natureza monomicrobianas ou polimicrobianas, esta última ocorrendo em 60 a 80 % dos pacientes, sendo principalmente mistas aeróbico-anaeróbico. As espécies *S. aureus*, *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Morganella morganii*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas* spp. são os isolados aeróbicos mais encontrados. Os cocos Gram positivos, *S. aureus* e *S. epidermidis*, são isolados em cerca de 60 % de todas as úlceras infectadas, encontrados mais comumente nas úlceras superficiais. Bacilos Gram negativos, como *P. aeruginosa*, *Proteus* spp., *Neisseria gonorrhoeae* e *Escherichia coli* são encontrados em infecções mais profundas. *Clostridium perfringens*, *Prevotella oralis*, *Peptostreptococcus* spp. e *Bacterioides* spp. são os isolados anaeróbios mais encontrados, principalmente em feridas necróticas. Infecções extremamente invasivas e de caráter mionecrótico estão associadas às bactérias anaeróbicas, como *Clostridium perfringens* e *Bacteroides fragilis*, responsáveis por um quadro clínico de prognóstico grave, amplamente relacionado à amputação dos membros ou segmentos acometidos. Cerca de 15 % das úlceras infectadas tem a participação de bactérias anaeróbias estritas, encontradas mais comumente em úlceras profundas (CARVALHO *et al.*, 2004; MLINARIC-MISSONI *et al.*, 2005; DUARTE; GONÇALVES, 2011; HEFNI *et al.*, 2012; GEMECHU *et al.*, 2013; VIDAL, 2013; HADADI *et al.*, 2014).

A presença de processo infeccioso na ferida retarda a cicatrização por ter o patógeno e as células competindo pelos nutrientes e oxigênio. Além disso, a infecção prolonga o estágio inflamatório da cicatrização na medida em que as células combatem uma grande quantidade de bactérias e inibe a capacidade dos fibroblastos de produzir colágeno (VIDAL, 2009). O mecanismo pelo qual as bactérias atrasam o processo de cicatrização das úlceras não é completamente compreendido. Isto é sugerido que o papel principal é desempenhado pelos fatores de virulência, tais como enzimas proteolíticas (por exemplo, adesinas e exoenzimas), além da circulação microvascular dos membros inferiores estarem prejudicada em pacientes diabéticos, limitando o acesso dos fagócitos e diminuindo a disponibilidade de oxigênio ao microambiente vascular, intensificando ainda mais o

processo de infecção (HEFNI *et al.*, 2012; SIMÕES *et al.*, 2013; DHANASEKARAN *et al.*, 2014).

Em todo mundo, a resistência bacteriana à antimicrobianos vem alcançando níveis muito altos e ameaçando uma evolução favorável na terapêutica anti-infecciosa, tanto de pacientes comunitários quanto nosocomiais. O tratamento empírico já não pode ser mais utilizado, e todo esforço para fornecer aos clínicos resultados de resistência bacteriana a antimicrobianos deve ser feito. O aparecimento e disseminação de microrganismos com multirresistência aos antimicrobianos estão ocorrendo tanto nos hospitais como na comunidade (CARVALHO *et al.*, 2004). *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA) já são isoladas em feridas diabéticas. O aumento da associação de patógenos multirresistentes em úlceras do pé diabético aumenta o desafio enfrentado pelos médicos ou cirurgiões no tratamento de úlceras diabéticas, sem recorrer à amputação. Com o aumento das infecções, devido aos microrganismos multirresistentes, houve o aumento da duração da hospitalização, custos de gestão, morbidade e mortalidade dos pacientes diabéticos (HEFNI *et al.*, 2012; GEMECHU *et al.*, 2013). A presença de infecções polimicrobianas, juntamente com o aumento da resistência à terapia com antimicrobianos, tem comprometido a terapia empírica nas infecções do pé diabético (HADADI *et al.*, 2014).

2.6 Infecções Fúngicas no Pé Diabético

As infecções bacterianas geralmente acometem pacientes diabéticos portadores de úlceras nos pés e isto está bem descrito na literatura. As infecções fúngicas também contribuem para o aumento da gravidade do pé diabético. Pessoas com diabetes possuem um risco aumentado de infecções fúngicas, bem como serem mais propensas a enfrentar complicações nos pés, além das úlceras nos pés, paroníquias, celulites, osteomielite, gangrena e amputações em membros inferiores (PAPINI *et al.*, 2013).

O desenvolvimento de uma infecção fúngica pode contribuir para a patogênese da ulceração e celulite no pé diabético (CHADWICK, 2013). As infecções fúngicas em pacientes imunocomprometidos são uma das principais preocupações de saúde em todo o mundo, porém o espectro fúngico que infecta as feridas do pé diabético é pouco relatado e estudado na literatura, além disso, clínicos e cirurgiões apenas tratam feridas no pé diabético com agentes antibacterianos (CHELLAN *et al.*, 2010).

Dados na literatura mostram que a frequência de isolados fúngicos em úlceras do pé diabético difere significativamente, sendo as espécies de *Candida* as mais comumente isoladas em úlceras do pé diabético (5 % - 21 %). Esses tipos de leveduras fazem parte da microbiota normal da pele ou podem colonizar, secundariamente, as úlceras do pé diabético, dificultando a avaliação do real papel dos fungos isolados nas úlceras (MLINARIC-MISSONI *et al.*, 2005).

A frequência de infecções por espécies de *Candida* tem aumentado nas últimas décadas, tornando a candidemia uma infecção presente nos hospitais. Nos EUA, a taxa de fungemia entre 1980 e 1990 aumentou em torno de quatro vezes. Em 1990, cerca de 10 % de todas as infecções sanguíneas foram por *Candida* spp. Estas infecções representam o quarto lugar entre as adquiridas no ambiente hospitalar (ZARDO; MEZZARI, 2004). Alguns resultados na literatura relatam o aumento da incidência de infecções fúngicas (dermatofitoses e candidíase) nos espaços interdigitais, unhas e dedos de pacientes diabéticos, bem como a associação dessas infecções com o desenvolvimento de um processo inflamatório severo e profundo nos pés de pacientes diabéticos (MLINARIC-MISSONI *et al.*, 2005). O espessamento das unhas como resultado da onicomicose pode causar um aumento da pressão subungueal e consequentemente ulceração (CHADWICK, 2013).

Cerca de 85 % das amputações do membro inferior são precedidas por infecções polimicrobianas (CHELLAN *et al.*, 2010). O sinergismo entre algumas espécies fúngicas, como espécies de *Candida*, com outros microrganismos, principalmente as espécies da família *Enterobacteriaceae*, aumentam o potencial patogênico das espécies fúngicas e, consequentemente, a habilidade de causar infecções em úlceras do pé (MLINARIC-MISSONI *et al.*, 2005).

Fungos oportunistas podem contaminar feridas profundas no pé diabético e contribuir para retardar a cicatrização dessas feridas em pacientes diabéticos e imunocomprometidos (CHELLAN *et al.*, 2010). A produção de fosfolipase é um fator de virulência importante no processo da infecção, onde esta enzima, localizada na superfície da levedura e na extremidade do tubo germinativo, atua na hidrólise de fosfolipídeos, dando origem a lisofosfolipídeos que causa dano à célula epitelial. Entre as espécies de *Candida*, apenas a *C. albicans* é capaz de produzir fosfolipase, demonstrando seu potencial patogênico. A espécie de *C. albicans* também possui adesinas, biomoléculas que promovem a aderência do fungo às células do hospedeiro. As outras espécies do gênero *Candida* também expressam fatores de virulência, embora menos estudados, possuindo enzimas

proteolíticas extracelulares capazes de degradar substratos, como a queratina, colágeno, albumina, fibronectina, hemoglobina, cadeia pesada de imunoglobulinas e proteínas da matriz extracelular (ZARDO; MEZZARI, 2004; DHANASEKARAN *et al.*, 2014).

A prevenção, identificação e monitoramento das infecções fúngicas nos pés de pessoas com diabetes são importantes. Para evitar o desenvolvimento de infecções fúngicas ou outro tipo de infecção e suas complicações, é aconselhado manter uma boa higiene dos pés e tratamento com agentes antifúngicos e antibacterianos, em associação, além do uso regular do sapato adequado, manter os pés secos e evitar o contato direto com o chão (VIDAL, 2009; CHADWICK, 2013).

2.7 Diagnóstico das Infecções Fúngicas

O diagnóstico de infecção nas úlceras dos pés de paciente diabéticos baseia-se tanto no exame clínico quanto no laboratorial.

No exame clínico, o clínico deverá buscar sinais de reação inflamatória local (calor, rubor, edema), pesquisa de dor e na ferida observar mudança da cor e quantidade do exsudato, exacerbação do odor, aumento do tecido necrótico e a friabilidade do tecido de granulação. Quanto aos aspectos das unhas, observar possível presença de onicomicose ou paroníquias, e quanto ao aspecto da pele, observar se está seca e com ausência de pelos. Em úlceras neuropáticas há aumento de áreas de hiperqueratoses (VIDAL, 2009; SIMÕES *et al.*, 2013).

O exame laboratorial de ampla utilização é a cultura de exsudato do leito da ferida, em que a coleta do material é realizada com um *swab* de alginato de cálcio, estéril, no leito da lesão que apresenta tecido de granulação ou com bisturi para coleta de tecidos mais profundos e remoção de tecidos já desvitalizados. Em feridas profundas, afastam-se as bordas para permitir acesso à cavidade central. Estudos laboratoriais pelo hemograma, a leucocitose pode assinalar um abscesso plantar ou outras infecções e a cicatrização é dificultada pela isquemia (DUARTE; GONÇALVES, 2011; SIMÕES *et al.*, 2013).

A osteomielite é uma infecção do osso, comumente presente em processos infecciosos em pacientes diabéticos, que pode ser aguda ou crônica, onde poder ser diagnosticada pela radiografia. Neste exame, um foco de infecção óssea revela-se por destruição e reformação ósseas, havendo zonas líticas centrais e reação periosteal produtiva. A presença de margens ósseas mal definidas, em oposição a margens mais escleróticas na

osteopatia e na artropatia é o único sinal útil de apoio ao diagnóstico radiológico de infecção. A tomografia computadorizada e a ressonância magnética nuclear (RMN), também são utilizadas para o diagnóstico de osteomielite, são indicadas se o abscesso plantar é suspeito. Na osteomielite, a tomografia computadorizada tem uma sensibilidade muito maior, mas a RMN é mais específica, dando um sinal de medula óssea normal na ausência de infecção e um sinal de alta intensidade se há osteíte (DUARTE; GONÇALVES, 2011; SIMÕES *et al.*, 2013).

Para auxiliar o diagnóstico laboratorial das infecções fúngicas, é recomendado o exame micológico convencional. Devido sua típica forma e tamanho, os elementos fúngicos podem ser visualizados por meio de preparações histopatológicas de biópsias da úlcera usando diversos procedimentos laboratoriais. A demonstração microscópica da invasão tecidual e a reação do hospedeiro confirmam a existência da infecção fúngica (MLINARIC-MISSONI *et al.*, 2005; SIMÕES *et al.*, 2013).

Na metodologia micológica convencional, o material deve ser processado em duas etapas. A primeira etapa consiste na confecção de lâmina para observação micológica (lâmina-lamínula com KOH 10 - 40 %, técnica de coloração de Gram e coloração com lactofenol azul de algodão, variando a técnica conforme a suspeita da espécie fúngica), ou ainda, *imprints* e cortes histológicos corados para observação das estruturas fúngicas. À microscopia, devem ser observadas estruturas blasconidiadas, associadas ou não a pseudohifas e pseudomicélios, entretanto, se o agente etiológico for *C. albicans* ou *C. tropicalis*, podem-se observar também hifas verdadeiras, devido aos seus dimorfismos (MLINARIC-MISSONI *et al.*, 2005; SIMÕES *et al.*, 2013; DHANASEKARAN *et al.*, 2014; ELFEKY *et al.*, 2016).

A segunda etapa do processamento da amostra clínica utiliza-se os meios convencionais ou primários para fungos, tais como ágar Sabouraud dextrose, meio recomendado para o crescimento e cultivo de fungos (leveduras e bolores), particularmente fungos associados a infecções na pele, e a alta concentração de dextrose é utilizada como fonte de energia (HIMEDIA LABORATÓRIOS, 2016); ágar batata dextrose, meio recomendado para isolamento e enumeração de fungos leveduriformes e filamentosos, bem como utilizado para promover a esporulação e para manutenção de culturas estoque. A infusão de batata e dextrose promove um abundante crescimento fúngico (HIMEDIA LABORATÓRIOS, 2016).

Uso de meios seletivos, como o ágar Sabouraud dextrose + cloranfenicol, meio recomendado para o cultivo de fungos leveduriformes e filamentosos, especialmente envolvidos em infecções cutâneas, que, associado ao cloranfenicol, inibe uma grande variedade de bactérias Gram positivas e Gram negativas, tornando o meio seletivo para fungos (BIOSYSTEMS, 2016); ágar Sabouraud + cloranfenicol e cicloeximida, meio altamente seletivo usado no isolamento de fungos patogênicos, provenientes de materiais de microbiota abundante, não sendo um meio de utilização geral para o isolamento de todas as espécies fúngicas (BIOSYSTEMS, 2016); e RPMI 1640 (com glutamina, sem bicarbonato de sódio e com o indicador vermelho de fenol), meio quimicamente definido, livre de macromoléculas, que suporta crescimento adequado de diversas espécies de leveduras, indicado para a realização dos testes de sensibilidade (CLSI-M27A2, 2002).

Além dos meios convencionais, existem os meios diferenciais, como o meio cromogênico ágar HiCrome *Candida* diferencial, meio recomendado para o rápido isolamento e identificação de espécies de *Candida* em culturas mistas, no período de 48 horas de crescimento. O ágar HiCrome *Candida* diferencial® é um meio diferencial que promove o rápido isolamento de fungos em amostras mistas e permite a diferenciação de espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*), com base na morfologia e coloração das colônias. Este meio cromogênico contém cloranfenicol, que inibe o crescimento bacteriano associado, no qual podem ser detectadas mais facilmente infecções mistas por leveduras, onde as colônias de leveduras tomarão colorações características (DHANASEKARAN *et al.*, 2014; HIMEDIA LABORATÓRIOS, 2016); e o meio ágar fubá adicionado de tween 80 ou ágar arroz adicionado tween 80, meio recomendado para a produção de clamidósporos por *Candida albicans*, e para manutenção de cultura estoque de fungos. A produção de clamidósporos é o critério de aceitação para identificação de espécies de *C. albicans*. A adição de 1 % de tween 80 ao meio estimula a rápida e abundante produção de clamidósporos por *C. albicans* (HIMEDIA LABORATÓRIOS, 2016).

A identificação laboratorial final é feita com testes de assimilação e fermentação de carboidratos e nitrogênio, para identificação de leveduras, formação do tubo germinativo, que distingue espécie que formam tubo germinativo (tubo germinativo positivo) de espécies que não formam tubo germinativo (tubo germinativo negativo) e teste da urease, em que a levedura apresenta a capacidade de hidrolisar ou não a uréia no meio ágar uréia Christensen, onde leveduras das espécies de *Candida* apresentam teste da urease negativo e outras

espécies de leveduras, tais como *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp. e *Trichosporon* spp. apresentam teste da urease positivo. Por fim, podem ser utilizados ainda sistemas automatizados e semiautomatizados, tais como *Microscan Rapid Yeast Ident* (Baxter) e o *Auto Microbic* (Bio-Mérieux-Vitek) (SIDRIM; ROCHA, 2012).

É de grande importância solicitar ambos diagnósticos, clínico e laboratorial, para identificar a espécie fúngica infectante, bem como saber se essa espécie é verdadeiramente patogênica ou faz parte da colonização superficial da pele. Entretanto, devido à baixa notificação da incidência de infecções fúngicas no pé diabético, tais exames diagnósticos não são solicitados para a rotina micológica laboratorial das infecções nas úlceras do pé de pacientes diabéticos (MLINARIC-MISSONI *et al.*, 2005). Entretanto, uma vez que as espécies de *Candida* são responsáveis pela maioria dos casos de infecções fúngicas graves, os laboratórios de microbiologia dos hospitais, especialmente os terciários, devem estar preparados para a identificação das diferentes espécies, devido à importância epidemiológica e necessidade da definição terapêutica (SIDRIM; ROCHA, 2012).

2.8 Tratamento das Infecções Fúngicas

A anfotericina B, um antifúngico poliênico, tem sido considerada o padrão "ouro" para o tratamento de infecções fúngicas, mas sua toxicidade limita seu uso. Este antifúngico liga-se aos esteróis, em particular ao ergosterol, causando a formação de poros na membrana celular que leva à lise e, consequente, morte da célula fúngica (MORACE *et al.*, 2014; IBRAHIM *et al.*, 2014; BASSETTI *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016, no prelo).

A anfotericina B, na forma desoxicolato, é um fármaco que se liga ao ergosterol na membrana fúngica, porém devido à sua toxicidade, a anfotericina B desoxicolato foi sendo substituído por outros tipos de formulações. Três apresentações lipídicas de anfotericina B estão atualmente aprovadas para uso clínico: forma lipossomal, complexo lipídico e dispersão coloidal de anfotericina B, sendo utilizadas para reduzir o grau de toxicidade apresentada pela anfotericina B desoxicolato (MORACE *et al.*, 2014; IBRAHIM *et al.*, 2014; BASSETTI *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016, no prelo).

A anfotericina B possui atividade *in vitro* consistente contra biofilmes de *C. albicans*. Em formulações lipossômicas, a anfotericina B é ainda a droga antifúngica amplamente utilizada para o tratamento de infecções micóticas sistêmicas no hospedeiro imunocomprometido ou em pacientes gravemente doentes. Do ponto de vista

microbiológico, a resistência aos poliênicos é difícil de detectar *in vitro*, pois é influenciado pelo método de ensaio, tipo de meio e pelas espécies fúngicas. A principal hipótese para a possível causa de resistência aos poliênicos é devido a uma menor afinidade deste antifúngico ao ergosterol, devido às mutações na rota de biossíntese desse componente na célula fúngica (ALVES *et al.*, 2010; DUARTE; GONÇALVES, 2011; MORACE *et al.*, 2014; CAMPOY; ADRIO, 2016, no prelo; BUSCA *et al.*, 2015).

As equinocandinas agem na parede celular fúngica inibindo o 1,3- β -D-glucano, tendo, portanto, atividade fungicida contra as espécies de *Candida*. Como o 1,3- β -D-glucano não faz parte de células humanas, as equinocandinas exibem forte tolerabilidade e perfis de segurança para os pacientes. Atualmente, três equinocandinas, anidulafungina, caspofungina e micafungina, são utilizadas para tratamento e prevenção de candidíase invasiva (MORACE *et al.*, 2014; BASSETTI *et al.*, 2016; PRIGENT *et al.*, 2016, no prelo).

A flucitosina (5-fluorocitosina) é um agente antifúngico que interfere com a estrutura do DNA e síntese protéica. Devido à alta incidência de resistência primária e/ou adquirida, o uso de flucitosina como monoterapia é restrito. No entanto, a flucitosina tem uma boa distribuição nos tecidos, devendo ser utilizado em combinação com outros antifúngicos (MORACE *et al.*, 2014; BASSETTI *et al.*, 2016).

Dentre os azólicos, os triazólicos, como o fluconazol e itraconazol, tanto para administração oral como intravenosa, são menos tóxicos e mais específicos que os imidazólicos, como o cetoconazol, e podem ser utilizados para o tratamento de micoses cutâneas e invasivas. Os imidazólicos, com exceção do cetoconazol, são limitados às aplicações tópicas. Tanto os triazólicos como os imidazólicos são utilizados na profilaxia de pacientes com risco de desenvolverem infecções fúngicas, pois são menos tóxicos do que os poliênicos (anfotericina B e nistatina) (IBRAHIM *et al.*, 2014; BASSETTI *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016, no prelo).

Os agentes triazólicos interferem na biossíntese do ergosterol, esterol presente em maior quantidade na membrana plasmática dos fungos. A ação desses antifúngicos ocorre através da inibição da enzima 14- α -desmetilase (14-DM), uma enzima do citocromo P-450 importante na rota de biossíntese do ergosterol, constituinte da membrana citoplasmática fúngica, que atua removendo o grupamento 14- α -metil do lanosterol, um dos últimos passos da via de biossíntese do ergosterol. Os triazólicos ligam-se ao sítio ativo da 14-DM e competem com o substrato pela ligação (DUARTE; GONÇALVES, 2011;

MORACE *et al.*, 2014; IBRAHIM *et al.*, 2014; BUSCA *et al.*, 2015; CAMPOY; ADRIO, 2016, no prelo).

O itraconazol, que possui um espectro antifúngico mais amplo contra leveduras, dentre ao triazólicos de primeira geração, pode ser utilizado também no tratamento das dermatofitoses e aspergilose, já o fluconazol, triazólico que possui maior penetração no Sistema Nervoso Central, tem se mostrado efetivo em outras situações clínicas, como na candidíase oral e esofagiana de pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), em infecções na medula óssea e em pacientes transplantados renais. Nos pacientes com SIDA, apesar do sucesso na terapêutica ser alta, pode ocorrer falha na terapêutica quando o uso do fluconazol for por longos períodos (MORACE *et al.*, 2014; BASSETTI *et al.*, 2016). Os triazólicos representam a terapia de primeira linha para tratamento de pacientes imunocomprometidos com infecções fúngicas invasivas (BUSCA *et al.*, 2015).

A falha do tratamento antifúngico pode estar relacionada tanto ao hospedeiro (estado imunológico, local da infecção, gravidade da infecção, formação de abscessos e adesão à tratamento), ao fármaco (atividade fungistática ou fungicida, dosagem, farmacocinética e interações medicamentosas) e, naturalmente, a espécie fúngica responsável (organização celular em hifas, pseudohifas ou micélios e pseudomicélios, morfologia, carga fúngica e produção de biofilme) (ALVES *et al.*, 2010; MORACE *et al.*, 2014; BUSCA *et al.*, 2015; TAPIA *et al.*, 2016; BASSETTI *et al.*, 2016).

Pessoas com diabetes *mellitus*, no entanto, tendem a ser mais resistentes ao tratamento com antifúngicos tradicionais devido à hiperglicemia e a dificuldade em manter uma boa higiene dos pés. A segunda questão importante é o papel da polifarmácia, pois aumenta o risco de interações medicamentosas. O tratamento deve ser iniciado o mais precoce possível, e medidas preventivas devem ser utilizadas para evitar a infecção e recidivas. O tratamento deve envolver cuidados sanitários, levando em consideração as comorbidades do paciente, uso de outros medicamentos e conhecimento sobre a resistência aos antifúngicos (CHADWICK, 2013). Entretanto, devido à baixa prevalência das infecções fúngicas descritas na literatura, não é habitual que clínicos e cirurgiões prescrevam antifúngicos associados aos antibacterianos para tratamento do pé diabético.

2.9 Resistência aos Antifúngicos

A resistência aos antifúngicos tem representado um grande desafio para os clínicos, frente às dificuldades observadas no tratamento da candidíase. Este aumento pode ser decorrente do uso de terapias seletivas com doses inadequadas ou devido ao uso crescente desses fármacos na profilaxia de infecções fúngicas, o que pode condicionar a seleção da resistência fúngica. O uso irracional de antifúngicos continuamente, tanto para fins terapêuticos como profiláticos, dá origem ao aumento emergente de cepas resistentes. (GALLE *et al.*, 2004; ALVES *et al.*, 2010).

Do ponto de vista micológico, a resistência aos antifúngicos ocorre quando a concentração inibitória mínima (CIM) aumenta frente aos isolados fúngicos, que, associado a isso, tem-se à falha terapêutica na prática clínica (MORACE *et al.*, 2014; IBRAHIM *et al.*, 2014; BASSETTI *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, em todo o mundo, tem-se observado um crescente aumento de infecções por *Candida* spp. resistentes a antifúngicos comumente usados na prática clínica, principalmente no ambiente hospitalar. A resistência destas tem ocorrido principalmente aos triazólicos, comumente fluconazol e itraconazol, devido a estes serem mais prescritos (NUNES *et al.*, 2011; TAPIA *et al.*, 2016; KAUR *et al.*, 2016).

Os primeiros dados da resistência aos antifúngicos ocorreram em pacientes com candidíase muco-cutânea tratados com fluconazol, através de mecanismos celulares de extrusão aos antifúngicos. Desde o início da epidemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, esse problema se tornou agravante. O desenvolvimento da resistência aos triazólicos ocorreu, neste caso, devido ao uso prolongado e repetido desses fármacos na terapêutica de pacientes imunossuprimidos, apresentando baixas contagens de células CD₄⁺, com candidíase oral e esofágica. Os isolados resistentes ao fluconazol, por exemplo, têm se tornado mais frequente em virtude do aumento do uso dos triazólicos na terapêutica antifúngica (ZARDO; MEZZARI, 2004; MORACE *et al.*, 2014; IBRAHIM *et al.*, 2014).

A resistência antifúngica pode ser clínica ou *in vitro*. A primeira pode ser consequência do baixo nível do fármaco no tecido e no sangue, devido à interação entre os fármacos ou à imunossupressão do paciente ou devido ao uso prolongado das drogas antifúngicas. Já a resistência *in vitro*, as cepas sensíveis se transformam em resistentes devido ao prévio contato com o antifúngico, ou inerente ao próprio microrganismo, como no caso de *Candida krusei*, intrinsecamente resistente ao fluconazol. É consenso que a

resistência ao fármaco depende da interação entre o hospedeiro, o fármaco e a espécie fúngica, porém os fatores predisponentes do paciente, como a imunossupressão, são os mais importantes para o surgimento da resistência (ZARDO; MEZZARI, 2004).

Existem dois principais mecanismos moleculares de resistência aos triazólicos, identificados em *C. albicans*. O primeiro, e mais comum, surge na superexpressão do gene ERG 11 ou suas mutações, presente em espécies de *Candida*, envolvido na síntese da enzima 14-DM. As mutações no gene ERG 11 em espécies de *Candida* diminuem a afinidade para os triazólicos, reduzindo o acúmulo intracelular ou inativação destes fármacos, que conduzem à resistência fúngica. O segundo mecanismo descrito seria por efluxo das drogas, através de bombas de efluxo (ZARDO; MEZZARI, 2004; MORACE *et al.*, 2014; CAMPOY; ADRIO, 2016, no prelo; BUSCA *et al.*, 2015; OZER *et al.*, 2016; CHAKRABARTI *et al.*, 2009; PRIGENT *et al.*, 2016, no prelo). Portanto, é necessário conhecer o mecanismo de resistência das espécies de *Candida* para auxiliar no desenvolvimento de estratégias em novas ações terapêuticas (ZARDO; MEZZARI, 2004; CAMPOY; ADRIO, 2016, no prelo, TAPIA *et al.*, 2016).

A resistência aos antifúngicos, entre as espécies de *Candida*, tem sido um desafio crescente, tornando-se necessário o uso de testes de sensibilidade nos isolados clínicos. A identificação prévia das espécies de *Candida* e a determinação da sensibilidade *in vitro* têm sido recomendadas em alguns casos, como na candidíase de orofaringe de pacientes infectados com HIV, micoses sistêmicas, vaginites recorrentes e pé diabético (ZARDO; MEZZARI, 2004).

Os testes de sensibilidade em isolados fúngicos têm-se mostrado de grande importância clínica na escolha da terapêutica antifúngica adequada, sendo importante considerar o patógeno e as características intrínsecas do paciente. As infecções por *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* têm aumentado e por *C. albicans* têm diminuído proporcionalmente, devendo levar em consideração este dado epidemiológico. Tem sido observado, com maior frequência, o isolamento de cepas de *Candida* com sensibilidade diminuída ou resistente aos antifúngicos mais prescritos na prática clínica, como o fluconazol (ZARDO; MEZZARI, 2004). Indubitavelmente, só o conhecimento do perfil de sensibilidade permite uma conduta segura frente a uma infecção causada por *Candida* spp. (NUNES *et al.*, 2011).

O Comitê Nacional de Padronização dos Laboratórios Clínicos, o *National Committee for clinical Laboratory Standards* (NCCLS), atualmente denominado *Clinical*

Laboratory Standards Institute (CLSI), estabeleceu um subcomitê para padronizar uma metodologia capaz de avaliar a sensibilidade *in vitro* das espécies de *Candida*, que foi a microdiluição em caldo, aprovando o documento CLSI-M27A2 (ZARDO; MEZZARI, 2004; MORACE *et al.*, 2014; IBRAHIM *et al.*, 2014; CAMPOY; ADRIO, 2016, no prelo).

O teste de sensibilidade é considerado método padrão do CLSI, que apesar da boa reprodutibilidade, entretanto, é um método extremamente trabalhoso e demorado, de difícil aplicabilidade na rotina laboratorial, necessitando de melhorias futuras. Outra limitação do uso dos testes de sensibilidade na prática clínica são os dados limitados de correlação da CIM com casos de candidíase invasiva, especialmente em pacientes imunossuprimidos (ZARDO; MEZZARI, 2004; MORACE *et al.*, 2014).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Descrever, através de um estudo prospectivo, a cultura, isolamento, identificação e sensibilidade de *Candida* spp. presentes em úlceras nos pés de pacientes diabéticos.

3.2 Objetivos Específicos

- Elaborar um questionário estruturado contendo informações epidemiológicas para ser aplicado aos pacientes diabéticos portadores de úlceras nos pés;
- Realizar a cultura fúngica de amostras biológicas de pacientes portadores de pé diabético no meio seletivo ágar Sabouraud com cloranfenicol;
- Isolar e identificar as espécies de *Candida* presentes em úlceras do pé diabético por microcultivo em ágar fubá adicionado de tween 80 1 % e no meio cromogênico ágar HiCrome *Candida* diferencial®;
- Identificar as bactérias presentes em úlceras do pé diabético;
- Descrever o padrão de sensibilidade de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, cetoconazol, fluconazol e itraconazol;
- Descrever o desfecho clínico dos pacientes diabéticos portadores de úlceras nos pés.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do Estudo

A coleta das amostras foi realizada no Centro Cirúrgico do Hospital Regional Norte (HRN), um hospital de abrangência macrorregional, com nível de atenção terciária, de ensino e pesquisa em saúde, de grande porte, com atendimento de urgência e emergência clínica, cirúrgica, pediátrica e obstétrica, situado no município de Sobral, Ceará. O HRN conta com 382 leitos hospitalares, dos quais 312 são leitos de internação e 70 são de terapia intensiva, adulta, pediátrica e neonatal, sendo referência em cirurgias vasculares no interior do estado do Ceará (CEARÁ, 2016).

A parte experimental da pesquisa, após a coleta das amostras, foi desenvolvida no Laboratório de Microbiologia e Parasitologia (LAMP) da Faculdade de Medicina (FAMED) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

4.2 Tipo do Estudo

Um estudo primário foi realizado, por se tratar de uma investigação original; ensaio clínico, por ter envolvido pacientes elegíveis para pesquisa; prospectivo, por tratar-se de um estudo atual, seguindo para o futuro; observacional, pois o pesquisador se limitou a simples observação da condição clínica do paciente, não interferindo na inclusão, exclusão e modificação de dados; transversal, pois a exposição aos agravantes dos pacientes diabéticos é relativamente constante e as consequências são crônicas; e aberto, pois não ocorreu mascaramento da pesquisa, tanto por parte do pesquisador, bem como dos pacientes diabéticos com úlceras nos pés, atendidos no HRN.

4.3 Período de realização do Estudo

O presente estudo foi desenvolvido no período de setembro de 2015 a setembro de 2016, com início da coleta das amostras, parte experimental e análise dos dados após a submissão do Comitê de Ética em Pesquisa através da Plataforma Brasil (via *online*) e então se aguardou o parecer favorável para iniciar a aplicação dos instrumentos da pesquisa.

4.4 População Estudada

Os pacientes atendidos no referido hospital para manejo cirúrgico de úlceras relacionadas ao diabetes (tipo 1 e tipo 2), em um ou ambos os pés, foram incluídos nesse estudo. Foram excluídos pacientes em uso de antifúngicos pelo menos nas últimas 4 (quatro) semanas, ou que não deram seu consentimento ou do responsável legal.

No ato da coleta, foi aplicado ao paciente diabético ou seu responsável, um questionário estruturado contendo informações clínicas relacionadas às úlceras do pé diabético (APÊNDICE A).

As amostras coletadas dos pacientes elegíveis para a pesquisa foram nomeadas da seguinte forma: iniciais do nome do paciente seguido por uma numeração arábica sequencial.

4.5 Classificação das úlceras do pé diabético

A classificação adotada neste estudo foi a de Wagner, mais amplamente utilizada por sua aplicabilidade em qualquer tipo de lesão.

Pacientes sem lesão foram classificados como grau 0; pacientes com úlceras superficiais foram classificados em grau 1; pacientes com úlceras profundas, sem diagnóstico de osteomielite, foram classificados em grau 2; pacientes com úlceras profundas, com diagnóstico de osteomielite, foram classificados em grau 3; pacientes que tiveram um ou mais dedos amputados, sem envolvimento de todo o pé, foram classificados em grau 4; e pacientes que tiveram amputação do pé ou ao nível da coxa foram classificados em grau 5. Caso a amputação tenha sido de caráter progressivo e sucessivas vezes, foi classificada como a de maior grau, dependendo da região acometida.

4.6 Coleta e Transporte das Amostras

O procedimento realizado para a coleta da amostra foi através, primeiramente, da anestesia raquidiana (com bupivacaína 5 mg/mL + glicose 80 mg/mL, geralmente), seguido por lavagem com solução salina estéril 0,9 %, logo após isso, rigorosa assepsia com solução degermante de clorexidina 2 % (geralmente) e, por fim, desbridamento do tecido

necrosado superficial, para que, posteriormente, possam ser coletados os fragmentos de tecidos do pé diabético do paciente.

Os fragmentos coletados dos pacientes diabéticos com úlceras nos pés foram de diferentes tipos de tecidos tais como, tecido muscular, fragmento ósseo, medula óssea e tendão (0,5 x 0,5 cm de tamanho, aproximadamente), com instrumental cirúrgico estéril (lâmina de bisturi) e colocados em frascos plásticos estéreis com solução salina 0,9 %, em seguida, encaminhados, no prazo máximo de 24 horas, sob acondicionamento a frio, ao LAMP para processamento experimental.

4.7 Cultura Fúngica

Os espécimes coletados foram processados em cabine de fluxo laminar vertical. Os fragmentos contidos em solução salina foram submetidos ao aparelho agitador tipo vortex para gerar uma suspensão da amostra biológica e, posteriormente, a amostra em suspensão, foi semeada diretamente com a alça microbiológica numa placa de Petri estéril, contendo o meio ágar Sabouraud com cloranfenicol, seletivo para crescimento fúngico. Estas foram incubadas à temperatura ambiente por até 02 (dois) dias. As culturas foram observadas diariamente para verificação do crescimento fúngico. Caso não houvesse crescimento fúngico em dois dias, a amostra seria descartada.

4.8 Isolamento e Identificação das Culturas

As espécies fúngicas que cresceram em cultivo seletivo foram identificadas através da metodologia micológica convencional. No momento da observação do crescimento fúngico nas placas de Petri, no meio Sabouraud com cloranfenicol, a colônia que cresceu foi transferida, com auxílio do garfo microbiológico, para tubos de ensaios contendo o meio inclinado de ágar batata dextrose, através de três cortes profundos e em paralelo no meio de cultura. Esperou-se o crescimento da (s) espécie (s) fúngica (s) por 02 (dois) dias no meio citado anteriormente. Caso a placa apresentasse mais de uma colônia leveduriforme diferente, cada colônia era transferida para um tubo separadamente. A detecção de fungos leveduriformes foi realizada com base na observação macroscópica de colônias brancas a levemente amareladas, lisas, glabras e mucóides.

Como o meio ágar batata dextrose não se configura como um meio seletivo, todas as amostras foram repicadas em tubos de ensaio contendo o meio inclinado de ágar Sabouraud com cloranfenicol, com auxílio do garfo microbiológico, através de três cortes profundos e em paralelo no meio de cultura, para a obtenção de amostras mais purificadas e isentas de contaminantes fúngicos filamentosos e bacterianos. Esperou-se o crescimento por até 02 dias.

Nas amostras que cresceram novamente no meio seletivo para fungos, com coloração branca a levemente amarelada e aspecto glabroso, liso e mucóide, foram realizadas a técnica de coloração do Gram para observação das características morfo-tintoriais. As leveduras são coradas, pela técnica de coloração pelo Gram, tendo o aspecto de Gram positivas (coloração azul a roxo intenso), devido à coloração das estruturas micromorfológicas tais como blastoconídios, hifas e pseudohifas. Entretanto, se o agente etiológico for *C. albicans* ou *C. tropicalis*, podem-se observar também hifas verdadeiras, por se tratarem de fungos pleomórficos.

Caso estas características morfo-tintoriais sejam observadas, foi realizado microcultivo da levedura em ágar fubá acrescido de polissorbato 80 (tween® 80) a 1 % em placas de Petri estéreis. Foram feitos três cortes, centrais e em paralelos nas placas, com auxílio do garfo microbiológico, e colocada uma lamínula sobre estes, e posteriormente as amostras foram incubadas à 25 - 30 °C durante 48 horas para a observação da micromorfologia dos isolados, observados à microscopia óptica, como clamidósporos, pseudohifas, blastoconídios e hifas verdadeiras.

As leveduras isoladas e purificadas foram ainda semeadas em meio cromogênico ágar HiCrome *Candida* diferencial® e incubadas à 25 - 30 °C durante 48 horas. Cada placa de Petri, contendo o meio cromogênico, foi dividida em oito quadrantes e as amostras foram inoculadas superficialmente, com auxílio da alça microbiológica, sendo cada amostra em um quadrante. Posteriormente, as amostras inoculadas foram protegidas da luz, usando o papel alumínio, devido os componentes da mistura cromogênica serem fotossensíveis, para posterior visualização macroscópica da coloração dos isolados de *Candida* spp.

4.9 Identificação das bactérias presentes em úlceras do pé diabético

Foram coletados os resultados das culturas, realizadas pelo laboratório terceirizado que presta serviços ao HRN, sobre a identificação das bactérias em pacientes portadores de úlceras nos pés.

4.10 Teste de sensibilidade de *Candida albicans* aos antifúngicos

O teste de sensibilidade à antifúngicos foi realizado para as espécies de *Candida albicans* isoladas e identificadas neste estudo. As concentrações inibitórias mínimas (CIM) para *C. albicans* foram determinadas pelo método da microdiluição em caldo em placas estéreis de 96 poços, no formato em “U”, descrito pelo CLSI-M27A2 (2002). Os critérios de sensibilidade e resistência foram estabelecidos de acordo com o CLSI-M27A2 (2002) (QUADRO 03).

QUADRO 03 - Diretrizes de interpretação dos testes de sensibilidade *in vitro* das espécies de *Candida*.

	SENSÍVEL (µg/mL)	SENSIBILIDADE DOSE-DEPENDENTE (µg/mL)	RESISTENTE (µg/mL)
ANFOTERICINA B	≤ 1	-	> 1
CETOCONAZOL	≥ 0,03 e ≤ 16	-	> 16
FLUCONAZOL	≤ 8	≥ 16 e ≤ 32	≥ 64
ITRACONAZOL	≤ 0,125	≥ 0,25 e ≤ 0,5	≥ 1

Fonte: CLSI-M27A2 (2002).

Para o preparo das soluções-padrão de anfotericina B, cetoconazol e itraconazol foram realizados a diluição do pó (Sigma-Aldrich®) em DMSO (dimetilsulfóxido); e para o fluconazol o preparo da amostra foi diluído em água estéril destilada. A concentração inicial (C_1) da solução-padrão de anfotericina B foi 25.000 µg/mL; a concentração inicial (C_1) da solução-padrão de cetoconazol foi 20.000 µg/mL; a concentração inicial (C_1) da solução-padrão de fluconazol foi 15.000 µg/mL; e a concentração inicial (C_1) da solução-padrão de itraconazol foi 10.000 µg/mL, todas de acordo com o CLSI-M27A2.

Para o preparo da solução-auxiliar, a partir da solução-padrão, utilizou-se a equação química da diluição ($C_1.V_1 = C_2.V_2$). Como diluente, foi utilizado o dimetilsulfóxido (DMSO) para as drogas anfotericina B, cetoconazol e itraconazol, e água

destilada estéril como diluente para o fluconazol. A concentração final (C_2) das soluções-auxiliares foi definida para 64 $\mu\text{g/mL}$, preparadas de acordo como descrito no CLSI-M27A2. A anfotericina B, cetoconazol e itraconazol foram diluídos, como descritos por este documento, e ressuspensos em RPMI 1640, com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio (Na_2HCO_3), tamponado para $\text{pH } 7,0 \pm 0,1$, em temperatura a 25 °C, com MOPS 0,165 mol/L (ácido 3-[N-morfolino]-propanossulfônico) (Sigma-Aldrich®), e testados em uma concentração variando de 0,01 - 16 $\mu\text{g/mL}$. O fluconazol, também ressuspensionado em RPMI 1640, foi testado em concentração variando de 0,06 - 64 $\mu\text{g/mL}$. Foram incluídos para cada isolado, poços de controle de crescimento e de esterilidade.

Para o preparo do inóculo foi realizado o repique, durante 48 horas, em temperatura ambiente, em meio inclinado de ágar Sabouraud com cloranfenicol, para assegurar sua pureza e viabilidade das culturas fúngicas. Logo após, foi retirado um inóculo, com garfo microbiológico, dos tubos de ensaios, e realizado uma suspensão em salina estéril a 0,85 %, preparado por turbidimetria, com volume ajustado para 5 mL, para que os blastoconídios ficassem em suspensão, obtendo uma suspensão-padrão da levedura de escala 0,5 de McFarland (10^5 UFC/mL), contendo, aproximadamente, 1×10^5 a 5×10^5 células por mililitros. A suspensão de trabalho foi diluída a 1:100, seguida por uma diluição a 1:20 da suspensão-padrão, com meio RPMI 1640, a fim de se obter uma concentração do inóculo de aproximadamente $2,5 \times 10^2$ a 5×10^3 UFC/mL, de acordo com o CLSI-M27A2.

Um poço da placa foi utilizado como controle negativo do crescimento, contendo 50 μL do meio sintético RPMI 1640, sem agente antifúngico, com 50 μL do inóculo preparado, para cada microrganismo testado, colocado no poço 12. A cepa padrão de *C. parapsilosis* ATCC 22019 (Sigma-Aldrich®) foi incluído como controle positivo para o método padronizado, numa placa separada.

Inicialmente, adicionaram-se 50 μL do meio RPMI a todos os 96 poços das placas de microdiluição. Dilui-se 50 μL da solução-auxiliar dos antifúngicos (de concentração final 64 $\mu\text{g/mL}$) com 50 μL do meio RPMI, ambos colocados no poço 01. Em seguida, retirou-se 50 μL da diluição anterior e misturou com 50 μL da suspensão-padrão do inóculo, no poço 01. A concentração inicial das drogas testadas foi de 16 $\mu\text{g/mL}$ no poço 01. Posteriormente foram feitas diluições seriadas até o 11º poço (50 μL do poço anterior + 50 μL de RPMI de cada poço). Os testes foram realizados em duplicata, a fim de garantir maior confiabilidade dos resultados.

Figura 01 - Realização do teste de sensibilidade a antifúngicos por microdiluição em placas de 96 poços.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As microplacas foram incubadas em estufa na temperatura 37 °C e seus resultados observados após 24 horas. Para a leitura dos resultados, o crescimento nos diferentes poços contendo o agente antifúngico e o inóculo recentemente preparado foi comparada, visualmente, com a quantidade de crescimento no poço do controle negativo de crescimento para cada levedura (sem o agente antifúngico), colocado no poço 12, e com o poço utilizado como controle positivo, contendo a cepa padrão de *C. parapsilosis* ATCC 22019.

Para os azólicos, cetoconazol, fluconazol e itraconazol, a CIM foi definida como a menor concentração da droga capaz de inibir 80 % do crescimento fúngico. Para a anfotericina B, a CIM foi definida como a menor concentração da droga na qual não houve crescimento fúngico visível, como definido pelo CLSI-M27A2.

4.11 Desfecho clínico dos pacientes

Os pacientes foram acompanhados periodicamente para descrever o desfecho clínico de cada um. Foram quantificados os pacientes que retornaram ao Centro Cirúrgico do HRN para a realização de novos procedimentos vasculares (desbridamentos e revascularizações). Quantificou-se também o número de pacientes que receberam alta hospitalar ou tiveram óbito relacionado ao pé diabético durante o período do estudo.

4.12 Análise Estatística dos Dados

Os dados coletados a partir do questionário estruturado (APÊNDICE A) foram inseridos e analisados em um banco de dados utilizando o programa computacional *Stata*[®] versão 12, um programa integrado, desenvolvido para uso por profissionais de saúde, usado para criar e analisar questionários de protocolos de pesquisa e aplicações em banco de dados e estatísticas gerais. Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) para verificar se houve significância estatística ($p < 0,05$) entre os dados obtidos através do questionário aplicado.

4.13 Estoque de Cepas Fúngicas

Após o término dos experimentos com as cepas, estas foram estocadas em solução salina estéril 0,9 % à -20°C , para formação de um banco de cepas para estudos posteriores.

4.14 Normas de Biossegurança

Os fungos isolados nesse estudo são pertencentes ao nível de biossegurança 2. Todas as condições físicas e equipamentos de proteção individual para a manipulação do fungo são atendidos no LAMP para a manipulação fúngica. Todo material contaminado foi autoclavado previamente ao descarte.

4.15 Aspectos Éticos

Para atender aos aspectos éticos da pesquisa envolvendo seres humanos e partindo da compreensão que para o desenvolvimento de estudos em saúde requer rigor metodológico e ético, esta pesquisa foi orientada conforme a Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde (CNS), que estabelece as normas e diretrizes de pesquisa em seres humanos. Foram obedecidos os princípios éticos do respeito pela pessoa (autonomia e proteção de grupos vulneráveis), beneficência, não maleficência, justiça e equidade. A pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa através da Plataforma Brasil (via *online*).

O presente trabalho recebeu aprovação através do parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, sob o número 1219760, estando, portanto, autorizado para a coleta de dados no Centro Cirúrgico do Hospital Regional Norte (ANEXO C). Posteriormente, foram incluídos apenas os pacientes que concordaram em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO B). Os dados obtidos foram utilizados exclusivamente para os fins da pesquisa e a identidade dos pacientes foi mantida em total sigilo. Este estudo não trouxe qualquer risco aos participantes.

5. RESULTADOS

5.1 Coleta de informações clínicas sobre o paciente diabético portador de úlceras nos pés

No período de setembro de 2015 a setembro de 2016, foram coletadas 154 amostras, de tecidos diferentes (tecido muscular, fragmento ósseo, medula óssea e tendão), de 77 pacientes, sendo 39 (50,65 %) mulheres e 38 (49,35 %) homens, no Centro Cirúrgico do Hospital Regional Norte (HRN). Apenas uma paciente, do gênero feminino, foi excluída do presente estudo devido à terapia oral com fluconazol para tratamento de candidemia vaginal.

Alguns pacientes foram coletados duas amostras, em períodos diferentes, devido a estes, semanalmente, retornarem ao Centro Cirúrgico do HRN, após a primeira cirurgia no pé, indicando o elevado número de cirurgias de desbridamento e, em casos mais severos, a amputação, consequência da falta de cuidados sanitários e de conhecimentos sobre o diabetes e suas complicações.

O quadro 04 mostra as informações pessoais e do histórico clínico dos pacientes portadores de úlceras no pé diabético.

Correlacionamos os parâmetros: gênero e o tipo de diabetes; hipertensão e o tipo de diabetes; tipo de diabetes com outras comorbidades (dislipidemia, doenças renais, presença de cardiopatias e doenças nas articulações); a localidade a qual moram os pacientes do estudo e o tipo de diabetes; a escolaridade e o tipo de diabetes, e não observamos significância estatística entre esses parâmetros analisados ($p > 0,05$).

Quadro 04 – Informações pessoais e do histórico clínico dos pacientes portadores de úlceras no pé diabético (continua)

GÊNERO	TIPO DE DIABETES	TEMPO QUE SABE DA DIABETES	DOENÇAS CONCOMITANTES	FAIXA ETÁRIA	TIPO DE ZONA QUE RESIDE	ESCOLARIDADE (MASCULINO E FEMININO)
FEMININO - 39 PACIENTES (50,65 %)	TIPO 1 - 11 PACIENTES (28,20 %)	1-10 ANOS - 04 PACIENTES (10,26 %)	NÃO - 04 PACIENTES (10,26 %)	31-40 ANOS - 01 PACIENTES (2,56 %)	ZONA RURAL - 22 PACIENTES (56,41 %)	SEM ESCOLARIDADE - 16 PACIENTES (41,02 %)
	TIPO 2 - 23 PACIENTES – (58,98 %)	11-20 ANOS - 06 PACIENTES (15,40 %)	SIM - 35 PACIENTES (89,74 %)	41- 50 ANOS - 06 PACIENTES (15,38 %)		ALFABETIZADO - 03 PACIENTES (7,69 %)
	NÃO SABE - 05 PACIENTES (12,82 %)	21-30 ANOS - 04 PACIENTES (10,25 %)	HIPERTENSÃO – 34 PACIENTES (97,14 %)	51-60 ANOS - 07 PACIENTES (15,95 %)		FUNDAMENTAL INCOMPLETO - 13 PACIENTES (33,34 %)
		ACIMA DE 30 ANOS - 02 PACIENTES (5,19 %)	DISLIPIDEMIA – 4 PACIENTES (11,43 %)	61-70 ANOS - 09 PACIENTES (23,08 %)		FUNDAMENTAL COMPLETO - 02 PACIENTES (5,13 %)
		NÃO SABE - 23 PACIENTES (58,97 %)	DOENÇAS RENAIIS – 2 PACIENTES (5,71 %)	71-80 ANOS - 09 PACIENTES (23,08 %)	ZONA URBANA - 17 PACIENTES (43,59 %)	ENSINO MÉDIO INCOMPLETO - 1 PACIENTE (2,56 %)
			CARDIOPATIA – 4 (11,43 %)	81-90 ANOS - 05 PACIENTES (12,82 %)		ENSINO MÉDIO COMPLETO - 01 PACIENTES (2,56 %)
			DOENÇAS NAS ARTICULAÇÕES – 2 PACIENTES (5,71 %)	ACIMA DE 90 ANOS - 02 PACIENTES (5,13 %)		SEM INFORMAÇÃO - 03 PACIENTES (7,69 %)

Quadro 04 – Informações pessoais e do histórico clínico dos pacientes portadores de úlceras no pé diabético (continuação).

GÊNERO	TIPO DE DIABETES	TEMPO QUE SABE DA DIABETES	DOENÇAS CONCOMITANTES	FAIXA ETÁRIA	TIPO DE ZONA QUE RESIDE	ESCOLARIDADE (MASCULINO E FEMININO)
MASCULINO - 38 PACIENTES (49,35 %)	TIPO 1 - 07 PACIENTES (18,42 %)	1-10 ANOS - 06 PACIENTES (15,79 %)	NÃO -12 PACIENTES (31,58 %)	31-40 ANOS - 02 PACIENTES (5,26 %)	ZONA RURAL - 11 PACIENTES (28,95 %)	SEM ESCOLARIDADE 18 (47,37 %)
	TIPO 2 - 23 PACIENTES (60,53 %)	11-20 ANOS - 02 PACIENTES (5,26 %)	SIM - 26 PACIENTES (68,42 %)	41- 50 ANOS - 05 PACIENTES (13,16 %)		ALFABETIZADO 05 (12,82 %)
	NÃO SABE - 08 PACIENTES (21,05 %)	21-30 ANOS - 02 PACIENTES (5,26 %)	HIPERTENSÃO – 25 PACIENTES (96,15 %)	51-60 ANOS - 08 PACIENTES (21,05 %)		FUNDAMENTAL INCOMPLETO 12 (31,58 %)
		ACIMA DE 30 ANOS - 02 PACIENTES (5,26 %)	DISLIPIDEMIA – 5 PACIENTES (19,23 %)	61-70 ANOS - 07 PACIENTES (18,42 %)		FUNDAMENTAL COMPLETO 01 (2,63 %)
		NÃO SABE - 26 PACIENTES (68,42 %)	DOENÇAS RENAIAS – 3 PACIENTES (11,54 %)	71-80 ANOS - 10 PACIENTES (26,32 %)	ZONA URBANA - 27 PACIENTES (71,05 %)	ENSINO MÉDIO INCOMPLETO NENHUM (0,0 %)
			CARDIOPATIA – 7 (26,92 %)	81-90 ANOS - 04 PACIENTES (10,53 %)		ENSINO MÉDIO COMPLETO 01 (2,63 %)
			DOENÇAS NAS ARTICULAÇÕES – 01 PACIENTE (3,85 %)	ACIMA DE 90 ANOS - 02 PACIENTES (5,26 %)		SEM INFORMAÇÃO 01 (2,63 %)

O quadro 05 mostra as informações sobre os parâmetros clínicos, bioquímicos e vasculares dos pacientes portadores de diabetes. Algumas informações que constam no Apêndice A não foram relacionadas no quadro abaixo, visto que a pesquisa foi realizada através da coleta de dados em prontuários, onde não conseguimos obter todos os dados necessários. Parâmetros importantes como a neuropatia periférica, glico-hemoglobina, glicemia pós-prandial e o estado de imunossupressão dos pacientes foram os dados ausentes no presente estudo.

Correlacionamos os parâmetros: glicemia de jejum (falta de controle glicêmico) com a presença de edema, necrose e infecção; a presença de doença vascular periférica com a presença de infecção, e não observamos diferença significativa entre esses parâmetros analisados ($p > 0,05$).

Quadro 05 – Informações sobre os parâmetros clínicos, bioquímicos e vasculares dos pacientes portadores de diabetes.

GLICEMIA DE JEJUM	DOENÇA VASCULAR PERIFÉRICA	CLASSIFICAÇÃO DA ÚLCERA DE PÉ	TRATAMENTO COM ANTIBACTERIA NOS	TRATAMENTO COM ANTIFÚNGICOS NAS ÚLTIMAS 04 SEMANAS	USO DE MEDICAMENTOS CONTÍNUOS
MENOR QUE 126 mg/dL – 10 PACIENTES (12,99 %)	SIM – 77 (100 %)	GRAU 0 – 02 (2,60 %)	SIM – 77 (100 %)	SIM – 01 (NÃO FOI COLETADA AMOSTRA)	SIM – 70 (90,90 %)
		GRAU 1 – 06 (7,80 %)			
MAIOR QUE 126 mg/dL – 54 PACIENTES (70,13 %)		GRAU 2 – 14 (18,18 %)			
	NÃO - NENHUM	GRAU 3 – 03 (3,90 %)	NÃO – NENHUM	NÃO – 77 (100 %)	NÃO – 07 (9,10 %)
NÃO INFORMADO - 13 PACIENTES (16,90 %)		GRAU 4 – 28 (36,36 %)			
		GRAU 5 – 24 (31,17 %)			

O quadro 06 mostra as informações sobre o pé do paciente portador de diabetes. O diagnóstico do pé diabético é essencialmente clínico, baseado nas condições anatômicas do mesmo. Informações como a presença de edema (inchaço ou rubor), infecção (através da formação de pus) e áreas necrosadas são fundamentais para este diagnóstico. Foram incluídas como informações relacionadas aos pés de pacientes diabéticos: presença de edema, necrose e infecção, localizada ou generalizada, e amputação, tanto ao nível dos pés (dedos e tecidos adjacentes), um pé ou ambos, e ao nível da perna ou ambas as pernas, mostrando a gravidade do diabetes e suas complicações vasculares nos membros inferiores.

Apenas duas pacientes (ZSM08 e AAL77) não apresentaram processo infeccioso e necrótico, porém tiveram episódios de amputação, devido o motivo da amputação ser por trombose e embolia, não havendo presença de lesão.

Correlacionamos os parâmetros: tipo de diabetes com a presença de edema, necrose e infecção; a presença de amputação com a falta controle glicêmico (glicemia de jejum), e não observamos diferença significativa entre esses parâmetros analisados ($p > 0,05$).

Quadro 06 – Informações sobre o pé do paciente portador de diabetes.

EDEMA	NECROSE	INFECÇÃO	AMPUTAÇÃO
NÃO – 33 (42,86 %)	NÃO – 02 (2,60 %)	NÃO – 02 (2,60 %)	NÃO – 23 (29,87 %)
SIM - 44 (57,14 %)	SIM – 75 (97,40 %)	SIM – 75 (97,40 %)	SIM – 54 (70,13 %)
DEDOS – 08 (18,18 %)	DEDOS – 14 (18,67 %)	DEDOS – 14 (18,67 %)	DEDOS – 23 (42,59 %)
PÉ – 23 (52,27 %)	PÉ – 44 (58,67 %)	PÉ – 44 (58,67 %)	PÉ – 13 (24,07 %)
AMBOS OS PÉS – 03 (6,82 %)	AMBOS OS PÉS – 03 (4,0 %)	AMBOS OS PÉS – 03 (4,0 %)	AMBOS OS PÉS – 02 (3,70 %)
PERNA – 08 (18,18 %)	PERNA – 13 (17,34 %)	PERNA – 13 (17,34 %)	PERNA – 12 (22,23 %)
AMBAS AS PERNAS – 02 (4,55 %)	AMBAS AS PERNAS – 01 (1,34 %)	AMBAS AS PERNAS – 01 (1,34 %)	AMBAS AS PERNAS – 04 (7,41 %)

O quadro 07 mostra as informações sobre os hábitos e autocuidados do paciente portador de diabetes. Como a prevenção é fator determinante para retardar ou evitar as complicações decorrentes do diabetes, a avaliação dos pés e o controle glicêmico são componentes essenciais na identificação de fatores modificáveis que poderão reduzir o risco de ulceração e amputação de membros inferiores, bem como melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

Correlacionamos os parâmetros: orientações quanto aos cuidados com os pés e a localidade a qual residiam os pacientes do estudo; orientações quanto aos cuidados com os pés e verificação diária dos pés; orientações quanto aos cuidados com os pés e a informação se os pacientes realizavam a secagem entre os dedos após o banho; orientações quanto aos cuidados com os pés e uso de cremes hidratantes diariamente, e não observamos diferença significativa entre esses parâmetros analisados ($p > 0,05$).

Quadro 07 – Informações sobre os hábitos e autocuidados do paciente portador de diabetes

JÁ RECEBEU ORIENTAÇÃO QUANTO AOS CUIDADOS COM OS PÉS ?	EXAMINA OS PÉS DIARIAMENTE ?	SECA ENTRE OS DEDOS APÓS O BANHO ?	USA CREMES PARA HIDRATAR OS PÉS DIARIAMENTE ?
SIM – 31 (40,26 %)	SIM – 35 (45,46 %)	SIM – 31 (40,26 %)	SIM – 39 (50,65 %)
NÃO – 46 (59,74 %)	NÃO – 42 (54,54 %)	NÃO – 46 (59,74 %)	NÃO – 38 (49,35 %)

5.2 Cultura fúngica de amostras biológicas de pacientes portadores de pé diabético

No presente estudo, foi utilizado um bisturi para coleta de tecidos profundos dos pacientes elegíveis ao estudo, confirmando que os achados fúngicos encontrados nesses locais são de origem patogênica.

As amostras foram encaminhadas à frio ao LAMP, e inoculadas em menos de 24 horas em placas de Petri, com auxílio da alça microbiológica, contendo o meio ágar Sabouraud com cloranfenicol. Posteriormente as amostras foram incubadas à 25 - 30 °C por até 02 dias para visualização do crescimento da espécie fúngica. Todas as amostras

cresceram no meio seletivo fúngico, indicando a presença de fungos em todas as amostras. A figura 02 ilustra a cultura da amostra no meio supracitado.

Figura 02 – Cultura de *Candida* spp. obtida a partir da amostra de tecidos profundos de pacientes diabéticos com úlceras nos pés inoculada no meio ágar Sabouraud com cloranfenicol.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em nosso estudo, observamos espécies de leveduras diferentes quanto ao aspecto macromorfológico, sendo realizados ensaios nas diferentes cepas identificadas. Quatro amostras, a RPMA129, JER86, NQP17 e MCP67, tiveram o crescimento de mais de uma colônia, característica de *Candida* spp. de diferentes espécies, no meio Sabouraud com cloranfenicol, sendo, portanto, inoculadas em dois tubos de ensaios separadamente, cada amostra, contendo o meio ágar batata dextrose, gerando, respectivamente, as amostras RPMA129a e RPMA129b, JER86a e JER86b, NQP17a e NQP17b, e MCP67a e MCP67b.

No procedimento laboratorial seguinte, as amostras foram retiradas da geladeira e repicadas novamente em tubos contendo o meio Sabouraud com cloranfenicol, pois o meio ágar batata dextrose não se configura como um meio seletivo, a fim de purificar as amostras acondicionadas e isentar contaminantes fúngicos filamentosos e bacterianos, além de utilizar cepas fúngicas em crescimento ativo em 48 horas.

Esperou-se 02 dias para o crescimento fúngico das espécies de *Candida*. Todas as amostras cresceram dentro do prazo estabelecido, porém algumas foram descartadas, pois seu crescimento não foi característico de *Candida* spp., indicando possivelmente contaminação por fungos filamentosos ou por bactérias.

Das 154 amostras coletadas, 108 (70,13 %) amostras apresentaram, após o repique, o aspecto macromorfológico fúngico leveduriforme, e 46 (29,87 %) amostras que crescerem foram descartadas, devido seu crescimento no tubo de ensaio não ser característico de *Candida* spp., possivelmente sendo contaminantes fúngicos filamentosos ou bacterianos. Posteriormente, das 108 amostras, com crescimento macromorfológico leveduriforme, foram feitas a técnica de coloração do Gram.

Os tubos que continham espécies fúngicas com características morfo-tinturiais de Gram negativas ou que não se coravam pela técnica de coloração de Gram foram descartados, autoclavados e lavados, para posterior reutilização (No total, 11 tubos [10,18 %] das 108 amostras com coloração Gram negativa característica ou que não se coravam pela técnica de coloração de Gram).

Os tubos que continham espécies fúngicas com características morfo-tinturiais de Gram positivas, de coloração azul a roxo intenso, sendo indicativo de leveduras, foram armazenados (No total, 97 tubos [89,82 %] das 108 amostras com crescimento macromorfológico leveduriforme característico e coloração Gram positiva). A figura 03 ilustra a amostra do pé diabético quando corada pela técnica de coloração de Gram.

Figura 03 – Ilustração das leveduras apresentando características morfo-tinturiais de Gram positivas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3 Isolamento e identificação das espécies de *Candida* presentes em úlceras do pé diabético

A etapa subsequente, com as 97 amostras remanescentes, foi feita a realização do microcultivo, em placas de Petri estéreis, no meio ágar fubá acrescido de tween 80, na concentração de 1 %.

Em paralelo ao microcultivo, as amostras com aspectos macromorfológico leveduriforme e Gram positivas, foram cultivadas, em placas de Petri estéreis, no meio cromogênico ágar HiCrome *Candida* diferencial®.

As etapas do microcultivo e meio cromogênico são complementares, a fim de promover um diagnóstico micológico mais preciso. As figuras 04 e 05 ilustram a visualização do microcultivo no meio ágar fubá adicionado de tween 80 e no meio cromogênico, respectivamente.

Figura 04 – Visualização do microcultivo no meio ágar fubá adicionado de tween 80, na concentração de 1 %.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 05 – Inoculação das amostras do estudo no meio ágar HiCrome *Candida* diferencial®. A figura ilustra uma amostra de *C. albicans*, com sua coloração característica esverdeada no meio cromogênico.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O quadro 08 contém os resultados das etapas de microcultivo e cromoágar realizados neste estudo. Identificamos que as espécies de *Candida* não *albicans*, com destaque para *C. tropicalis*, foram mais prevalentes que *Candida albicans*.

Quadro 08 – Informações quantitativas e percentuais dos resultados do microcultivo e cromoágar das espécies de *Candida* isoladas e identificadas neste estudo.

ESPÉCIES DE <i>Candida</i>	QUANTIDADE DE AMOSTRAS (%)
<i>Candida albicans</i>	33 (34,02)
<i>Candida tropicalis</i>	43 (44,33)
<i>Candida parapsilosis</i>	20 (20,62)
<i>Candida krusei</i>	1 (1,03)

5.4 Identificação das bactérias presentes em úlceras do pé diabético

No presente trabalho, dos 77 pacientes elencados para o presente estudo, foram realizadas 62 culturas pelo referido laboratório, sendo identificadas 155 espécies de microrganismos, onde 151 foram bactérias, em que as Gram negativas foram as mais

prevalentes (99/151 – 65,56 %) e as bactérias Gram positivas em menor prevalência (52/151 – 34,44 %). O resultado encontra-se no quadro 09.

As outras 04 amostras identificadas, pelo laboratório terceirizado, foram leveduras do gênero *Candida* spp., de 2 espécies diferentes, sendo três culturas de *C.tropicalis* e uma cultura de *C.albicans*.

Correlacionamos a presença de infecção bacteriana com a presença de infecção fúngica, e não observamos diferença significativa entre esses dois parâmetros analisados ($p > 0,05$).

Quadro 09 – Informações quantitativas e percentuais da identificação das bactérias em úlceras do pé diabético.

ESPÉCIES DE BACTÉRIAS	QUANTIDADE DE AMOSTRAS (%)
GRAM NEGATIVAS	-
<i>P. aeruginosa</i>	21 (21,21)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17 (17,17)
<i>Proteus mirabilis</i>	14 (14,14)
<i>Morganella morganii</i>	13 (13,13)
<i>E. coli</i>	13 (13,13)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	7 (7,07)
<i>Enterobacter cloacae</i>	6 (6,06)
<i>Serratia</i> spp.	5 (5,05)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2 (2,02)
<i>Citrobacter koseri</i>	1 (1,01)
GRAM POSITIVAS	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	22 (42,30)
<i>S. aureus</i>	24 (46,16)
<i>Streptococcus agalactiae</i> (grupo B)	6 (11,54)

5.5 Teste de sensibilidade de *Candida albicans* aos antifúngicos

Neste estudo, para os testes de sensibilidade de *C. albicans*, os antifúngicos utilizados foram a anfotericina B, cetoconazol, fluconazol e o itraconazol. Para o CLSI-M27A2, o método de diluição em caldo é o de referência para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fungos, com uma reprodutibilidade intra e interlaboratorial acima de 90 %.

Em nosso estudo, observamos que as espécies de *C. tropicalis* foram as mais prevalentes. Porém, o teste de sensibilidade foi aplicado apenas para amostras identificadas e isoladas de *C. albicans*, devido estas ser as mais estudadas que outras espécies de *Candida*. O quadro 10 apresenta os resultados do teste de sensibilidade aos antifúngicos para cepas de *C. albicans* isoladas e identificadas deste estudo.

Excepcionalmente o cetoconazol foi testado em concentrações finais (V_2) decrescentes, pois sua CIM inicial, de 64 $\mu\text{g/mL}$, não houve crescimento fúngico visível em todas as amostras, como descrito no CLSI-M27A2, indicando um elevado grau de sensibilidade das amostras.

Para as amostras RBS03, APC47, NQP17A, RBS04, JBRN34, ENF18, OSG63 e FAS29 foram utilizadas a concentração final (C_2) de 64 $\mu\text{g/mL}$; para as amostras ZSM08, NVS20, JTF145, NVS44, BRRS50, BRRS53, FCA48 e EHV90 foram utilizadas a concentração final (C_2) de 32 $\mu\text{g/mL}$; para as amostras ENF15, ARS16A, MLS25, RNAR23 e ARS16B foram utilizadas a concentração final (C_2) de 16 $\mu\text{g/mL}$; para a concentração final (C_2) de 8 $\mu\text{g/mL}$ não houve crescimento fúngico visível de nenhuma amostra, sendo realizada na concentração final decrescente seguinte (4 $\mu\text{g/mL}$); por fim, para as amostras ARS42, RHO68, ELS149, JBRN33, MLA07, GVA57, JER86B, EFS06, JLC46, MLS24, FAS123 e AEC93 foram utilizadas a concentração final (C_2) de 4 $\mu\text{g/mL}$.

Quadro 10 - Concentração inibitória mínima (CIM) de Anfotericina B, Cetoconazol, Fluconazol, e Itraconazol, de *Candida albicans* isoladas de pacientes diabéticos.

	CIM ($\mu\text{g/mL}$)			
	ANFOTERICINA B	CETOCONAZOL	FLUCONAZOL	ITRACONAZOL
<i>C. albicans</i>	0,125 (1) ^a	0,03125 (5)	1 (6)	0,125 (6)
		0,0078125 (11)	2 (8)	1 (6)
	0,25 (5)	0,125 (4)	4 (7)	0,0625 (7)
		0,015625 (3)	8 (2)	
	0,5 (14)	0,0039062 (7)	0,25 (2)	0,03125 (13)
		0,25 (1)		
	1 (13)	0,0009765 (1)	0,5 (8)	0,5 (1)
		0,0004883 (1)		
Cepa Padrão <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	1 (1)	0,015625 (1)	16 (1)	0,125 (1)

^a número de isolados para a CIM indicada.

5.6 Desfecho clínico dos pacientes diabéticos portadores de úlceras nos pés

O quadro 11 mostra as informações sobre os exames de cultura, recidivas (desbridamentos), revascularizações, altas e óbitos dos pacientes portadores de diabetes.

Nesta pesquisa, dos 77 pacientes internados no Centro Cirúrgico do HRN, 62 exames de cultura foram realizados pelo hospital. Não foi encontrada uma justificativa plausível porque os outros 15 pacientes não foram solicitados exames de cultura, visto que, em todos eles tinham claro processo infeccioso e necrótico.

Muitos pacientes retornaram ao Centro Cirúrgico para realizar a limpeza das feridas infectadas (desbridamentos). Neste estudo, 75 (97,40 %) pacientes retornaram para sala de cirurgia para realização da cirurgia de desbridamento, sendo indicativo de falta de cuidados sanitários com os próprios pés.

Em procedimentos de revascularização, o médico vascular tenta aumentar o fluxo arterial na extremidade dos membros inferiores, onde este se encontra diminuído devido à doença vascular periférica, sendo uma medida de última escolha antes da amputação. No presente estudo, em 16 pacientes (20,78 %), foi realizado o procedimento cirúrgico de revascularização.

Para os critérios de alta ou óbito do paciente, levou-se em consideração apenas o período do estudo, ou seja, foi feito um levantamento desse dado apenas dos pacientes no período de setembro de 2015 a setembro de 2016, selecionados para o estudo. Dos 77 pacientes elegíveis para o estudo, 54 (70,13 %) obtiveram alta hospitalar, 11 (14,29 %) foram a óbito, devido às complicações do pé diabético, e 12 (15,58 %) não continham a informação se alta ou óbito no prontuário, sendo outro parâmetro ausente neste estudo.

Correlacionamos a presença de infecção com os resultados dos exames de culturas dos pacientes do hospital; a realização de cirurgias de desbridamentos com a presença de infecção e a falta de controle glicêmico; a realização da cirurgia de revascularização com a presença de infecção e a falta de controle glicêmico; a alta hospitalar do paciente com a presença de infecção e a falta de controle glicêmico; o óbito do paciente com a presença de infecção e a falta de controle glicêmico, e não observamos diferença significativa entre esses parâmetros analisados ($p > 0,05$).

Quadro 11 - Informações sobre os exames de cultura, recidivas, revascularizações, altas e óbitos dos pacientes portadores de diabetes.

			DESFECHO CLÍNICO DO PACIENTE		
EXAMES DE CULTURA	DESBRIDAMENTOS	REVASCULARIZAÇÃO	ALTA	ÓBITO	NÃO INFORMADO
SIM – 62 (80, 52 %)	SIM – 75 (97,40 %)	SIM – 16 (20,78 %)	54 (70,13 %)	11 (14,29 %)	12 (15,58 %)
NÃO – 15 (19,48 %)	NÃO – 02 (2,60 %)	NÃO – 61 (79,22 %)			

6 DISCUSSÃO

Dos pacientes elegíveis para o presente estudo, 38 pacientes eram do gênero masculino (49,35 %) e 39 pacientes era do gênero feminino (50,65 %). Nos resultados de Carvalho *et al.* (2004), obtiveram um total de 141 pacientes, sendo 77 (54,61 %) do gênero masculino e 64 (45,39 %) do gênero feminino, se assemelhando percentualmente com os resultados da presente pesquisa. Parada *et al.* (2013), avaliaram 163 pacientes com diabetes, sendo 99 (60,70 %) do gênero masculino e 64 (39,30 %) do gênero feminino, sendo a doença significativamente correlacionada com a idade e o gênero masculino ($p < 0,05$). Nos resultados de Hefni *et al.* (2012), de 75 pacientes avaliados, 51 % eram do gênero feminino e 49 % eram do gênero masculino, se assemelhando a este estudo no total da amostragem e porcentagem. No estudo de Papini *et al.* (2013), de 75 pacientes avaliados, 69,34 % eram do gênero masculino e 30,66 % eram do gênero feminino. Resultados do estudo de Hadadi *et al.* (2014), dos 196 pacientes diabéticos avaliados, 113 pacientes eram do gênero masculino (57,65 %) e 83 pacientes eram do gênero feminino (42,34 %). Nair *et al.* (2006-2007), estudaram 74 pacientes diabéticos, destes, 66,22 % eram do gênero masculino e 33,78 % eram do gênero feminino. No estudo de Fata *et al.* (2010), dos 120 pacientes avaliados, 71,60 % eram do gênero masculino e 28,40 % eram do gênero feminino, apontando como justificativa, fatores relacionados ao estilo de vida, práticas desportivas e atividade profissional. Segundo os resultados de Vidal (2009), observou-se a predominância do gênero masculino (53,70 %) entre os pacientes avaliados. Papini *et al.* (2013) atribuíram ao gênero masculino como fator predisponente para infecções microbianas em úlceras do pé. Chellan *et al.* (2010), estudaram 518 pacientes portadores de diabetes, sendo 382 (73,70 %) do gênero masculino e 136 (26,30 %) do gênero feminino. Mlinaric-Missoni *et al.* (2005), selecionaram 22 pacientes em seu estudo, sendo 13 do gênero masculino (59,10 %) e 09 do gênero feminino (40,90 %).

Ser do gênero masculino tem sido associado com maior risco de desenvolvimento de úlcera no pé. O mecanismo pelo qual o homem apresenta maior risco de ulceração ainda não é claro, sendo este fato questionado por alguns autores (CONSENSO INTERNACIONAL SOBRE PÉ DIABÉTICO, 2001). A razão para essa diferença merece investigações futuras. Segundo Vilar (2013, p. 768), com relação ao gênero, embora vários estudos demonstrem maior frequência de lesões referente ao pé diabético entre indivíduos masculinos, tais resultados são considerados inconsistentes.

Neste estudo, o tipo de diabetes mais prevalente foi o diabetes *mellitus* tipo 2, tanto entre homens, notificado em 23 pacientes (60,53 %), como em mulheres, notificado em 23 pacientes (58,97 %). Em nosso estudo, correlacionamos o gênero e o tipo de diabetes, e não observamos diferença estatística entre esses dois parâmetros analisados ($p = 0,4647$). Segundo Gross *et al.* (2002), o diabetes tipo 2 é mais comum do que o tipo 1, perfazendo cerca de 90 % dos casos. Mlinaric-Missoni *et al.* (2005), identificaram que 22,70 % da amostra de seu estudo foram de pacientes com diabetes tipo 1 e 77,30 % da amostra foram de pacientes com diabetes tipo 2. Hadadi *et al.* (2014), identificaram que 17,34 % dos pacientes tinham DM tipo 1 e 82,65 % dos pacientes tinham DM tipo 2. Nos resultados de Nair *et al.* (2006-2007), dos 74 avaliados em seu estudo, todos eram diabéticos tipo 2. No estudo de Papini *et al.* (2013), de 75 pacientes avaliados, apenas 4 eram DM tipo 1. Fata *et al.* (2010), notificaram em seu estudo que 93,90 % dos pacientes eram diabéticos tipo 2, ao passo que 6,10 % eram diabéticos tipo 1 e todas as infecções fúngicas foram identificadas em diabéticos tipo 2. Parada *et al.* (2013), identificaram em seu estudo que 7,4 % dos pacientes tinham DM tipo 1, enquanto que 88,34 % tinham DM tipo 2 e 4,30 % não conhecia qual o tipo de diabetes. No estudo de Vidal (2009), todos os pacientes avaliados foram diagnosticados com DM tipo 2, não havendo na amostra pacientes diagnosticados com DM tipo 1. Os problemas relacionados com o pé diabético ocorrem tanto na diabetes tipo 1 como tipo 2, este em maior quantidade, e são mais frequentes no gênero masculino (DUARTE; GONÇALVES, 2011). Não se sabe ainda se o tipo de DM influencia na existência de úlcera nos pés, porém observa-se que a maioria das úlceras e amputações ocorrem em pacientes com DM tipo 2 (VIDAL, 2009).

No presente estudo, um parâmetro importante a se destacar no contexto anterior foi que 13 pacientes, entre homens e mulheres, desconheciam o tipo da diabetes. Como esses pacientes desconheciam o tipo da doença, consequentemente desconheciam a forma de tratamento, o melhor diagnóstico e os cuidados com os pés, para evitar traumas, necrose e infecções. Segundo Carvalho *et al.* (2004), 35 % dos pacientes entrevistados disseram desconhecer o tipo de diabetes, bem como a origem da lesão, e muitas vezes não sabiam precisar o tempo de evolução da mesma. Aliada à questão da provável existência de neuropatia, existe também a rejeição e o desconhecimento do paciente com relação à doença e aos cuidados relativos aos pés.

Com relação ao tempo de diagnóstico em que os pacientes sabiam sobre a doença, a amostra deste estudo foi categorizada em intervalos de 10 anos. Para o gênero

feminino, 15,40 % das pacientes apresentaram tempo de diagnóstico entre 11 a 20 anos. No gênero masculino, 15,79 % dos pacientes apresentaram tempo de diagnóstico entre 1 a 10 anos. O tempo de duração do DM é um ponto indicativo de gravidade e surgimento de úlceras nos pés. O aparecimento de lesões de membros inferiores dentro de um tempo médio de duração da doença vai de 11 a 20 anos (CARVALHO *et al.*, 2004). Mlinaric-Missoni *et al.* (2005), notificaram que a média para o diagnóstico da doença, em seu estudo, foi de 11,3 anos. A ADA (2009) refere que o risco de úlceras ou amputações aumenta em pessoas com tempo de diagnósticos de DM acima de 10 anos, sendo esta informação encontrada no presente estudo. Vidal (2009) encontrou um tempo médio de 11 anos de diagnóstico da doença e pacientes com tempo de diagnóstico de DM acima de 08 anos apresentaram risco de 1,2 vezes mais de desenvolverem úlceras nos pés quando comparados com pacientes com tempo de diagnóstico inferior a 08 anos. No estudo de Carvalho *et al.* (2004), 63,8 % dos pacientes conheciam o tempo de diagnóstico da doença, tanto do gênero masculino como do feminino, que era de 1 a 10 anos. Na pesquisa de Vidal (2009), a amostra foi categorizada em intervalos de 10 anos de tempo de diagnóstico, semelhante a este estudo, e o tempo médio de conhecimento da doença foi de 8,5 anos. Alguns autores relatam o aparecimento de lesões em membros inferiores de pacientes com DM, dentro de um tempo médio de diagnóstico da doença que vai de 11 a 20 anos (MLINARIC-MISSONI *et al.*, 2005; CHELLAN *et al.*, 2010; FATA *et al.*, 2010). É importante salientar que o risco de ulceração e amputação aumenta proporcionalmente com a idade e com o tempo de diagnóstico do DM, estando altamente correlacionadas (VIDAL, 2009).

São preocupantes os pacientes que desconheciam esse tempo, no total de 49 pacientes, sendo 26 homens (68,42 %) e 23 mulheres (58,97 %). Para Gross *et al.* (2002), cerca de 50 % dos portadores de diabetes desconhecem o diagnóstico. Segundo Vilar (2013), essa preocupação sobre o desconhecimento do tempo de diagnóstico se deve em fato de que 30 a 50 % dos diabéticos, principalmente o tipo 2, serem assintomáticos ou oligossintomáticos e terem o diagnóstico da doença realizado tardiamente.

Nesta pesquisa, foram coletadas em prontuários, as informações sobre a presença de outras comorbidades. Dentre os fatores de risco mais relevantes para o desenvolvimento do diabetes, principalmente o tipo 2, estão a obesidade, sobretudo a abdominal, o tabagismo e as doenças associadas ao diabetes, sendo, no presente estudo, a hipertensão arterial sistêmica (HAS) de maior percentual associado ao diabetes, com 34 dos 35 pacientes femininos (97,14 %), diagnosticadas com pressão arterial elevada, e 25 dos 26

pacientes masculinos (96,15 %), diagnosticados com pressão arterial elevada. Em nosso estudo, correlacionamos a hipertensão e o tipo de diabetes, e não observamos diferença significativa entre esses dois parâmetros analisados ($p = 0,7708$). Segundo Vilar (2013), a hipertensão apresenta-se 1,5 a 3 vezes mais frequente em indivíduos diabéticos do que na população em geral. A presença de HAS em diabéticos implica em risco elevado para complicações microvasculares (retinopatia, nefropatia e, possivelmente, neuropatia diabética) e macrovasculares (acidente vascular cerebral, doença arterial coronariana e doença vascular periférica), bem como incremento na taxa de mortalidade. Nos pacientes com DM tipo 2, o controle pressórico adequado pode ser tão ou mais benéfico do que o controle glicêmico, principalmente em relação à prevenção de doenças cardiovasculares. Portanto, a HAS deve ser sempre controlada em pacientes diabéticos. Segundo Vidal (2009), as complicações crônicas do DM são as principais responsáveis pela morbidade e mortalidade dos pacientes diabéticos.

A hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia e o tabagismo estão entre os fatores envolvidos na etiologia das complicações crônicas. Em nosso estudo, também correlacionamos o tipo de diabetes com outras comorbidades, tais como a dislipidemia, doenças renais, presença de cardiopatias e doenças nas articulações, onde não observamos diferença estatística entre esses cinco parâmetros avaliados ($p = 0,2762$, $p = 0,1438$, $p = 0,9970$, $p = 0,6549$, respectivamente). Para Vidal (2009), pacientes diabéticos tipo 2 apresentam risco 4 vezes maior de mortalidade por doença cardíaca quando comparados com pacientes não diabéticos. Esse achado é devido à própria diabetes e a presença de outros fatores de risco cardiovasculares, como obesidade, HAS e dislipidemia, sendo estas, apresentando também risco 4 vezes maior de acidente vascular cerebral (AVC) e a aterosclerose periférica, onde esta responde também como uma das principais causas de amputação não traumática em membros inferiores desses pacientes. Ainda nos resultados de Vidal (2009), dentre as comorbidades, a HAS apresentou prevalência de 91,3 % em pacientes diabéticos; dislipidemia, 41,3 %; AVC, 37,2 %; e cardiopatia, 29,8 %. Para Singh *et al.* (2013), as comorbidades, como a hipertensão e a dislipidemia, que predisõem à oclusão vascular, devem ser tratado com urgência em pacientes diabéticos. Portanto, níveis de HAS elevados implicam no aumento do risco de complicações macro e microvasculares quando associada ao diabetes, assim como a elevação da taxa de mortalidade em duas vezes quando comparada à população não diabética.

O diabetes tipo 2 é diagnosticado após os 40 anos de idade e maioria dos pacientes é obesa (VILAR, 2013; VIDAL, 2009). No presente estudo, no gênero feminino, a maior faixa etária foi entre 61 a 70 anos e 71 a 80 anos (ambas com 09 pacientes – 23,08 %), e no gênero masculino, a maior faixa etária foi entre 71 a 80 anos (10 pacientes – 26,32 %), sendo, ambos os resultados compatíveis com os achados na literatura e correspondentes às idades com maior frequência de distúrbios nos pés (MLINARIC-MISSONI *et al.*, 2005; NAIR *et al.*, 2006-2007; FATA *et al.*, 2010). Na pesquisa de Vidal (2009), a idade foi categorizada em faixas etárias com intervalo de 10 anos, onde o presente trabalho foi semelhante ao estudo anterior. Nos resultados de Mlinaric-Missoni *et al.* (2005), encontraram que a média de idade dos pacientes diabéticos com ulcerações foi de 67,10 anos. Hadadi *et al.* (2014), recrutaram 196 pacientes, e apresentaram média de idade de 60,84 anos. No estudo de Nair *et al.* (2006-2007), os pacientes avaliados continham entre 48 a 69 anos de idade. Nos resultados de Fata *et al.* (2010), a média de idade dos pacientes com ulcerações foi de 57,5 anos, com faixa etária predominante maior ou igual a 60 anos de idade (46,60 %), se assemelhando aos resultados do presente estudo. Segundo Gross *et al.* (2002), a idade de início do diabetes tipo 2 é variável, embora seja mais frequente após os 40 anos de idade, com pico de incidência por volta dos 60 anos, já o tipo 1 é diagnosticado após 15 a 20 anos de idade. Nos resultados de Carvalho *et al.* (2004), mais da metade dos pacientes que realizaram desbridamentos ou amputações estava na faixa etária de 50 a 70 anos. Segundo Vidal (2009), a média da faixa etária foi de 63 anos, com idade mínima de 31 anos e máxima de 88 anos, para o aparecimento de úlceras calcâneas. Ainda no estudo de Vidal (2009), todos os pacientes do referido estudo tiveram o diagnóstico de DM tipo 2 após os 40 anos de idade. Esses dados estão de acordo com a literatura, que indica que o acometimento do DM tipo 2 é diagnosticado após os 40 anos de idade, tendo uma maior incidência na sexta década de vida. A idade exerce importante influência, como também está relacionada com a maior probabilidade de amputação, sendo um agravante onde os pacientes diabéticos precisam ter um maior cuidado (SBD, 2008; VIDAL, 2009).

O tipo de zona ou cidade na qual reside o paciente influencia decisivamente no desfecho clínico da doença. Pacientes que residem em zonas rurais possuem menor conhecimento sobre a doença, forma de tratamento, bem como acesso a uma melhor condição de saúde e saneamento básico. Nesta pesquisa, no gênero feminino, 22 pacientes (56,41 %) residiam em zonas rurais. Do contrário, no gênero masculino, apenas 11 pacientes (28,95 %) residiam em zonas rurais. Em nosso estudo, correlacionamos a localidade a qual

moravam os pacientes do estudo e o tipo de diabetes, e não observamos significância estatística entre esses dois parâmetros analisados ($p = 0,3358$). Hadadi *et al.* (2014), relacionaram o desfecho clínico do paciente e suas características demográficas, história de hospitalização e duração do diabetes *mellitus*, encontrando que pacientes que residiam em áreas ou sítios distantes dos centros urbanos apresentaram maior incidência de procedimentos vasculares. O estudo anterior concluiu que os pacientes os quais residem em regiões ou cidades onde não possuem unidades básicas de saúde são mais susceptíveis a infecções e, conseqüentemente, amputações, devido à falta de conhecimentos sobre o diabetes e suas complicações.

Com relação à escolaridade, quanto menor o nível desse indicador no paciente diabético, maior o grau de desconhecimento sobre a doença e suas complicações. A avaliação proposta neste estudo é a utilizada pelos profissionais da assistência social do HRN, sendo categorizada em: sem escolaridade, alfabetizado, fundamental completo, fundamental incompleto, ensino médio completo, ensino médio incompleto e sem essa informação. Dos 77 pacientes selecionados para esta pesquisa, 34 afirmaram ser analfabetos ou não ter nenhum grau de escolaridade, 08 afirmaram ser alfabetizados, porém não souberam responder qual o nível de sua escolaridade, e 25 afirmaram ter apenas o ensino fundamental incompleto, apenas 03 tinham o ensino fundamental completo, 01 tinha o ensino médio incompleto, 02 tinham o ensino médio completo, e 04 pacientes não continha essa informação nos prontuários. Em nosso estudo, correlacionamos a escolaridade e o tipo de diabetes, e não observamos significância estatística entre esses dois parâmetros analisados ($p = 0,3916$). No estudo realizado por Carvalho *et al.* (2004), realizado na favela Serviluz em Fortaleza, em pacientes com infecção nos pés, relataram o achado não esperado de enterobactérias nas lesões desses pacientes e correlacionaram com a falta de escolaridade e das condições de higiene do grupo estudado. O dado da escolaridade é um indicador de grande importância para o profissional de saúde na utilização de instrumentos que visam informar, educar e ajudar o paciente a incorporar medidas de autocuidado. A literatura sugere que a baixa escolaridade é um fator difícil no aprendizado quanto aos cuidados com a saúde, seja no monitoramento da glicemia ou cuidados com os pés (VIDAL, 2009).

A glicemia de jejum representa o meio mais prático de avaliar o *status* glicêmico dos pacientes, e dois valores superiores ou iguais a 126 mg/dL, obtidos em dias diferentes, são suficientes para estabelecer o diagnóstico de diabetes *mellitus*. Níveis entre 100 e 126 mg/dL caracterizam a glicemia de jejum alterada, em que os pacientes devem ser submetidos

a um teste oral de tolerância à glicose (TOTG) (VILAR, 2013). Segundo a *American Diabetes Association* (ADA) (2001), a medida apenas da glicose plasmática de jejum é considerada o método de escolha para o diagnóstico do diabetes e o teste oral de tolerância à glicose não deveria ser utilizado rotineiramente, apenas em algumas situações clínicas ou para fins de pesquisa. O HRN realiza nos pacientes diabéticos a avaliação da glicemia ao longo do dia, a cada 6 horas, que é uma estratégia importante para se obter o melhor controle glicêmico possível do paciente. Usualmente, esta avaliação é realizada através da obtenção de sangue capilar e colocação em fitas reagentes acopladas a aparelhos que fornecem os resultados em poucos segundos. Observou-se, no presente estudo, que 54 pacientes (70,13 %) apresentavam glicemia de jejum acima do valor de referência, indicativo da falta de cuidados e conhecimentos por parte desses pacientes do estudo em relação à doença, e 13 pacientes (16,88 %) não apresentavam em seus prontuários a informação da glicemia de jejum, sendo um parâmetro subnotificado. Em nosso estudo, correlacionamos a glicemia de jejum (falta de controle glicêmico) com a presença de edema, necrose e infecção, e não observamos diferença estatística entre esses quatro parâmetros analisados ($p = 0,9759$, $p = 0,2431$ e $p = 0,0741$, respectivamente). A glicose plasmática de jejum é mais econômica, de fácil execução, favorecendo a realização da glicemia em um maior número de pessoas e apresenta um menor coeficiente de variação interindividual do que o TOTG (ADA, 2001). Nos resultados de Hefni *et al.* (2012), de 75 pacientes avaliados, 56 % apresentaram falta de controle da glicemia de jejum. No estudo de Parada *et al.* (2013), notificaram em 55,3 % dos pacientes diabéticos não apresentavam o controle glicêmico adequado, apresentando maior prevalência às infecções, quando comparados com aqueles com níveis controlados da glicemia (apenas 12,5 % dos pacientes). Segundo Gross *et al.* (2002), de maneira geral, os aparelhos de leitura glicêmica são bastante acurados com um coeficiente de variação abaixo de 5 %. Nos resultados de Fata *et al.* (2010), a maioria dos pacientes tinha glicemia não controlada, aumentando o risco de desenvolvimento de infecções e complicações nos pés. No estudo de Lee *et al.* (2014), mostraram correlação significativa entre a infecção fúngica, o gênero do paciente, a idade avançada e o menor controle da glicemia ($p < 0,05$), diferente significativamente de nosso estudo ($p > 0,05$). Para Chellan *et al.* (2010), pacientes com controle glicêmico inadequado apresentaram significativamente maior prevalência de desenvolver infecção fúngica ($p < 0,05$), diferente significativamente de nosso estudo ($p > 0,05$).

Com relação à doença vascular periférica (DVP), no HRN, o exame era realizado clinicamente, onde o médico vascular observava o aspecto dos pés dos pacientes, quanto à presença de processo inflamatório, necrose, infecção, edema, lesões nos dedos, calcanhares, espaços interdigitais e amputações prévias. Todos os pacientes do presente estudo apresentavam complicações nos pés, sendo realizados procedimentos cirúrgicos vasculares uma ou mais vezes. Em nosso estudo, correlacionamos a presença de doença vascular periférica com a presença de infecção, e não observamos diferença significativa entre esses dois parâmetros analisados ($p = 0,3356$). Segundo os resultados de Vidal (2009), as variáveis da neuropatia, doença vascular periférica e deformidade tiveram associação com o desenvolvimento de úlcera, onde a presença de DVP mostrou ser significativa para o desenvolvimento de úlcera ($p < 0,05$). No mesmo estudo, 59,8 % dos pacientes apresentam algum tipo de deformidade nos pés, e os pacientes diabéticos com diagnóstico de DVP apresentaram risco de 2,9 vezes de desenvolverem úlcera no pé quando comparados com pacientes diabéticos sem diagnóstico de DVP. A DVP raramente leva à ulceração do pé diretamente, porém, uma vez que a úlcera se desenvolve, a presença de DVP retarda a cicatrização, elevando o risco de amputação (VIDAL, 2009). No estudo de Mlinaric-Missoni *et al.* (2005), a doença vascular periférica estava presente em 18 pacientes dos 22 pacientes diabéticos selecionados em seu estudo (81,81 %). No estudo de Hefni *et al.* (2012), de 75 pacientes avaliados, 73,30 % tinham algum tipo de doença vascular periférica. Nos resultados de Fata *et al.* (2010), 90 % dos pacientes continham algum tipo de doença vascular (úlceras, lesões e infecção) nos membros inferiores. Resultados de Parada *et al.* (2013), 78 (48,40 %) pacientes apresentavam algum tipo de doença vascular periférica e 27 (15,50 %) pacientes desconheciam a origem desse tipo de dano.

Sabendo que a úlcera é a porta de entrada para o início de um processo infeccioso no pé diabético, viu-se a necessidade de classificá-la quanto à sua gravidade. Os clínicos e cirurgiões do HRN não utilizavam nenhum tipo de classificação para o pé diabético. A classificação foi feita pelo próprio autor, baseado na mais aceita e utilizada na literatura, a Classificação de Wagner (1981). Semelhante ao estudo de Carvalho *et al.* (2004), Mlinaric-Missoni *et al.* (2005), Duarte e Gonçalves (2011), Hefni *et al.* (2012), Singh *et al.* (2013) e Hadadi *et al.* (2014), a classificação utilizada neste estudo foi a de Wagner, postulada em 1981. Para esta classificação, quanto maior o grau, maior o risco de amputação com maior tempo de cicatrização e, consequentemente, hospitalização. O presente estudo encontrou que mais da metade dos pacientes (52 pacientes – 67,53 %)

apresentou algum de tipo de amputação, quer seja localizada (grau 4), quer seja de quase todo o pé (grau 5). Este resultado é alarmante e os pacientes precisam ter o conhecimento da gravidade das consequências do pé diabético, tendo em vista o número de pacientes que tiveram recidivas e revascularizações. Duas pacientes (ZSM08 e AAL77) amputaram ambos os membros inferiores, porém foram classificadas como grau 0, devido o motivo da amputação ser por trombose e embolia, não havendo presença de lesão e infecção. Contrário a este estudo, segundo os resultados de Carvalho *et al.* (2004), mais da metade dos pacientes (66,70 %) apresentava grau 1 e 2 pela classificação de Wagner, pois todos os pacientes inclusos na pesquisa eram ambulatoriais, poucos apresentaram um grau mais grave, detectando-se 2,8 % de prevalência para o grau 5. O grau de Wagner mais frequentemente encontrado no estudo de Carvalho *et al.* (2004) foi o grau 2, compreendendo 43 % dos pacientes avaliados. Nos resultados de Hadadi *et al.* (2014), encontraram, de acordo com a classificação de Wagner, as seguintes porcentagens: grau 0, nenhum acometido ou classificado, grau 1 (11,79 %), grau 2 (28,71 %), grau 3 (47,69 %), grau 4 (11,79 %) e grau 5 (5,12 %). Para Mlinaric-Missoni *et al.* (2005), 9,10 % dos pacientes foram classificados como grau 1; 18,20 % dos pacientes foram classificados em grau 2; 36,40 % dos pacientes foram classificados em grau 3; 31,80 % dos pacientes foram classificados em grau 4; e 4,50 % dos pacientes foram classificados em grau 5 e nenhum paciente foi classificado em grau 0 pela Classificação de Wagner. No estudo de Hefni *et al.* (2012), de 75 pacientes avaliados, nenhum apresentavam o grau 0; 13,30 % eram grau 1; 26,70 % eram grau 2; 24 % eram grau 3; 21,3 % eram grau 4; e 14,70 % eram grau 5. Ainda com relação ao estudo anterior, o mesmo apresentou um elevado índice de pacientes que sofreram amputações (18 %), localizada ou generalizada, mostrando a gravidade da doença e suas complicações, corroborando com o presente estudo.

Todos os pacientes elegíveis para este estudo estavam em uso de antibacterianos, mesmo os pacientes que não continha processo infeccioso e necrótico diagnosticado (pacientes ZSM08 e AAL77). Não se pôde afirmar qual foi o real motivo do uso de antibacterianos por essas duas pacientes, se por terapia contínua a uma infecção anterior ou profilaxia para procedimento cirúrgico. Não há evidências que justifiquem o uso de antibióticos em úlceras sem sinais clínicos de infecção; logo, a primeira necessidade, em face de um pé diabético, é a de definir a presença de infecção e a sua gravidade (DUARTE; GONÇALVES, 2011). Do contrário, nenhum paciente do nosso estudo estava em uso de antifúngicos, visto que em todas as amostras estudadas tiveram crescimento de fungos. Três

pacientes (MVS10, AGCM91 e MLA07) apresentaram em suas culturas, realizadas pelo laboratório terceirizado, infecções por espécies de *Candida*, porém nenhuma delas iniciou tratamento com antifúngico específico. Mlinaric-Missoni *et al.* (2005), afirmam que o tratamento para úlceras no pé diabético deve-se direcionar para a terapia antibacteriana e antifúngica. Os mesmos autores têm descrito os benefícios da terapia antifúngica sistêmica (flucitosina, fluconazol, itraconazol e terbinafina, em monoterapia ou associados), porém sem o processo de revascularização não melhora significativamente a qualidade de vida de pacientes com úlceras nos pés. Ainda no estudo anterior, é justificada a associação da terapia antifúngica com a antibacteriana, visto que em 59,10 % dos pacientes do estudo relatado tiveram algum tipo de amputação. Nos resultados de Lee *et al.* (2014), em 04 pacientes, todos tinham recebido terapia com antibacterianos para úlceras nos pés, porém nenhum paciente foi administrado terapia antifúngica. Ainda sobre esse estudo, as lesões ulcerativas nos pés foram de difícil tratamento, devido à dificuldade na cicatrização das feridas. Nair *et al.* (2006-2007), relataram a associação de *Candida* spp. em úlceras profundas no pé diabético, em que houve melhora significativa com a terapia com antifúngicos sistêmicos. Ainda no estudo anterior, os autores aconselham a necessidade de uma rotina micológica no pé diabético e tratamento com antifúngicos de modo racional, com base nos resultados da cultura. Para Chadwick (2013), o uso de antifúngicos tópicos e orais é essencial para tratamento do pé diabético. No estudo anterior, no caso clínico reportado, o paciente estava em uso de flucloxacilina e fluconazol e obteve uma melhoria em seu estado clínico após duas semanas de tratamento. Ainda no mesmo estudo, o autor relata que pacientes diabéticos tendem a ser mais resistentes ao tratamento com antifúngicos tradicionais, devido à hiperglicemia e dificuldade em manter uma boa higiene dos pés (normalmente devido à neuropatia, obesidade e retinopatia). Para Duarte e Gonçalves (2011), a terapêutica deve assim ser iniciada em base empírica, tendo o conhecimento sobre os patógenos predominantes no pé diabético, que são os Gram positivos (em particular os *Staphylococcus aureus*), em tecidos superficiais; e os Gram negativos (em particular espécies de *Enterobacteriaceae*), mais prevalentes em tecidos profundos, e os anaeróbios quando existe necrose.

Com relação ao uso de medicamentos contínuos, 90,90 % dos pacientes usavam algum tipo de medicamento para doença crônica associada ao diabetes, sendo os anti-hipertensivos os mais encontrados nos prontuários (77,92 %), pois a hipertensão foi a comorbidade mais associada aos pacientes diabéticos. Nos resultados de Vidal (2009),

observou-se que os pacientes que usavam anti-hipertensivos correspondiam a 57,8 % da amostra e apenas 10,5 % faziam o controle da pressão arterial e acompanhamento nutricional para a manutenção do nível glicêmico em parâmetros aceitáveis. O risco de amputação é elevado por causa da baixa adesão do paciente ao tratamento prolongado. O fator idade pode ser uma barreira para a adesão ao tratamento devido às alterações cognitivas e funcionais, interferindo no correto entendimento das informações fornecidas pelos profissionais de saúde e na capacidade do autocuidado por causa das limitações físicas impostas pela idade (VIDAL, 2009). Para Chadwick (2013), o risco de interações medicamentosas deve-se levar em consideração devido ao papel da polifarmácia, na qual os pacientes diabéticos estão sujeitos.

Como a pesquisa foi realizada através da coleta de dados em prontuários, não conseguimos obter todos os dados necessários. Parâmetros importantes como a neuropatia periférica, glico-hemoglobina, glicemia pós-prandial e o estado de imunossupressão dos pacientes foram os dados ausentes no presente estudo. Esses dados possuem grande relevância para o desenvolvimento do estudo, pois são informações importantes que servem para o prognóstico e evolução do tratamento dos pacientes diabéticos. A ausência desses dados prejudicou algumas análises e correlações com o desenvolvimento de úlcera no pé.

A presença de úlcera em pacientes diabéticos decorre de uma crítica complicação da doença. Neste estudo, a maioria dos pacientes apresentou quadro de edema (44 pacientes – 57,14 %), necrose (75 pacientes – 97,40 %) e infecção (75 pacientes – 97,40 %). A gravidade das úlceras nos pés de pacientes diabéticos é compatível com a quantidade de infecções e outras complicações, sendo um fator decisivo para a grande quantidade de desbridamentos realizados em nosso estudo. Em nosso estudo, correlacionamos o tipo de diabetes com a presença de edema, necrose e infecção, e não observamos diferença estatística entre esses quatro parâmetros analisados ($p = 0,3275$, $p = 0,8276$ e $p = 0,6161$, respectivamente). Segundo os resultados de Mlinaric-Missoni *et al.* (2005), cerca de 36,40 % dos pacientes apresentaram úlceras necróticas nos pés e processo infeccioso, sem administração de antimicóticos, apenas de antibacterianos.

A amputação se configura como a consequência mais grave de ulcerações do pé diabético. Neste estudo, 54 pacientes (70,13 %) apresentaram algum tipo de amputação. Em nosso estudo, correlacionamos a presença de amputação com a glicemia de jejum, e não observamos significância estatística entre esses dois parâmetros analisados ($p = 0,9266$). Nos resultados de Hadadi *et al.* (2014), dos 196 pacientes recrutados para o estudo, 89

(45,40 %) sofreram algum tipo de amputação, sendo 47 amputações (52,81 %) nos dedos e 42 amputações (47,19 %) ao nível da coxa. No estudo de Mlinaric-Missoni *et al.* (2005), 59,10 % dos pacientes foram submetidos à amputação em parte ou em todo o pé, com processo inflamatório e necrótico evidente. Para Singh *et al.* (2013), as amputações são geralmente utilizadas quando o tratamento com outras medidas falharem, contudo, podem também ser uma medida preventiva para permitir um retorno mais rápido a rotina diária do paciente ou um melhor estado funcional. Para os autores deste último estudo citado, as amputações normalmente realizadas em úlceras do pé diabético são nos dedos dos pés (metatarsos), correspondendo a 30 % das amputações, e o tornozelo, com 25 % das amputações, locais onde sofrem maior pressão anatômica nos pés. Fata *et al.* (2010), notificaram que 16,70 % dos pacientes tiveram amputação dos dedos dos membros inferiores, pois foram os locais onde continham maior prevalência de úlceras. Vidal (2009) cita que os locais mais comuns de aparecimento de lesões são os dedos, devido às pressões externas elevadas causadas por atrofia da musculatura; sulcos interdigitais pela ocorrência de fissuras e pequenos cortes, favorecendo a colonização por fungos na pele; região distal do pé onde as proeminências dos metatarsos, quando ulcerados, podem originar foco de infecção que são capazes de penetrar nas articulações falangianas levando a infecções locais e/ou osteomielite; e região medial do pé, local de desenvolvimento de calosidades e lesões por representar região de apoio. Ainda no estudo de Vidal (2009), as áreas de maior pressão usualmente são as regiões distais dos metatarsos, região dorsal e plantar dos dedos dos pés, formando calosidades. Esses calos devem ser removidos porque funcionam como corpos estranhos e podem aumentar em até 30 % a pressão local, aumentando o risco de ulceração.

A falta de orientação e informações sobre o diabetes e suas complicações repercute diretamente na qualidade vida dos pacientes. No presente estudo, 35 pacientes (45,46 %) relataram que examinavam os pés diariamente, enquanto que 42 pacientes (54,54 %) não tinham esse hábito. Em nosso estudo, correlacionamos as orientações quanto aos cuidados com os pés com a localidade a qual residiam os pacientes do estudo e com a verificação diária dos pés, e não observamos diferença significativa entre esses três parâmetros analisados ($p = 0,4923$ e $p = 0,8408$, respectivamente). Gagliardi (2003) recomenda o exame regular dos pés, e todos os pacientes devem ter um espelho pequeno com o qual possam examinar a região plantar diariamente. Nos resultados de Wijesuriya *et al.* (2014), todos os pacientes disseram que examinavam seus pés diariamente para evitar infecções e lesões. Para Gemechu *et al.* (2013), todos os pacientes com diabetes devem

realizar exames sistemáticos nos pés, pelo menos uma vez por ano, e com maior frequência quando existir a presença de fatores de risco para úlceras nos pés. As medidas preventivas apropriadas incluem: educação continuada do paciente sobre os cuidados com os pés, controle glicêmico e da pressão arterial, cessação do tabagismo e uso de calçados adequados.

O autocuidado é fator fundamental na prevenção das complicações em pés diabéticos e, para bom controle da doença, é preciso autogerenciamento efetivo diário. Os profissionais da saúde devem conscientizar os pacientes de modo a modificar sua atitude quanto ao autocuidado e aderir às recomendações de como cuidar dos pés, visto que dessa forma reduz significativamente os casos de ulcerações e, conseqüentemente, as amputações. Foram consideradas medidas de autocuidado para este estudo: orientação quanto aos cuidados dos pés, exames diários nos pés e secagem dos dedos após o banho e uso de creme hidratante em membros inferiores (VIDAL, 2009; GAGLIARDI, 2003; GEMECHU, 2013).

Segundo Vidal (2009), a falta de orientação profissional pode elevar o risco de amputação de 2,10 % a 3,80 % por baixa adesão ao tratamento. Devem ser consideradas as barreiras que os profissionais de saúde encontram na abordagem da população, que apresenta pouco ou nenhum conhecimento e entendimento sobre o processo saúde-doença do DM. Pacientes que têm o conhecimento desses riscos e desenvolvem úlceras nos pés podem não buscar tratamentos alternativos por medo de perder o membro, retardando a intervenção médica; já outros resistem à adesão ao tratamento por crenças culturais. Os profissionais de saúde devem trabalhar na remoção desses obstáculos, estabelecendo vínculos com o paciente e seus familiares, fornecendo conhecimento sobre o processo patológico da doença e cuidados adequados aos pés e estimular o autocuidado. Esse processo é gradativo e depende de ações pontuais dos profissionais na comunidade assistida. Para Singh *et al.* (2013), a educação aos pacientes diabéticos ajuda na prevenção de úlceras e sua recorrência. Esses mesmos autores afirmam que a educação do paciente e as práticas de autocuidado, como manter o pé higienizado e os cuidados com as unhas, são fundamentais. Segundo Gagliardi (2003), a proteção do pé é a medida mais importante, e o autocuidado pode reduzir o risco de ulceração. O simples uso de meias macias e grossas, evitando material sintético e sem costuras no nível dos pododáctilos, pode evitar lesões graves. Uso de sapatos apropriados com suporte adequado é uma medida preventiva para evitar o aparecimento de ulcerações nos pés. Segundo Singh *et al.* (2013), acima de tudo, a orientação quanto aos cuidados com os pés é uma condição que comprova a máxima “é

melhor prevenir que remediar”. Para estes autores ainda, o pé deve ser cuidadosamente inspecionado para identificar possíveis anormalidades, pele seca, fissuras, deformidades e calosidades. Chadwick (2013) afirma que, para evitar o desenvolvimento de infecções nos pés, o autor sugere manter uma boa higiene nos membros inferiores, observar as possíveis fissuras, cortes e lesões, bem como usar sapatos adequados, manter os pés secos diariamente e uso de meias limpas e confortáveis. Os pacientes devem evitar o contato direto dos pés no chão, usando sempre chinelos adequados. A conscientização do controle da glicemia deve ser sempre estimulada. Nos resultados de Carvalho *et al.* (2004), 35 % dos pacientes entrevistados disseram desconhecer a origem da lesão, e muitas vezes não sabiam precisar o tempo de evolução da mesma. Aliada à questão da provável existência de neuropatia, existe também a rejeição e o desconhecimento do paciente com relação à sua doença e aos cuidados relativos aos pés. Para Duarte e Gonçalves (2011), corrigir calçados inadequados, ou prescrever sapatos ortopédicos/plantares adaptados aos pés é fundamental. Para Wijesuriya *et al.* (2014), a educação dos pacientes diabéticos em relação à higiene apropriada dos pés é fundamental para o tratamento correto, tendo a necessidade da auto-inspeção diária dos pés para detectar e controlar as infecções nos membros inferiores. Além disso, os pacientes devem ser educados frequentemente, relatando quaisquer mudanças nas unhas, tais como se dura, frágil ou alteração na sua cor. Recomenda-se ainda cortar as unhas dos pés, secá-los após o banho e evitar andar descalço, usando sempre calçado apropriado a fim de evitar o traumatismo nos pés. Para enfrentar toda essa demanda é necessária a formação de uma equipe interdisciplinar para gerenciar o cuidado, garantindo um atendimento especializado em todos os níveis de atenção à saúde. Os profissionais devem buscar estratégias para proporcionar educação contínua, conforme as necessidades individuais do diabético e de sua família. Estudos demonstraram que a baixa adesão do paciente pode estar relacionada às limitações do indivíduo em realizar ações de autocuidado, como inspeção dos pés, controle da obesidade e glicemia, conhecimentos sobre a diabetes e suas complicações e as condições socioeconômicas do paciente, que podem determinar o estilo de vida e a qualidade de vida das pessoas com DM (VIDAL, 2009; DUARTE E GONÇALVES, 2011; SINGH *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2004).

A secagem e a hidratação dos pés constituem fatores de prevenção para as infecções. No presente trabalho, 31 pacientes (40,26 %) relataram que faziam a secagem dos pés após o banho, e 46 pacientes (59,74 %) relataram que não fazia esse procedimento; além disso, 39 pacientes (50,65 %) disseram que usavam cremes para hidratação da pele, a fim de

evitar fissuras e calosidades, e 38 pacientes (49,35 %) não tinham esse hábito, sendo mais susceptíveis as infecções, devido à formação de calos e fissuras. Em nosso estudo, correlacionamos as orientações quanto aos cuidados com os pés e a informação se os pacientes realizavam a secagem entre os dedos após o banho e com uso de cremes hidratantes diariamente, e não observamos diferença significativa entre esses três parâmetros analisados ($p = 0,2319$ e $p = 0,4452$, respectivamente). Segundo os resultados de Vidal (2009), cerca de 90 % dos pacientes avaliados hidratam a pele adequadamente. No estudo de Dangelser *et al.* (2003), pacientes diabéticos amputados demonstraram que, mesmo após orientação sobre cuidado com os pés, 63 % persistiram usando calçados inadequados, 50 % não examinavam os pés antes de calçar sapatos, 64 % não usavam hidratantes e apenas 39 % secavam entre os dedos. Segundo Smith *et al.* (2003), dentre os fatores evitáveis desencadeadores de úlcera que podem evoluir para amputação, os mais frequentes são os traumas nos pés, causados por calçados inapropriados e cortes de unhas inadequados. No estudo de Gagliardi (2003), recomenda-se o uso de cremes hidratantes para evitar o ressecamento e a formação de fissuras na pele, evitando, dessa forma, a entrada de microrganismos. Para Singh *et al.* (2013), as práticas de educação e autocuidado do paciente, como a manutenção da higiene dos pés e cuidados com as unhas, devem ser promovidos. A pele deve ser mantida hidratada, com a aplicação de hidratantes tópicos após a lavagem dos pés. Boulton *et al.* (2006) afirmam que pacientes diabéticos orientados apresentam maior frequência nas consultas médicas e maior adesão nos cuidados preventivos com os pés, como uso de sapatos fechados, secagem entre os dedos, hidratação da pele e corte adequado das unhas. Chadwick (2013), no caso clínico reportado por este autor, o paciente foi aconselhado a usar um emoliente diariamente nas regiões secas dos pés, porém evitando a umidade excessiva entre os dedos. A hidratação dos pés é fundamental, pois, segundo Singh *et al.* (2013), o DM afeta o Sistema Nervoso Autônomo, gerando uma pele mais ressecada e propícia à infecção; e a pele deve ser mantida hidratada, com a aplicação de hidratantes tópicos, aplicados após lavagem dos pés com sabão e água. Nos resultados de Wijesuriya *et al.* (2014), entre todos os pacientes, 39 % usavam creme ou óleo hidratante para a pele ou cuidados com os pés, além disso, todos eles cortavam as unhas regularmente e 69 % secavam os pés após o banho.

Em nosso estudo utilizamos a metodologia micológica convencional, tais como o isolamento e a cultura das amostras em meios convencionais e seletivos, e a coloração de Gram, para identificarmos as leveduras presentes nas amostras, que apresentam

características morfo-tinturiais de Gram positivas. Para a identificação das leveduras isoladas foi utilizado o microcultivo com ágar fubá, adicionado de tween 80 a 1 %, e uso do meio diferencial cromogênico, para a identificação de espécies de *Candida*. Outros autores utilizaram a metodologia micológica convencional para a cultura fúngica, obtendo resultados satisfatórios quanto à identificação e isolamento das espécies de *Candida* (MLINARIC-MISSONI *et al.*, 2005; ARAÚJO *et al.*, 2005; NAIR *et al.*, 2006-2007; WINGETER *et al.*, 2007; FATA *et al.*, 2010; ALVES *et al.*, 2010; IBRAHIM *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2015; OZER *et al.*, 2016; KAUR *et al.*, 2016; PRIGENT *et al.*, 2016, no prelo).

Nos resultados de Fata *et al.* (2010), apresentaram dificuldade quanto à coleta da amostra dos pacientes, visto que não conseguiram distinguir se o processo de infecção micótica se deu por conta de fungos patogênicos ou foi por fungos colonizadores da pele. A forma de coleta dos referidos autores foi com *swab* estéril, coletando amostras de tecidos superficiais. Em nosso estudo, utilizamos um bisturi para coleta de tecidos profundos dos pacientes elegíveis ao estudo, confirmando que os achados fúngicos encontrados nesses locais são de origem patogênica.

Quatro amostras (RPMA129, JER86, NQP17 e MCP67) tiveram o crescimento de mais de uma colônia, no meio seletivo ágar Sabouraud com cloranfenicol, característica de leveduras de diferentes espécies, sendo, portanto, inoculadas em dois tubos de ensaios separadamente, cada amostra. Semelhante ao nosso achado, no estudo de Elfeky *et al.* (2016), observaram espécies de leveduras diferentes quando ao aspecto macromorfológico, sendo realizado ensaios nas diferentes cepas identificadas.

Não se pôde afirmar que as placas continham 100 % de amostras fúngicas, pois em algumas placas houveram a contaminação bacteriana, apesar do meio ser seletivo para fungos; portanto, em vista dos achados científicos, podemos constatar que o crescimento adequado para fungos leveduriformes seria adequadamente em torno de 02 dias, padronizando dessa forma para as demais culturas fúngicas. Segundo Sidrim e Rocha (2012), para a visualização de blastoconídeos, pseudohifas e clamidósporos é necessário o crescimento ativo em 48 horas das cepas fúngicas. Meios mais seletivos podem ser utilizados, como o meio ágar Sabouraud + cloranfenicol e cicloeximida (Micosel®), que inibe qualquer tipo de crescimento bacteriano.

As leveduras das espécies de *Candida* apresentam características morfo-tinturiais de Gram positivas, de coloração azul a roxo intenso, sendo identificadas, por esta

técnica, em grande parte neste estudo. Nos resultados de Chellan *et al.* (2010), também realizaram a técnica de coloração de Gram em todas suas amostras fúngicas, apresentando as amostras leveduriformes com coloração Gram positivas característica.

Nair *et al.* (2006-2007), utilizaram meio ágar fubá adicionado de tween 80 1 % para visualização de blastoconídeos, hifas e pseudohifas ramificadas em *C. tropicalis*; aglomerados esféricos de clamidósporos e células ovóides de blastoconídios em *C. albicans*; agregados alongados de blastoconídios septados e pseudohifas ramificadas em *C. krusei*; e presença de blastoconídios, mas não característicos, e presença de hifas gigantes em *C. parapsilosis*. Fata *et al.* (2010), Elfeky *et al.* (2016), Kaur *et al.* (2016) e Ozer *et al.* (2016) também utilizaram o mesmo meio para o mesmo objetivo e obteve resultados semelhantes aos nossos.

Para Araújo *et al.* (2005), o ágar HiCrome *Candida* diferencial® é um meio cromógeno que permite a identificação presuntiva das leveduras por conter vários substratos enzimáticos que, hidrolizados pelas hexoaminidases correspondentes, permitem a identificação da levedura de acordo com a pigmentação exibida pela colônia em um tempo de 24 a 48 horas. A utilização do meio cromogênico contribuiu, em seu estudo, para um diagnóstico rápido das infecções causadas por leveduras do gênero *Candida*, favorecendo a aplicação de uma terapia antifúngica precoce e adequada. Porém, para Elfeky *et al.* (2016), a principal limitação do uso do meio cromogênico é a baixa discriminação entre as espécies de *Candida*, limitação esta encontrada em nosso estudo.

Contrário aos nossos estudos, muitos autores encontraram como mais prevalente espécies de *C. albicans* em seus resultados (MLINARIC-MISSONI *et al.*, 2005; NAIR *et al.*, 2006-2007; FATA *et al.*, 2010; CHELLAN *et al.*, 2010; IBRAHIM *et al.*, 2014; ELFEKY *et al.*, 2016; NAGASHIMA *et al.*, 2016; BUSCA *et al.*, 2015; TAPIA *et al.*, 2016; OZER *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016, no prelo).

No estudo de Nair *et al.* (2006-2007), 65 % dos pacientes estudados apresentavam infecções fúngicas, sendo as espécies de *Candida* as mais isoladas (82 %). Destas, *C. albicans* foi a mais identificada (46 %), seguida por *C. tropicalis* (27 %), *C. parapsilosis* (17 %), *C. guilliermondi* (5 %) e *C. krusei* (5 %), observadas em úlceras presentes em tecido profundos. No estudo de Fata *et al.* (2010), os autores identificaram em 23 pacientes espécies de *Candida*, sendo *C. albicans* predominante (47,82 %), seguida por *C. tropicalis* (21,74 %). *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata* tiveram 1,0 % cada uma. Ainda com relação ao estudo de Fata *et al.* (2010), desse grupo de pacientes, 27,44 % das

espécies de *Candida* não tiveram identificação confirmada. No estudo de Papini *et al.* (2013), os autores identificaram que, dentre as espécies de *Candida*, no total de oito amostras, 100 % eram da espécie *C. albicans*. Nos resultados de Nagashima *et al.* (2016), identificou, em 73 pacientes com candidemia vulvovaginal, 54 pacientes com infecção por *C. albicans* e 19 pacientes com infecção por *C. glabrata*. Nos resultados de Elfeky *et al.* (2016), *C. albicans* foi a espécie isolada predominante (60,30 %), enquanto que, dentre as espécies não *albicans*, a mais comum foi *C. glabrata* (12,70 %). Nos resultados de Ibrahim *et al.* (2014), a espécie fúngica mais isolada foi *C. albicans* (65,30 %), seguida pelas espécies não *albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, ambas com 16,30 %.

Porém, em nosso estudo, observamos que as espécies de *Candida* não *albicans* foram mais prevalentes que as espécies de *Candida albicans*, semelhante a outros resultados na literatura (MLINARIC-MISSONI *et al.*, 2005; WINGETER *et al.*, 2007; BRITO *et al.*, 2007; BRITO *et al.*, 2009a; BRITO *et al.*, 2009b; CHELLAN *et al.*, 2010; ALVES *et al.*, 2010; ALANIO *et al.*, 2011; PARADA *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2015; KAUR *et al.*, 2016; THEILLA *et al.*, 2016).

Nos resultados de Brilhante *et al.* (2016), os autores identificaram e avaliaram a resistência *in vitro* de espécies de *Candida* spp. identificadas e isoladas da lagoa de Catú, no município de Aquiraz, Ceará. Os autores identificaram 46 amostras de *Candida* spp., sendo 37 isolados de *Candida* não *albicans*, de cinco espécies diferentes (*C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. ciferri*, *C. guillermundii* e *C. famata*) e nenhuma cepa de *C. albicans*.

Nos resultados de Chellan *et al.* (2010), as leveduras predominantes foram de espécies não *albicans*, sendo: *Candida parapsilosis* (25,5 %), *Candida tropicalis* (22,7 %) e *Candida albicans* (10,6 %). Outras espécies de leveduras também foram identificadas: *Trichosporon asahii* (12,8 %) e espécies de *Aspergillus* (5,0 %). A espécie *C. parapsilosis* emergiu como o isolado fúngico mais comum no estudo de Chellan *et al.* (2010). Nos resultados de Mlinaric-Missoni *et al.* (2005), 08 espécies diferentes de *Candida* foram identificadas em pacientes diabéticos, dentre os 22 pacientes diabéticos com evidência clínica de infecção comprovada. O isolado fúngico predominante foi *C. parapsilosis* (45,50 %), *C. tropicalis* (22,70 %), *C. albicans* (9,10 %) e *C. glabrata* (9,10 %). As espécies *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. famata* e *C. lipolytica* foram isoladas em menor taxa (juntas perfazendo um total de 4,80 % dos pacientes). Estudos têm relatado que *C. parapsilosis* tem dramaticamente aumentado em importância e prevalência nas últimas duas décadas, e é conhecido por ser uma das principais causas de doenças invasivas por espécies de *Candida*,

sendo a espécie de *Candida* mais frequentemente isolada em úlcera do pé diabético por estes autores em suas pesquisas (CHELLAN *et al.*, 2010; MLINARIC-MISSONI *et al.*, 2005). Nos resultados de Parada *et al.* (2013), 163 pacientes foram recrutados para o estudo, e as leveduras foram o grupo de fungos mais prevalentes em úlceras nos pés de pacientes diabéticos, onde *Candida parapsilosis* (11,70 %) e *Candida albicans* (7,80 %) foram os mais frequentemente isolados espécies de *Candida*.

Nos resultados de Alanio *et al.* (2011), de 118 amostras clínicas fúngicas de 89 pacientes, os isolados mais frequentemente identificados foram *C. glabrata* (37 % dos casos), *C. albicans* (35 %) e *C. krusei* (16 %), corroborando com os achados de maior incidência de *Candida* não *albicans*, semelhante ao presente estudo. Nos resultados de Silva *et al.* (2015), as espécies de *Candida* não *albicans* foram responsáveis por 58,33 % dos casos de candidemia em hemoculturas, sendo a espécie *C. parapsilosis* a mais identificada (16,67 %). No estudo de Ozer *et al.* (2016), apesar de *C. albicans* ser a mais isolada comumente, estes autores relatam um aumento da prevalência de espécies de *Candida* não *albicans*, principalmente espécies de *C. tropicalis*. Araújo *et al.* (2005), França *et al.*, (2008), Nunes *et al.* (2011) e Silva *et al.* (2015), afirmam que, apesar da *C. albicans* ser o principal agente identificado nas infecções superficiais ou nas invasivas, tem aumentado a incidência de isolamentos de *Candida* não *albicans*, diretamente relacionadas a altos percentuais de mortalidade. Nestes estudos ainda, as pesquisas epidemiológicas realizadas em pacientes com câncer e fungemia mostraram diminuição do número de casos por *C. albicans*, e aumentado os casos de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*.

Segundo Zardo e Mezzari (2004), Chakrabarti *et al.* (2009), Alves *et al.* (2010) Elfeky *et al.* (2016), Fornaria *et al.* (2016), e Bassetti *et al.* (2016), a espécie *C. albicans* é a mais frequente ainda isolada, responsável por 50 a 70 % de todas as infecções invasivas pelo gênero *Candida*. Porém, as espécies não *albicans*, como a *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, tem sido um patógeno presente, principalmente em pacientes imunossuprimidos, nas unidades de terapia intensiva, possivelmente devido à propagação da resistência antifúngica, ocasionada pelo uso inadequado e tratamento prolongado de antifúngicos.

O que chama a atenção nesses estudos citados anteriormente é a quantidade de amostras identificadas e isoladas de espécies de *Candida* não *albicans* em relação às *C. albicans*, sendo esses resultados semelhantes ao presente estudo.

Semelhante ao nosso estudo, quanto à espécie de *Candida* mais isolada, no estudo de Ozer *et al.* (2016), das amostras de *Candida* não *albicans* isoladas, a mais

incidente foi a *C. tropicalis* (20,20 %), seguido de *C. parapsilosis* (12,5 %). Semelhante ao estudo anterior, na pesquisa de Ozhak-Baysan *et al.* (2012), das amostras de *Candida* não *albicans* isoladas, a espécie *C. tropicalis* foi a mais incidente (20 %), seguida por *C. glabrata* (18 %), *C. krusei* (6 %), *Candida famata* (5 %), *C. parapsilosis* (4 %), *C. kefyr* (2 %) e *C. guilliermondii* (1 %). No estudo de Nunes *et al.* (2011), de 81 isolados do gênero *Candida* spp., 25,90 % correspondiam à *C. tropicalis*, sendo a espécie fúngica não *albicans* mais isolada e identificada. No estudo de Kaur *et al.* (2016), entre os 90 isolados de espécies de *Candida* de pacientes internados na UTI, *C. albicans* representou 36,70 % e as espécies de *Candida* não *albicans* representaram 63,30 % de todos os casos de colonização por *Candida* spp. Dentre os 63,30 % de isolados de *Candida* não *albicans*, a mais prevalente foi *C. tropicalis* (41,10 %), seguida de *C. glabrata* (10 %), *C. parapsilosis* (6,70 %), *C. krusei* (3,30 %) e *Candida kefyr* (2,20 %). França *et al.* (2008), também encontraram a espécie *C. tropicalis* como a espécie de *Candida* não *albicans* mais identificada e isolada (15 %). Nos resultados de Chakrabarti *et al.* (2009), de 140 amostras coletadas dos pacientes do estudo, 11,40 % eram *C. albicans* e 86,40 % eram espécies não *albicans*, onde *C. tropicalis* foi a espécie mais prevalente (42,10 %). A maioria dos estudos observacionais sobre candidemia relatou que *C. albicans* é a espécie mais isolada, no entanto, *C. tropicalis* vem tornando a espécie não *albicans* mais prevalente nos últimos anos (CHAKRABARTI *et al.*, 2009; KAUR *et al.*, 2016). *C. tropicalis*, vem se tornando cada vez mais prevalente no mundo, sendo a primeira mais identificada entre as espécies de *Candida* não *albicans* (MENEZES *et al.*, 2009). Os autores citados anteriormente relatam que *C. tropicalis* tem emergido como um importante patógeno fúngico, se assemelhando ao presente estudo pela espécie fúngica mais identificada e isolada.

Para Nagashima *et al.* (2016), a justificativa para o aumento da prevalência de espécies de *Candida* não *albicans* é devido ao uso indiscriminado de antifúngicos tópicos e orais de venda livre. Para Busca *et al.* (2015) e Kaur *et al.* (2016), o uso generalizado da profilaxia com fluconazol tem diminuído as infecções invasivas por *C. albicans* e aumentado os casos de infecções por espécies de *Candida* não *albicans*. Semelhantes aos estudos anteriores, Ener (1996), afirma que o uso frequente da profilaxia e o tratamento antifúngico resultam em infecções por espécies de *Candida* não *albicans* resistentes a antifúngicos. Pode-se especular que o uso generalizado da profilaxia antifúngica com os triazólicos impede a detecção eficaz de isolados fúngicos, que mascara a real magnitude da

resistência antifúngica em pacientes com infecções fúngicas invasivas (BUSCA *et al.*, 2015).

Apenas uma amostra de *C. krusei* foi identificada em nosso estudo. É importante relatar que esta espécie de *Candida* é intrinsecamente resistente ao fluconazol, não sendo adequada sua prescrição em casos onde esta espécie de *Candida* seja identificada, sendo, portanto, uma justificativa plausível para a realização de testes de sensibilidade aos isolados clínicos. Outros estudos também identificaram uma baixa prevalência desta espécie de *Candida* (ARAÚJO *et al.*, 2005; MLINARIC-MISSONI *et al.*, 2005; NAIR *et al.*, 2006-2007; FATA *et al.*, 2010; IBRAHIM *et al.*, 2014).

Neste estudo, para as amostras identificadas e isoladas de *C. albicans*, foram realizados o teste de sensibilidade aos antifúngicos: anfotericina B, cetoconazol, fluconazol e itraconazol, de acordo com a metodologia do CLSI-M27A2 (2002). Muitos estudos descritos na literatura têm utilizado essas drogas antifúngicas contra espécies de *C. albicans*, através da microdiluição em caldo, de acordo com a metodologia padronizada pelo CLSI M27-A2 (NUNES *et al.*, 2011; DHANASEKARAN *et al.*, 2014; NAGASHIMA *et al.*, 2016; ELFEKY *et al.*, 2016; FORNARIA *et al.*, 2016; KAUR *et al.*, 2016; OZER *et al.*, 2016; THEILLA *et al.*, 2016).

Para a anfotericina B, o documento CLSI-M27A2, preconiza uma faixa de concentração de sensibilidade entre 0,25 a 1,0 µg/mL. Nosso estudo encontrou uma faixa de concentração entre 0,125 a 1,0 µg/mL, sendo, portanto, as amostras deste estudo sensíveis a esta droga antifúngica. Para o cetoconazol, a faixa de concentração de sensibilidade é entre 0,03 a 16 µg/mL. Nosso estudo encontrou uma faixa de concentração entre $4,8 \times 10^{-4}$ a 0,25 µg/mL, sendo também, as amostras deste estudo, consideradas sensíveis à esta droga antifúngica. Uma baixa CIM foi constatada para o cetoconazol, devido termos utilizado concentrações finais (C_2) decrescentes em nosso estudo, a fim de encontrarmos uma CIM ideal para o estudo. Para o fluconazol, o documento CLSI-M27A2, preconiza uma faixa de concentração de sensibilidade menor ou igual a 8 µg/mL, sendo amostras resistentes com concentrações maior ou igual a 64 µg/mL. Nosso estudo encontrou uma faixa de concentração entre 0,25 a 8 µg/mL, sendo, as amostras desse estudo, consideradas sensíveis à esta droga antifúngica. Por fim, para o itraconazol, a faixa de concentração, preconizada pelo CLSI-M27A2, seria menor ou igual a 0,125 µg/mL, sendo amostras consideradas resistentes para concentração maior ou igual a 1 µg/mL. O presente estudo encontrou uma faixa de concentração entre 0,03125 a 1 µg/mL, sendo, as amostras deste estudo,

consideradas sensíveis à esta droga antifúngica. Portanto, todas as amostras de *C. albicans*, identificadas e isoladas neste estudo, foram consideradas sensíveis às drogas antifúngicas testadas, segundo a metodologia e referências do CLSI-M27A2 (2002). Em vista dos resultados encontrados nesta pesquisa, podemos concluir que as drogas antifúngicas utilizadas ainda são potentes contra fungos provenientes do pé diabético.

Nenhuma droga antifúngica foi administrada nos pacientes internados no HRN durante o período deste estudo, sendo, portanto, necessário para protocolos futuros do presente hospital, inserir uma terapia antifúngica para tratamento de pacientes diabéticos com complicações nos pés.

Apesar das cepas de *C. albicans* serem todas consideradas sensíveis, não se pode negligenciar o uso racional de antifúngicos, a fim de não sofrermos com a problemática da resistência microbiana futura. Para Theilla *et al.* (2016), deve-se usar de modo racional as drogas antifúngicas, pois a resistência à estas pode tornar-se um problema no futuro. Para Zardo e Mezzari (2004), a resistência às drogas entre as espécies de *Candida* tem sido um problema crescente, tornando-se necessário o uso de testes de sensibilidade nos isolados clínicos. A identificação prévia das espécies de *Candida* e a determinação da sensibilidade *in vitro* têm sido recomendadas em alguns casos, como em pacientes portadores de diabetes, neoplasias e tratamento com imunossupressores. O conhecimento da sensibilidade às drogas torna possível melhorar o tratamento em casos de candidemias (ZARDO E MEZZARI, 2004).

O teste de sensibilidade realizado com a cepa padrão de *C. parapsilosis* ATCC 22019 apresentou, para as drogas anfotericina B, cetoconazol e itraconazol, sensibilidade de acordo com os critérios descritos pelo CLSI-M27A2, porém para o fluconazol, mostrou-se com sensibilidade dose-dependente de acordo com os critérios do mesmo documento. Nos estudos de Wingeter *et al.* (2007), Nagashima *et al.* (2016), Kaur *et al.* (2016), Theilla *et al.* (2016) e Ozer *et al.* (2016) também utilizaram como controle positivo a cepa padrão de *C. parapsilosis* ATCC 22019, apresentando resultados com a CIM dentro dos critérios de sensibilidade proposto pelo CLSI-M27A2 (2002), semelhantes ao nosso estudo.

Para Nunes *et al.* (2011), *C. albicans* é a principal levedura isolada, principalmente em infecções nosocomiais, e o principal agente de fungemia no mundo, por isso a necessidade da realização de testes de sensibilidade nestas espécies. Para este autor, em seu estudo, em 81 isolados clínicos, 33 foram identificados como *C. albicans*, testados contra as drogas antifúngicas: fluconazol, anfotericina B, voriconazol e itraconazol, sendo

todos os isolados clínicos sensíveis às drogas testadas. Nos resultados de Ozer *et al.* (2016), não foi observado qualquer resistência das amostras clínicas aos antifúngicos testados. Para este autor ainda, a sensibilidade antifúngica de diferentes espécies de *Candida* não é uniforme, e cada um dos estudos tem um perfil de sensibilidade antifúngico específico. No estudo de Fornaria *et al.* (2016), todas as cepas isoladas de *C. albicans* foram sensíveis aos antifúngicos cetoconazol, anfotericina B, nistatina, fluconazol e itraconazol. Ainda sobre o estudo anterior, os autores relataram que *C. albicans* exibe uma sensibilidade variável aos diferentes tipos de triazólicos, tornando-se importante descrever o perfil de sensibilidade contra várias drogas antifúngicas para uma melhor conduta terapêutica. No estudo de Theilla *et al.* (2016), os autores realizaram testes de sensibilidade contra cepas de *C. albicans* isoladas de vulvovaginites, onde obtiveram valores de CIM muito abaixo dos preconizados pelo CLSI-M27A2 (2002), indicando que as drogas antifúngicas utilizadas (anfotericina B, cetoconazol, itraconazol, fluconazol, terbinafina e nistatina) apresentaram boa atividade *in vitro* contra as cepas testadas, reforçando que a espécie *C. albicans* foi sensível aos agentes antifúngicos testados, resultados semelhantes ao nosso estudo. Nos resultados de Silva *et al.* (2015), *C. albicans* também foi sensível nos testes de sensibilidade ao antifúngico testado (apenas o fluconazol). Ibrahim *et al.* (2014), identificaram que *C. albicans* foi mais sensível que espécies não *albicans* em seu estudo. Podemos concluir que todos os estudos referenciados anteriormente apresentaram *C. albicans* sensível aos antifúngicos testados, embora o fluconazol continue sendo o fármaco antifúngico de escolha para candidemias.

Contrário aos nossos resultados, no estudo de Chellan *et al.* (2010), a sensibilidade ao fluconazol, itraconazol, voriconazol, flucitosina, e anfotericina B foi avaliada para 130 isolados de *C. albicans*. A taxa de resistência dos isolados de *C. albicans* foi de 1,5 % para a flucitocina, 3,9 % para o fluconazol, 6,9 % para anfotericina B, 6,9 % para o voriconazol, e 17,7 % para o itraconazol. No estudo de Brito *et al.* (2007), avaliando a sensibilidade antifúngica de cinco espécies de *C. albicans* identificadas e isoladas de cães, encontrou os seguintes resultados: para a anfotericina B, três CIM com 0,25 µg/mL e duas CIM com 0,5 µg/mL, sendo todas as cepas sensíveis à este antifúngico; para o cetoconazol, todas as amostras foram superiores a 64 µg/mL, sendo, portanto, amostras consideradas resistentes à este antifúngico; para o fluconazol, quatro amostras tiveram CIM acima de 64 µg/mL, sendo consideradas amostras resistentes, e uma amostra com CIM igual a 2 µg/mL; e para o itraconazol, todas as amostras tiveram CIM acima de 16 µg/mL, sendo todas resistentes. Em outros estudos, dos mesmos autores (BRITO *et al.*, 2009a), amostras

coletadas de cães de diferentes raças, na região perianal, identificaram duas espécies de *C. albicans*, e avaliaram a sensibilidade antifúngica destas, sendo para a anfotericina B, uma cepa com CIM igual a 0,25 µg/mL e outra com CIM igual a 1 µg/mL, ambas consideradas sensíveis; para o cetoconazol, ambas cepas com CIM igual a 16 µg/mL, ainda consideradas sensíveis, segundo o CLSI-M27A2 (2002); para o fluconazol, uma cepa com CIM igual a 32 µg/mL, considerada sensível, e a outra cepa com CIM igual a 64 µg/mL, considerada uma cepa resistente, segundo o CLSI-M27A2 (2002); e para o itraconazol, ambas as cepas apresentaram CIM acima de 16 µg/mL, onde as duas são consideradas resistentes. Apesar das amostras do estudo de Brito *et al.* (2007) e Brito *et al.* (2009a) serem diferentes das amostras do presente estudo, podemos comparar o grau de sensibilidade e resistência utilizando a mesma metodologia e referência do CLSI (2002).

Mais estudos são necessários para complementar este no que diz respeito aos testes de sensibilidade, principalmente com outras espécies de *Candida*, como as espécies de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, de maior prevalência em muitos estudos. O tratamento com a terapia antifúngica específica proporciona benefício maior do que a terapia empírica (ZARDO; MEZZARI, 2004; BUSCA *et al.*, 2015).

Muitos autores afirmam, em suas pesquisas, que a maioria das infecções do pé diabético é de natureza polimicrobiana (MLINARIC-MISSONI *et al.*, 2005; NAIR *et al.*, 2006-2007; CHELLAN *et al.*, 2010; HEFNI *et al.*, 2012; GEMECHU *et al.*, 2013; CHADWICK, 2013). Estes mesmos estudos têm relatado sobre a prevalência e espectro de infecções bacterianas em pé diabético, no entanto, a magnitude das infecções fúngicas têm sido negligenciadas.

No presente trabalho, correlacionamos as infecções bacterianas com as infecções fúngicas, semelhantes a outras pesquisas descritas na literatura (MLINARIC-MISSONI *et al.*, 2005; NAIR *et al.*, 2006-2007; CHELLAN *et al.*, 2010; HEFNI *et al.*, 2012; GEMECHU *et al.*, 2013; CHADWICK, 2013). Das 62 culturas realizadas pelo laboratório terceirizado, foram identificadas 155 espécies de microrganismos, sendo 151 bactérias, onde as Gram negativas foram as mais prevalentes (99/151 – 65,56 %) e as bactérias Gram positivas em menor prevalência (52/151 – 34,44 %). Nota-se uma maior prevalência de bactérias Gram negativas devido à coleta das amostras, realizadas de tecidos profundos de pacientes diabéticos com úlceras nos pés, resultados estes semelhantes aos da literatura pesquisada (CARVALHO *et al.*, 2004; MLINARIC-MISSONI *et al.*, 2005; DUARTE;

GONÇALVES, 2011; HEFNI *et al.*, 2012; VIDAL, 2013; GEMECHU *et al.*, 2013; HADADI *et al.*, 2014).

Em 04 culturas foram identificadas, pelo laboratório terceirizado, leveduras do gênero *Candida* spp., de 2 espécies diferentes, sendo três culturas de *C.tropicalis* e uma cultura de *C.albicans*. Porém, em nosso estudo, todas as amostras foram identificadas fungos, através da metodologia micológica convencional.

Em nosso estudo, correlacionamos a presença de infecção bacteriana com a presença de infecção fúngica, e não observamos diferença significativa entre esses dois parâmetros analisados ($p = 0,0742$).

Segundo Nair *et al.* (2006-2007), feridas diabéticas têm um ambiente microbiológico complexo, com microrganismos mistos que muda ao longo do tempo. Grande parte das amputações de membros inferiores em diabéticos é precedida por infecções polimicrobianas em feridas. A sinergia entre bactérias e fungos tem um papel relevante no processo de cicatrização das feridas diabéticas. O atraso do processo de cicatrização correlaciona-se com as infecções mistas. Nos resultados de Mlinaric-Missoni *et al.* (2005), as infecções fúngicas isoladas estavam presentes em 31,80 % dos pacientes, porém 68,20 % dos pacientes apresentaram infecções mistas por fungos e bactérias, com mais severas consequências. Dos isolados bacterianos, a maioria eram Gram negativos, por se tratar de amostras coletadas de tecidos profundos, sendo as espécies do gênero *Enterobacteriaceae* (*Proteus* spp., *Serratia* spp., *Morganella* spp.) e *P.aeruginosa* spp. as mais prevalentes, resultados estes semelhantes aos nossos. No estudo de Lee *et al.* (2014), os autores afirmam que muitos estudos na literatura relatam sobre a incidência das infecções bacterianas em pé diabético, no entanto, as infecções fúngicas tem recebido pouca atenção. Ainda nesse estudo, o autor relata possível relação entre a infecção fúngica e o atraso na cicatrização das feridas, sendo importante estudar a real patogenicidade dos fungos nas feridas do pé diabético e sua possível contribuição para o retardamento da cicatrização das feridas. Além disso, o tratamento com antifúngicos precisa ser levado em consideração.

No estudo de Nair *et al.* (2006-2007), os pacientes avaliados tiveram de 6 a 8 semanas para cicatrização completa das úlceras calcêneas, devido à natureza polimicrobiana presente nas feridas. No caso clínico do estudo de Chadwik (2013), foi realizada a cultura e identificou o sinergismo entre *S. aureus* e *Candida* spp., dificultando a cicatrização dos pacientes avaliados. Nos resultados de Chellan *et al.* (2010), de 518 pacientes estudados, a prevalência de bactérias nas infecções em tecidos profundos foi de 79,70 % (413/518). Entre

estes, 55,30 % foram Gram negativas e 44,70 % foram Gram positivas. As bactérias predominantes foram: *Enterococcus faecalis* (14,10 %), *S. aureus* (12,20 %), *P.aeruginosa* (10,80 %), *Klebsiella pneumoniae* (7,90 %), *Escherichia coli* (7,70 %) e *Staphylococcus coagulase negativo* (5,80 %). Ainda sobre o estudo anterior, quando dois patógenos oportunistas, como *P. aeruginosa* e *C. albicans* ou *S. aureus* e *C. albicans*, estão presentes em feridas diabéticas, houve um maior tempo de duração para cicatrização das feridas. O sinergismo entre as espécies do gênero *Enterobacteriaceae* e espécies do gênero *Candida* spp. aumenta o potencial patogênico e a habilidade de ampliar as úlceras nos pés, indicando que *Candida* spp. possuem papel secundário na iniciação e duração de úlceras em pé diabético. Os autores citados anteriormente concluem que algumas bactérias agem em sinergia mista microbiana com fungos e infecções mistas aeróbia-anaeróbia. O efeito sinérgico pode ser devastador para o paciente, causando inúmeros procedimentos cirúrgicos (desbridamentos, revascularizações e arteriografias), com consequente óbito do paciente diabético.

Contrariamente aos estudos anteriores e aos nossos resultados, no estudo de Hefni *et al.* (2012), de 75 pacientes avaliados, 52 % das culturas revelaram a presença de um único microrganismo, 40 % tinham infecções mistas, bactérias e fungos (principalmente bactérias Gram negativas aeróbias e leveduras do gênero *Candida*, respectivamente, sendo mais indicado prescrever antibacterianos e antifúngicos contra bactérias e fungos dessa natureza) e 8 % não apresentaram crescimento. Ainda sobre o estudo anterior, os autores afirmam que a gravidade da infecção foi proporcional à profundidade da infecção.

Não podemos afirmar quais foram os critérios realizados pelos clínicos e cirurgiões para solicitar exames de cultura, visto que 62 pacientes foram solicitados exames de culturas e 15 pacientes não foram solicitados, além de o próprio laboratório terceirizado ter realizado apenas quatro culturas fúngicas, com os resultados semelhantes ao da presente pesquisa, onde, em todas as amostras, tiveram crescimento fúngico. Em nosso estudo, correlacionamos a presença de infecção com os resultados dos exames de culturas dos pacientes, e não observamos significância estatística entre esses dois parâmetros analisados ($p = 0,0638$). Em vista dos resultados apresentados anteriormente, é necessário que o laboratório terceirizado que presta serviços ao HRN, solicite exames de culturas, tanto para bactérias como para fungos, para pacientes diabéticos portadores de úlceras nos pés. Portanto, clínicos e cirurgiões precisam solicitar exames de culturas de fungos de rotina, de

forma complementar as culturas bacterianas, para o tratamento adequado das úlceras em pé diabético.

O desfecho clínico dos pacientes elegíveis para este estudo foi avaliado em termos de recidivas e revascularizações e altas e óbitos. Feridas diabéticas são constantemente reinfectadas quando não há o controle sanitário e glicêmico necessários, havendo um aumento do tempo de hospitalização do paciente. Neste estudo, um alarmante dado encontrado foi que 97,40 % dos pacientes (75/77) retornaram para o Centro Cirúrgico do HRN para a realização de um novo procedimento de desbridamento (média de duas amostras por paciente). Medidas de autocuidado, conhecimento sobre a doença e suas complicações, e controle sanitário e bioquímico (glicemia, glico-hemoglobina e neuropatia diabética) são necessários informar aos pacientes diabéticos constantemente. Em nosso estudo, correlacionamos a realização de cirurgias de desbridamentos com a presença de infecção e a falta de controle glicêmico (glicemia de jejum), e não observamos diferença significativa entre esses três parâmetros analisados ($p = 0,0805$ e $p = 0,0741$, respectivamente). Segundo Vidal (2009), úlceras já cicatrizadas têm maior probabilidade de se recontaminarem se não forem adotadas medidas preventivas. Desta informação anterior, 7 a 20 % podem evoluir para amputação.

Para Hadadi *et al.* (2014), dos 196 pacientes, 25 (12,10 %) realizaram desbridamentos cirúrgico. Wijesuriya *et al.* (2014), do total de pacientes elegíveis para o estudo (385), 39 % dos pacientes fizeram procedimento cirúrgico anteriormente (desbridamentos, arteriografia e/ou revascularizações). Singh *et al.* (2013), afirmam que o desbridamento da ferida pode acelerar a cicatrização, removendo o tecido necrosado, materiais particulados ou materiais estranhos e carga microbiana. A revascularização é útil sempre quando a isquemia se agravar.

Como uma das últimas medidas de alívio para o paciente diabético, os médicos vasculares realizam o procedimento de revascularização, em que, neste estudo, foram realizados em 20,78 % dos pacientes (16/77). Em nosso estudo, correlacionamos a realização da cirurgia de revascularização com a presença de infecção e a falta de controle glicêmico, e não observamos diferença significativa entre esses três parâmetros analisados ($p = 0,9746$ e $p = 0,9829$, respectivamente). Segundo Nair *et al.* (2006-2007), tecidos desvitalizados são mais propensos à infecção e dificuldade de cicatrização, sendo necessários cirurgias de revascularização para melhorar o fluxo sanguíneo periférico. No estudo de Vidal (2009), diante de um trauma maior, há necessidade de maior fluxo

sanguíneo para a região dos membros inferiores, pela ativação dos sistemas complemento e cininas que, dentre outras funções, aumentam a permeabilidade dos capilares sanguíneos para a rápida chegada das células de defesas e início do processo de reconstrução tissular. A deficiência da circulação periférica prejudica a resposta ao trauma, dificultando a cicatrização e favorecendo processos infecciosos, por isso a necessidade de revascularizações recorrentes na tentativa de evitar a amputação do pé de pacientes portadores de úlceras.

Para os critérios de alta ou óbito dos pacientes, foi levado em consideração apenas o período do estudo vigente. Um dado alarmante coletado pelo autor foi que 14,29 % dos pacientes (11/77) foram a óbito por complicações vasculares em pacientes diabéticos. Em nosso estudo, correlacionamos a alta hospitalar do paciente com a presença de infecção e a falta de controle glicêmico, e não observamos diferença significativa entre esses três parâmetros analisados ($p = 0,0685$ e $p = 0,5959$, respectivamente). Também correlacionamos o óbito do paciente com a presença de infecção e a falta de controle glicêmico, e não observamos diferença significativa entre esses três parâmetros analisados ($p = 0,0770$ e $p = 0,5959$, respectivamente). Como a pesquisa foi realizada através de coleta de dados em prontuários, não conseguimos obter todos os dados de alta ou óbito dos pacientes, estando ausente em 15,58 % dos pacientes (12/77). A perda desses dados prejudicou algumas análises e correlações a fim de estimar a real dimensão das complicações que sofrem os pacientes diabéticos, bem como o desfecho clínico do paciente. Estratégias de prevenção no nível primário devem ser adotadas, principalmente no desenvolvimento do autocuidado e no autogerenciamento do controle glicêmico e sanitário dos pacientes, podendo reduzir essa elevada taxa de mortalidade, apresentada neste estudo, no futuro. No estudo de França *et al.* (2008), encontraram uma elevada taxa de mortalidade (56 %), dentre os pacientes selecionados para o estudo (100 pacientes), diagnosticados com candidemia, associados a outras variáveis, como a gravidade da doença base (diabetes *mellitus*, neoplasia e doenças vasculares), idade do paciente, espécie fúngica identificada, internamento na UTI e prognóstico, apesar da maioria ter recebido tratamento antifúngico prévio, durante o período do estudo. No estudo de Chakrabarti *et al.* (2009), 6 pacientes adultos continham diabetes associado a casos de candidemia, onde todos estes foram a óbito durante o período do estudo.

Em vista do exposto, é necessária a correta compreensão sobre as consequências do mau controle do DM e estimular os pacientes a mudar suas crenças e mitos adquiridos ao

longo de sua convivência com a doença. O baixo entendimento dos pacientes sobre o processo saúde-doença do DM pode ter sido o principal fator de amputações e óbitos. O autocuidado é fator importante na prevenção de complicações em pés diabéticos e, para bom controle da doença, é preciso autogerenciamento efetivo. Os profissionais da saúde devem conscientizar os pacientes de forma a modificar sua atitude quanto ao autocuidado e aderir às recomendações de como cuidar dos pés.

Como a pesquisa foi realizada através de coleta de dados em prontuários, não conseguimos obter todos os dados necessários. Parâmetros importantes como a neuropatia periférica, glico-hemoglobina e glicemia pós-prandial foram os dados ausentes no presente estudo. A perda desses dados prejudicou algumas análises e correlações com o desenvolvimento de úlcera no pé. As estratégias de prevenção no nível primário da saúde devem ser voltadas para a independência do paciente no desenvolvimento do autocuidado e no autogerenciamento do controle glicêmico e sanitário.

7 CONCLUSÃO

As infecções fúngicas dos pés em pessoas com diabetes não devem ser ignoradas, principalmente porque as espécies de *Candida* possuem potencial papel na patogênese da ulceração dos pés, e estas estavam presentes em todos os isolados fúngicos de nosso estudo, com maior prevalência da espécie *C. tropicalis*. Dessa forma, a avaliação clínica e laboratorial micológica, ausente no HRN, é necessária nos pacientes diabéticos portadores de úlceras nos pés. As infecções nos pés de pacientes diabéticos requerem atenção cuidadosa e gestão coordenada por uma equipe multidisciplinar, reforçando ações preventivas e conscientizando os pacientes sobre a importância do controle glicêmico, uso de calçados adequados, prevenção de traumatismos e autoexame diário nos pés. A alta taxa de amputação observada no presente estudo poderia contribuir para o fato de que a maioria dos pacientes terem sido encaminhados ao Centro Cirúrgico tardiamente, alguns sendo residentes em locais ou sítios distantes, sem nenhuma unidade básica de saúde próxima, e predominantemente sem escolaridade, justificando sua falta de conhecimento para com a doença e suas complicações. Educando e orientando os pacientes e solicitando para inspecionar os pés com mais frequência pode diminuir as complicações relacionadas ao diabetes. O tratamento deve envolver cuidados, levando em consideração as comorbidades dos pacientes diabéticos, principalmente a hipertensão. O tratamento com antifúngicos e antibacterianos associados deve ser iniciado o mais cedo possível para impedir a gravidade do pé diabético, e medidas preventivas devem ser utilizadas para evitar a infecção e reinfecção, visto que nenhuma terapia antifúngica foi adotada para os pacientes neste estudo, no período avaliado. Aos médicos são recomendados solicitar culturas micológicas antes do início ou durante a antibioticoterapia empírica. Apesar das cepas de *C. albicans* serem todas consideradas sensíveis, não se pode negligenciar o uso racional de antifúngicos, a fim de não sofrermos com a problemática da resistência microbiana futura. É necessária a padronização de metodologias mais diretas e baratas para permitir o conhecimento da sensibilidade dos isolados clínicos. As metodologias padronizadas até o momento são difíceis de serem executadas no laboratório clínico de rotina, devido a sua complexidade de realização ou, quando comerciais, apresentam custo elevado. Havendo essa padronização e praticidade, o perfil de sensibilidade poderá ser realizado na rotina laboratorial, contribuindo para o sucesso da terapêutica.

REFERÊNCIAS

- ACHKAR, J. M.; FRIES, B. C. *Candida* infections of the genitourinary tract. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 23, p. 253–273, 2010.
- ALAM, M. Z.; ALAM, Q.; JIMAN-FATANI, A.; KAMAL, M. A.; ABUZENADAH, A. G.; CHAUDHARY, A. G. *Candida* identification: a journey from conventional to molecular methods in medical mycology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 1437–1451, 2014.
- ALFOUZAN, W.; DHAR, R.; ASHKANANI, H.; GUPTA, M.; RACHEL, C.; KHAN, Z. U. Species spectrum and antifungal susceptibility profile of vaginal isolates of *Candida* in Kuwait. **Journal of Mycology Medical**, v. 25, n. 1, p. 23–28, 2015.
- AL-HEDAITHY, S. Spectrum and proteinase production of yeasts causing vaginitis in Saudi Arabian women. **Medical Science Monitor**, v. 8, n. 7, p. 498–501, 2002.
- AL-MAMARI, A.; AL-BURYHI, M.; AL-HEGGAMI, M. A.; AL-HAG, S. Identify and sensitivity to antifungal drugs of *Candida* species causing vaginitis isolated from vulvovaginal infected patients in Sana'a city. **Der Pharma Chemica**, v. 6, n. 1, p. 336–342, 2014.
- ALANIO, A.; SITTERLE, E.; LIANCE, M.; FARRUGIA, C.; FOULET, F.; BOTTEREL, F. Low prevalence of resistance to azole in *Aspergillus fumigatus* in a French cohort of patients treated for haematological malignancies. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 371–374, 2011.
- ALPAT, S. N.; OZGÜNES, I.; ERTEM, O. T.; ERBEN, N.; KARTAL, E. D.; TOZÜN, M. Evaluation of risk factors in patients with candiduria. **Mikrobiyoloji Bulteni**, v. 45, p. 318–324, 2011.
- ALVES, I. A.; CAMARGO, F. P.; GOULART, L. S. Identificação por PCR e sensibilidade a antifúngicos de isolados clínicos vaginais de *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 5, p. 575-579, set-out, 2010.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Standards of medical care for patients with diabetes *mellitus*. Position statement. **Diabetes Care**, v. 30, n. 1, p. 33-43, Jan. 2001.
- _____. Guide to diagnosis and classification of diabetes *mellitus* and other categories of glucose intolerance. **Diabetes Care**, v. 20, n. 1, p. 21, Jan. 1997.
- _____. Diagnosis and classification of diabetes *mellitus*. **Diabetes Care**, v. 32, p. 62 - 67, Jan. 2009.
- _____. Standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care**, v. 32, n. 1, p. 13 - 61, Jan. 2009.

ARAÚJO, C. R.; MIRANDA, K. C.; PASSOS, X. S.; SOUZA, L. K. H.; LEMOS, J. A.; KHRAIS, C. H. A.; COSTA, C. R.; SILVA, M. R. R.; FERNANDES, O. F. L. Identificação das leveduras do gênero *Candida* por métodos manuais convencionais e pelo método cromógeno chromagar *Candida*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 1, p. 37-42. jan.-abr. 2005.

ARECHAVALA, A. I.; BIANCHI, M. H.; ROBLES, A. M.; SANTISO, G.; NEGRONI R. Identification and susceptibility against fluconazole and albaconazole of 100 yeasts strains isolated from vaginal discharge. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 24, n. 23, p. 305-315, 2007.

ARMSTRONG, D. G.; LAVERY, L. A.; HARKLESS, B. Who is at risk for diabetic foot ulceration? **Clinics Podiatric Medicine Surgery**, v. 2, n. 3, p. 34-41, 1998.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10520**: Apresentação de citações em documentos. Rio de Janeiro, 2002.

ASTICCIOLI, S.; SACCO, L.; DATURI, R. Trends in frequency and *in vitro* antifungal susceptibility patterns of *Candida* isolates from women attending the STD outpatients clinic of a tertiary care hospital in Northern Italy during the years 2002–2007. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.31, n.28, p. 204-228, 2009.

ATALAY, M. A.; KOC, A. N.; SAV, H.; DEMIR, G. *Candida* species isolated from urine specimens and antifungal susceptibility in hospitalized patients. **Turk Hij Den Biyol Derg.** v. 70, n. 69, p.185-190, 2013.

BABIN, D.; KOTIGADDE, S.; RAO, P.; RAO, T. V. Clinico-mycological profile of vaginal candidiasis in a tertiary care hospital in Kerala. **International Journal of Biological Research**, v. 3, n. 1, p. 55–59, 2013.

BANSAL, E.; GARG, A.; BHATIA, S.; ATTRI, A. K.; CHANDER, J. Spectrum of microbial flora in diabetic foot ulcers. **Indian Journal Pathology Microbiology**, v. 51, n.5, p. 204-208, 2008.

BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidiasis. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 4, n. 5, p. 22–38, 2010.

BASSETTI, M.; PEGHIN, M.; TIMSIT, J. F. The current treatment landscape: candidiasis. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 69, p. 13–22, 2016.

BOULTON, A.; PEDROSA, H.C. **Endocrinologia clínica: Abordagem diagnóstica, terapêutica e preventiva da neuropatia periférica**. In: VILAR, L. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.126 - 144.

BOURGEOIS, N.; DEHANDSCHOEWERCKER, L.; BERTOUT, S.; BOUSQUET, P. J.; RISPAIL, P.; LACHAUD, L. Antifungal susceptibility of 205 *Candida* species isolated

primarily during invasive Candidiasis and comparison of the Vitek 2 system with the CLSI broth microdilution and E-test methods. **Journal Clinical Microbiology**, v. 48, n. 45, p. 154-161, 2010.

BRILHANTE, R. S. N.; PAIVA, M. A. N.; SAMPAIO, C. M. S.; CASTELO-BRANCO D. S. C. M.; TEIXEIRA, C. E. C.; ALENCAR, L. P.; BANDEIRA, T. J. P. G.; MONTEIRO, A. J.; CORDEIRO, R. A.; PEREIRA NETO, W. A.; SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B.; ROCHA, M. F.G. Azole resistance in *Candida* spp. isolated from Catú Lake, Ceará, Brazil: an efflux-pump-mediated mechanism. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 33–38, 2016.

BRITO, E. H. S.; FONTENELLE, R. O. S.; BRILHANTE, R. S. N.; ROSSANA, A. CORDEIRO, R. A.; SOARES JÚNIOR, F. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Phenotypic characterization and *in vitro* antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *Malassezia pachydermatis* strains from dogs. **The Veterinary Journal**, v. 174 n.6, p. 147–153, 2007.

BRITO, E. H. S.; FONTENELLE, R. O. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. The anatomical distribution and antimicrobial susceptibility of yeast species isolated from healthy dogs. **The Veterinary Journal**, v. 182, n. 2, p. 320–326, 2009a.

BRITO, E. H. S.; FONTENELLE, R. O. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MELO, L. M.; SIDRIM, J. J. C.; ALBUQUERQUE, E. S.; ROCHA, M. F. G. PCR-AGE, automated and manual methods to identify *Candida* strains from veterinary sources: A comparative approach. **Veterinary Microbiology**, v. 139, n.1, p. 318–322, 2009b.

BUSCA, A.; TORTORANO, A. M.; PAGANO, L. Reviewing the importance and evolution of fungal infections and potential antifungal resistance in haematological patients. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 3, n. 4, p. 237-241, Dec., 2015.

BUSCEMI, L.; ARECHAVALA, A.; NEGRONI, R. Study of acute vulvovaginitis in sexually active adult women, with special reference to candidosis, in patients of the Francisco J. Muniz Infectious Diseases Hospital. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 21, n. 20, p. 177-181, 2014.

BYOSYSTEMS. Instruções de uso. Ágar Sabouraud com cloranfenicol. Marca: Himedia. Disponível em <www.biosystems.com.br>. Acesso em: 19 jul. 2016.

CAMPOY S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, 2016. No prelo.

CANNON, R. D.; LAMPING, E.; HOLMES, A. R.; NIIMI, K.; BARET, P. V.; KENIYA, M. V.; TANABE, K.; NIIMI, M.; GOFFEAU, A.; MONK, B. C. Efflux-mediated antifungal drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 20, p. 291-321, 2009.

CARVALHO, C. B. M.; NETO, R. M; ARAGÃO, L. P.; OLIVEIRA, M. M.; NOGUEIRA, M. B.; FORTI, A. C. Pé diabético: Análise Bacteriológica de 141 casos. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, n.3, p. 203-210, 2004.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Epi Info 7 User Guide**. Disponível em <<http://www.cdc.gov/epiinfo>>. Acesso em: 20 dez. 2014.

CEARÁ. Governo do Estado de Ceará. Assessoria de Comunicação da SESA. Disponível em <<http://www.ceara.gov.br/sala-de-imprensa/noticias/7375-hospital-regional-norte-maior-hospital-do-interior-do-ne-sera-inaugurado-sexta-feira-18>>. Acesso em: 22 jul. 2016.

CHADWICK, P. Fungal infection of the diabetic foot: the often ignored complication. **Diabetic Foot Canada**, v. 1(2): n. 5, p. 20–24, 2013.

CHAKRABARTI, A.; CHATTERJEE, S. S.; RAO, K. L. N.; ZAMEER, M. M.; SHIVAPRAKASH, M. R.; SINGHI, S.; SINGH, R.; VARMA, S. C. Recent experience with fungaemia: change in species distribution and azole resistance. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 41, n. 40, p. 275-284, 2009.

CHELLAN, G.; SHIVAPRAKASH, S.; RAMAIYAR, S. K.; VARMA, A. K.; VARMA, N.; SUKUMARAN, M. T.; VASUKUTTY, J. R.; BAL, A.; KUMAR, H. Spectrum and Prevalence of Fungi Infecting Deep Tissues of Lower-Limb Wounds in Patients with Type 2 Diabetes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.6, p. 2097-2102, 2010.

CISTERNA, R.; EZPELETA, G.; TELLERIA, O.; GUINEA, J.; REGUEIRO, B.; GARCIA-RODRÍGUEZ, J.; ESPERALBA, J. Nationwide Sentinel Surveillance of Bloodstream *Candida* Infections in 40 Tertiary Care Hospitals in Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 11, p. 51-60, 2010.

CLEMENT, K. M. T.; HEIDE, M. D.; VINCENT, R.; WIELAND, M. Re-examining the phylogeny of clinically relevant *Candida* species and allied genera based on multigene analyses. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 32, p. 651–659, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Método de Referência para testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à terapia Antifúngica: Norma Aprovada - Segunda Edição (2002)**. Volume 22, Número 15. Documento M27-A2. Disponível em <<http://clsi.org/>>. Acesso em: 20 dez. 2014.

CONSENSO INTERNACIONAL SOBRE PÉ DIABÉTICO. Grupo de Trabalho Internacional sobre o Pé Diabético. **Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal**. Direção: Pedrosa, H.C., Brasília, 2001. 20p.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816-2823, 2006.

CORRÊA, P. R.; DAVID, P. R. S.; PERES, N. P.; CUNHA, K. C.; ALMEIDA, M. T. G. Caracterização fenotípica de leveduras isoladas da mucosa vaginal em mulheres adultas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 7, n. 5, p. 177–185, 2009.

CROSS, E. W.; PARK, S.; PERLIN, D. S. Cross-resistance of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to over-the-counter azoles used in the treatment of vaginitis. **Microbial Drug Resistance**, v. 6, n.8, 155-161, 2000.

DALAZEN, D.; ZANROSSO, D.; WANDERLEY, L.; SILVA, N. L.; FUENTEFRIA, A. M. Comparação do perfil de suscetibilidade entre isolados clínicos de *Candida* spp. orais e vulvovaginais no Sul do Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 16, n. 47, p. 33-38, 2011.

DANGELSER, G.; BESSON, S.; GATINA, J. H.; BLICKLÉ J. F. Amputations among diabetes in Reunion Island. **Diabetes & Metabolism**, v. 29, n. 6, p. 628 - 634, Dez. 2003.

DHANASEKARAN, D.; VINOTHINI, K.; LATHA, S.; THAJUDDIN, N.; PANNEERSELVAM, A. Human dental biofilm: Screening, characterization, *in vitro* biofilm formation and antifungal resistance of *Candida* spp. **The Saudi Journal for Dental Research**, v. 5, n. 6, p. 55-70, 2014.

DIEZMANN, S.; COX, C. J.; SCHÖNIAN, G.; VILGALYS, R. J.; MITCHELL, T. G. Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: a multigenic analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 40, p. 5624-5635, 2004.

DOTA, K.; FREITAS, A.; CONSOLARO, M.; SVIDZINSKI, T. I. A. Challenge for clinical laboratories: detection of antifungal resistance in *Candida* species causing vulvovaginal candidiasis. **Science**, v. 42, n. 2, p. 87-93, 2011.

EKELI, A.; DOLAPCI, I.; EMRAL, R.; CESUR, S. *Candida* carriage and *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples of type 1 diabetic *mellitus* patients. **Mycoses**, v. 47, n.50, p. 315-318, 2004.

ELFEKY, D. S.; GOHAR, N. M.; EL-SEIDI, E. A.; EZZAT, M. M.; SOMAIA, ABOELEW, H. Species identification and antifungal susceptibility pattern of *Candida* isolates in cases of vulvovaginal candidiasis. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 52, n. 3, p. 269-277, Sep., 2016.

EL-SAYED, H.; HAMOUDA, A. *Candida albicans* causing vulvovaginitis and their clinical response to antifungal therapy. **Egypt Journal Medical Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 53-62, 2007.

EMMANUEL, N.; ROMEO, O.; MEBI, A.; MARK, O.; SCORDINO, F.; BESSY, E. I. Genotyping and fluconazole susceptibility of *Candida albicans* strains from patients with vulvovaginal candidiasis in Jos, Nigeria. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, n. 3, p. 48-50, 2012.

ENER B. *In vitro* antifungal susceptibility tests: standardization and clinical significance. **Mikrobiyoloji Bulteni**, v. 30, p. 419-425, 1996.

EMORI, T. G.; GAYNES, R. P. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 5, p. 428-442, 2013.

FATA, S.; SAEED MODAGHEGH, M. H.; FAIZI, R.; NAJAFZADEH, M. J.; AFZALAGHAEI, M.; GHASEMI, M.; MOHAMMADIAN, M.; NASERI, A.; MESHKAT, M.; FATA, A. Mycotic infections in diabetic foot ulcers in Emam Reza hospital, Mashhad, 2006-2008. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v.4, n.1, p.11-16, 2010.

FEBRE, N.; SILVA, V.; MEDEIROS, E. A. S.; WEY, S. B.; COLOMBO, A. L.; FISCHMAN, O. Microbiological characteristics of yeasts isolated from urinary tracts of intensive care unit patients undergoing urinary catheterization. **Journal Clinical Microbiology**, v. 37, n. 35, p. 1584-1596, 2009.

FERRAZZA, M. H. S. H.; MALUF, M. L.; CONSOLARO, M. E. L.; SHINOBU, C. S.; SVIDZINSKI, T. I. E.; BATISTA, M. R. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 36, p. 58–63, 2005.

FIOCRUZ. **Nível de Biossegurança 2 (NB-2), 1998**. Disponível em: http://www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/lab_virtual/nb2.html. Acesso em: 20 dez. 2014.

FORNARIA, G.; VICENTE, V. A.; GOMES, R. R.; MURO, M. D.; PINHEIRO, R. L.; FERRARI, C.; HERKERT, P. F.; TAKIMURA, M.; CARVALHO, N. S.; QUEIROZ-TELLES, F. Susceptibility and molecular characterization of *Candida* species from patients with vulvovaginitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n.45, p. 373–380, 2016.

FRANÇA, J. C. B.; RIBEIRO, C. E. L.; QUEIROZ-TELLES, F. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, n.1, p. 23-28, jan-fev, 2008.

GAGLIARDI, A. R. T. Neuropatia diabética periférica. **Journal Vascular Brasileiro**, v. 2, n. 1, p. 23-30, 2003.

GALLE, L. C.; GIANINNI, M. J. S. M. Prevalência e suscetibilidade de leveduras vaginais. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n 39, p. 229-236, 2004.

GAMARRA, S.; MORANO, S.; DUDIUK, C.; MANCILLA, E.; NARDIN, M. E.; MENDEZ, E.; GARCIA-EFFRON, G. Epidemiology and antifungal susceptibilities of yeasts causing vulvovaginitis in a teaching hospital. **Mycopathologia**, v. 8, n. 9, p. 178-185, 2014.

GEMECHU, F.; SEEMANT, F.; CURLEY, A. C. Diabetic Foot Infections. **American Academy of Family Physicians**, v. 88, n. 3, p. 120-129, 2013.

GIRMENIA, C.; TUCCINARDI, C.; SANTILLI, S. *In vitro* activity of fluconazole and voriconazole against isolates of *Candida albicans* from patients with haematological malignancies. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 45, p. 479-483, 2000.

GONDO, D. C. A. F.; DUARTE, M. T. C.; SILVA, M. G.; PARADA, C. M. G. L. Abnormal vaginal flora in low-risk pregnant women cared for by a public health service:

prevalence and association with symptoms and findings from gynecological exams. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 8, n. 10, p. 919–927, 2010.

GROSS, J. L.; SILVEIRO, S. P.; CAMARGO, J. L.; REICHELT, A. J.; AZEVEDO M. J. Diabetes *Mellitos*: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica**, v. 46 n. 1, p. 85-93, 2002.

GULTEKIN, B.; YAZICI, V.; AYDIN, N. Distribution of *Candida* species in vaginal specimens and evaluation of CHROMagar *Candida medium*. **Mikrobiyoloji Bulteni**, v. 39, n. 3, 319–324, 2005.

GUZEL, A. B.; JJKIT, M.; AKAR, T.; BURGUT, R.; DEMIR, C. Evaluation of risk factors in patients with vulvovaginal candidiasis and the value of chrom ID *Candida* agar versus CHROMagar *Candida* for recovery and presumptive identification of vaginal yeast species. **Medical Mycology**, v. 149, n. 31, p. 16–25, 2007.

HADADI, A.; GHIASI, H. O.; HAJIABDOLBAGHI, M.; ZANDEKARIMI, M.; HAMIDIAN, R. Diabetic Foot: Infections and Outcomes in Iranian Admitted Patients. **Jundishapur Journal Microbiology**, v. 6, n. 1-9, p. 10-19, 2014.

HEALD, A. H.; O'HALLORAN, D. J.; RICHARDS, K. Fungal infection of the diabetic foot: two distinct syndromes. **Diabetic Medicine**, v. 18, n.7, p. 567-72, 2001.

HEFNI, A. A. H., IBRAHIM, A. M. R., ATTIA, K. M., MOAWAD, M. M., EL-RAMAH, A. F., SHAHIN, M. M., AL-MOLLA, M.; AL-SATAR, L. A. Bacteriological study of diabetic foot infection in Egypt. **Journal of the Arab Society for Medical Research**, v.2, p. 456-464, 2012.

HIMEDIA LABORATÓRIOS. Instruções de uso. Ágar batata dextrose. Marca: Himedia. Disponível em <www.himedialabs.com.br>. Acesso em: 19 jul. 2016.

HOCHMAN, B.; NAHAS, F. X.; OLIVEIRA FILHO, R. S.; FERREIRA, L. M. Desenhos de pesquisa. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 1-8, 2005.

HOLLAND, J.; YOUNG, M.; LEE, O.; LEE, S. Vulvovaginal carriage of yeasts other than *Candida albicans* species. **Sexually Transmitted Infections**, v. 79, n. 3, p. 249–250, 2003.

HOLLENBACH, E. To treat or not to treat e critically ill patients with candiduria. **Mycoses**, v. 51, n. 50, p. 12-24, 2008.

IBRAHIM, N. H.; MELAKE, N. A.; SOMILY, A. M.; ZAKARIA, A. S.; BADDOUR, M. M.; MAHMOUD, A. Z. The effect of antifungal combination on transcripts of a subset of drug-resistance genes in clinical isolates of *Candida* species induced biofilms. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 1, p. 55-66, Jan., 2015.

IMAN, K. B.; SHOROUK, K. E. H.; MUHMOUD, M. *Candida* infection associated with urinary catheter in critically ill patients. Identification, antifungal susceptibility and risk factors. **Research Journal of Medical Science**, v. 5, n. 6, p. 79-86, 2010.

KAUFFMAN, C. A.; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D.; GALLIS, H. A.; MCKINSEY, D. S.; KARCHMER, A. W. Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. 25, p. 14-18, 2010.

KAUR, R.; DHAKAD, M. S.; GOYAL, R.; KUMAR, R. Emergence of non-*albicans* *Candida* species and antifungal resistance in intensive care unit patients. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 5, p. 455-460, May., 2016.

KING, H.; AUBERT, R. E.; HERMAN, W. H. Global burden of diabetes 1995-2025: prevalence, numerical estimates and projections. **Diabetes Care**, v.21, p.1414-1431, 1998.

KIKANI, B.; KIKANI, K.; PATHAK, S. Effects of chemically synthesized azole compounds on clinical isolates of vaginal candidiasis, in comparison with commercially available drugs. **The Internet Journal of Microbiology**, v.4, n. 2, p. 1-5, 2008.

KOEHLER, A.; CHU, K.; HOUANG, E. T.; CHENG, A. F. Simple, reliable, and cost-effective yeast identification scheme for the clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 422–436, 1999.

LATTIF, A. A. Molecular typing and *in vitro* fluconazole susceptibility of *Candida* species isolated from diabetic and non-diabetic women with vulvovaginal candidiasis in India. **Journal of Microbiology Immunology and Infection**, v. 44, n. 45, p. 166–171, 2011.

LEE, W. J.; PARK, K. H.; JANG, Y. H.; LEE, S. J.; KIM, D. W. Isolation of *Trichophyton rubrum* from Diabetic Foot Ulcers of 4 Patients. Case Report. **Korean Journal Medical Mycology**, v. 19, n. 1, 2014.

LI, X.; ROBBINS, N.; O'MEARA, T. R.; COWEN, L. E. Extensive functional redundancy in the regulation of *Candida albicans* drug resistance and morphogenesis by lysine deacetylases Hos2, Hda1, Rpd3 and Rpd31. **Molecular Microbiology**, 2016. No prelo.

LINHARES, L. M.; WITKIN, S. S.; MIRANDA, S. D.; FONSECA, A. M.; PINOTTI, J. A.; LEDGER, W. J. Differentiation between women with vulvovaginal symptoms who are positive or negative for *Candida* species by culture. **Infectious Disease in Obstetrics and Gynecology**, v. 29, n. 19, p. 221-229, 2001.

LOPES-CONSOLARO, M. E.; ALBERTONI, A. T.; SHIZUE-YOSHIDA, C.; PERALTAR, M.; ESTIVALET-SVIDZINSKI, T. I. Correlation of *Candida* species and symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in Maringa, Parana, Brazil. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 21, n. 20, p. 205-227, 2004.

LUNDSTROM, T.; SOBEL, J. Nosocomial candiduria: a review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 30, p. 1602-1607, 2011.

MALERBI, D. A.; FRANCO, L. J. Multicenter study of the prevalence of diabetes *mellitus* and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69. The Brazilian cooperative group on the study of diabetes prevalence. **Diabetes Care**, v.15, n. 10, p.1509-1516, 1992.

MAHMOUDI RAD, M.; ZAFARGHANDI, S.; ABBASABADI, B.; TAVALLAE, E. M. The epidemiology of *Candida* species associated with vulvovaginal candidiasis in an Iranian patient population. **European Journal Obstetrics and Gynaecology and Reproductive Biology**, v. 5, n. 6, p. 199–203, 2010.

MAHMOUDABADI, A.; NAJAFYAN, M.; ALIDADI, M. Clinical study of *Candida* vaginitis in Ahvaz, Iran and susceptibility of agents to topical antifungal. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v. 26, n. 3, p. 607–610, 2010.

MARDH, P.; RODRIGUES, A.; GENC, M.; NOVIKOVA, N.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J.; GUASCHINO, S. Facts and myths on recurrent vulvovaginal candidosis – a review on epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, pathogenesis and therapy. **International Journal of STD & AIDS**, v. 13, n. 8, p. 522–539, 2002.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 5, p.449-460, 2006.

MATHEMA, B.; CROSS, E.; DUN, E.; PARK, S.; BEDELL, J.; SLADE, B.; WILLIAMS, M.; RILEY, L.; CHATURVEDI, V.; PERLIN, D. S. Prevalence of vaginal colonization by drug-resistant *Candida* species in college-age women with previous exposure to over-the-counter azole antifungals. **Clinical Infectious Disease**, v. 33, n. 23, p. 763-774, 2001.

MENEZES, E. A.; MENDES, L. G.; CUNHA, F. A. Resistência a antifúngicos de *Candida tropicalis* isoladas no Estado Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 3, p. 354-355, maio-jun, 2009.

MLINARIC-MISSONI, E.; KALENIC, S.; VUKELIC, M.; SYO, D.; BELICZA, M.; VAZIC-BABIC, V. *Candida* infections of diabetic foot ulcers. **Diabetologia Croatica**; v. 34 n.1, p. 29-35, 2005.

MORACE, G.; PERDONI, F.; BORGHI E. Antifungal drug resistance in *Candida* species. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 2, n. 2, p. 254–259, 2014.

NAGASHIMA M.; YAMAGISHI Y.; MIKAMO H. Antifungal susceptibilities of *Candida* species isolated from the patients with vaginal candidiasis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 22, n. 2, p. 124-126, Feb., 2016.

NAIR, S.; PETER, S.; SASIDHARAN, A.; SISTLA, S.; UNNI, A. K. K. Incidence of mycotic infections in diabetic foot tissue. **Journal of Culture Collections**, v.5, n. 4, p. 85-89, 2006-2007.

NAYMAN-ALPAT, S.; OZGÜNES, I.; ERTEM, O. T.; ERBEN N.; DOYUK-KARTAL E.; TOZÜN M. Evaluation of risk factors in patients with candiduria. **Mikrobiyoloji Bülteni**. v.45, n.40, p. 318-324, 2011.

NETTO, A. P.; ANDRIOLO, A.; FILHO, F. F.; TAMBASCIA, M.; GOMES, M. B.; MELO, M.; SUMITA, N. M.; LYRA, R.; CAVALCANI, S. Atualização sobre hemoglobina glicada (HbA_{1C}) para avaliação do controle glicêmico e para o diagnóstico do diabetes:

aspectos clínicos e laboratoriais. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial**, v. 45, n. 1, p. 31-48, 2009.

NYIRJESY, P.; ALEXANDER, A.; WEITZI, M. Vaginal *Candida parapsilosis*: Pathogen or bystander? **Infectious Disease Obstetrics and Gynecology**, v. 13, n. 1, p. 37–41, 2005.

NUCCI, M.; MARR, K. A. Emerging fungal diseases. **Clinical Infectious Disease**, v. 41, n. 40, p. 521-530, 2005.

NUNES, E. B.; NUNES, N. B.; MONTEIRO, J. C. M. S.; PAESA, L. V. Perfil de sensibilidade do gênero *Candida* a antifúngicos em um hospital de referência da Região Norte do Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 2, n. 4, p.23-30, 2011.

NYIRJESY, P.; SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidiasis. **Obstetrics Gynecology Clinics of North America**, v. 30, n. 25, p. 671-684, 2013.

ODDS, F. C.; BERNAERTS, R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.6, n. 8, p. 1923–1929, 1994.

ODDS, F. C.; BOUGNOUX, M. E.; SHAW, D. J.; BAIN, J. M.; DAVIDSON, A. D.; DIOGO, D.; JACOBSEN, M. D.; LECOMTE, M.; LI, S. Y.; TAVANTI, A.; MAIDEN, M. C.; GOWN, A.; D'ENFERT, C. Molecular phylogenetics of *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n.5, p. 1041-1052, 2007.

OLIVEIRA, P. M.; MASCARENHAS, R. E.; LACROIX, C. *Candida* species isolated from the vaginal mucosa of HIV-infected women in Salvador, Bahia, Brazil. **Brazilian Journal Infectious Disease**, v. 15, n. 43, p. 239–244, 2011.

ORASCH, C.; MARCHETTI, O.; GARBINO, J.; SCHRENZEL, J.; ZIMMERLI, S.; MUHLETHALER, K. *Candida* species distribution and antifungal susceptibility testing according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility. Testing and new vs. old Clinical and Laboratory Standards Institute clinical breakpoints: a 6-year prospective Candidaemia survey from the fungal infection network of Switzerland. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 19, p. 698-705, 2014.

OYIBO, S. O.; JUDE, E. B.; TARAWNEH, I.; NGUYEN, H. C.; HARKLESS, L.B.; BOULTON, A. J. M. A comparison of two diabetic foot ulcer classification systems: the Wagner and the University of Texas wound classification systems. **Diabetes Care**, v. 24, n. 20, p. 84–88, 2001.

OZER, T. T.; DURMAZ, S.; YULA, E. Antifungal susceptibilities of *Candida* species isolated from urine culture. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 22, n. 9, p. 629-632, Sep., 2016.

OZHAK-BAYSAN, B.; OGUNC, D.; ÇOLAK, D.; ONGUT, G.; DONMEZ, L.; VURAL, T. Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species causing nosocomial candiduria. **Medical Mycology**, v. 50, p. 529-532, 2012.

- PÁDUA, R. A. F.; GUILHERMETTI, E.; SVIDZINSKI, T. I. E. *In vitro* activity of antifungal agents on yeasts isolated from vaginal secretion. **Acta Scientiarum Health Sciences**, v. 25, n. 39, 51–64, 2003.
- PAKSHIR, K.; YAZDANI, M.; KIMIAGHALAM, R. Etiology of vaginal candidiasis in Shiraz, Southern Iran. **Research Journal Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 696–700, 2007.
- PAM, V.; AKPAN, J.; ODUYEBO, O.; NWAOKORIE, F. O.; FOWORA, M. A.; OLADELE, R. O. Fluconazole susceptibility and ERG11 gene expression in vaginal *Candida* species isolated from Lagos Nigeria. **International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics**, v. 3, n. 1, p. 84–90, 2012.
- PAPPAS, P. G.; REX, J. H.; LEE, J.; HAMILL, R. J.; LARSEN, R. A.; POWDERLY, W.; KAUFFMAN, C. A.; HYSLOP, N.; MANGINO, J. E.; CHAPMAN, S.; HOROWITZ, H. W.; EDWARDS, J. E.; DISMUKES, W. E. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. **Clinical Infectious Disease**, v.37, n.35, p. 634–643, 2003.
- PAPINI, M.; CICOLETTI, M.; FABRIZI, V.; LANDUCCI, P. Skin and nail mycoses in patients with diabetic foot. **Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia**, v. 148, n. 6, p. 603–608, 2013.
- PARADA, H.; VERÍSSIMO, C.; BRANDÃO, J.; NUNES, B.; BOAVIDA J.; DUARTE, R.; PEERALL, Y. Z.; OLIVEIRA, R.; ROSADO, L.; SABINO, R. Dermatomycosis in lower limbs of diabetic patients followed by podiatry consultation. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 30, n. 2, p. 103–108, 2013.
- PAULITSCH, A.; WEGER, W.; GINTER-HANSELMAYER, G.; MARTH, E.; BUZINA, W. A 5-year (2000–2004) epidemiological survey of *Candida* and non-*Candida* yeast species causing vulvovaginal candidiasis in Graz, Austria. **Mycoses**, v. 49, n.33, p. 471–475, 2006.
- PEREA, S.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; KIRKPATRICK, W. R.; MCATEE, R. K.; SANTILLAN, R. A.; MARTINEZ, M.; CALABRESE, D.; SANGLARD, D.; PATTERSON, F. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n.19, 2676–2684, 2001.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; SHEEHAN, D. J. Interpretative breakpoints for fluconazole and *Candida* revisited: a blue print for the future of antifungal susceptibility testing. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 20, p. 435–447, 2006.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 21, p. 133–143, 2007.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; JONES, R. N.; MESSER, S. A.; HOLLIS, R. J. Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with

bloodstream infections: SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997 to 2000. **Journal Clinical Microbiology**, v. 40, n. 39, p. 852-856, 2012.

PIROTTA, M.; GARLAND, S. Genital *Candida* species detected in samples from women in Melbourne, Australia, before and after treatment with antibiotics. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3213–3217, 2006.

PRIGENT, G.; AÏT-AMMAR, N.; LEVESQUE, E.; FEKKAR, A.; COSTA, J. M.; EL ANBASSI, S.; FOULET, F.; DUVOUX, C.; MERLE, J. C.; DANNAOUI, E.; BOTTEREL, F. Echinocandin resistance in *Candida* spp. isolated from liver transplant recipients. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, 2016. No prelo.

REX, J. H.; WALSH, T. J.; SOBEL, J. D.; FILLER, S. G.; PAPPAS, P. G.; DISMUKES, W. E. Practice guidelines for the treatment of Candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. 29, p. 662-678, 2000.

RIBEIRO, M. A.; DIETZE, R.; PAULA, C. R.; DA MATTA, D. A.; COLOMBO, A. L. Susceptibility profile of vaginal yeast isolates from Brazil. **Mycopathologia**, v. 10, n.22, 151-165, 2001.

RICHTER, S. S.; GALASK, R. P.; MESSER, S. A.; HOLLIS, R. J.; DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M. A. Antifungal susceptibilities of *Candida* species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. **Journal Clinical of Microbiology**, v. 43, n. 23, 2155-2162, 2005.

ROSA, M. I.; RUMEL, D. Fatores associados à candidíase vulvovaginal: estudo exploratório. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 4, n.5, p. 65–70, 2004.

SANGLARD, D.; ISCHER, F.; MONOD, M.; BILLE, J. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. **Microbiology**, v. 28, n. 30, p.405-416, 1997.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; FIORI, B.; RANNO, S.; TORELLI, R.; FADDA, G. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 11, n. 49, p. 668–679, 2005.

SELMECKI, A. M.; DULMAGE, K.; COWEN, L. E.; ANDERSON, J. B.; BERMAN, J. Acquisition of aneuploidy provides increased fitness during the evolution of antifungal drug resistance. **PLoS Genetics**, v. 5, n. 29, p. 692-705, 2009.

SELLAM, A.; WHITEWAY, M. Recent advances on *Candida albicans* biology and virulence. **F1000 Research**, v. 5, n. 6, p. 1-7, oct. 2016.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à luz de Autores Contemporâneos**. 1ª Edição. Editora Guanabara Koogan, 2012.

SILVA, M. G. C.; RODRIGUES, G. S.; GONÇALVES, I. L.; GRAZZIOTIN, N. A. *Candida* species distribution and fluconazole susceptibility of blood isolates at a regional

hospital in Passo Fundo, RS, Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 51, n. 3, p. 158-161, Jun, 2015.

SIMÕES, R. J.; FONSECA, P.; FIGUEIRAL, M. H. Infecções por *Candida* spp. na Cavidade Oral. **Odontologia Clínico-Científica**, v. 12, n. 1, p. 19-22, jan.-mar., 2013.

SINGH S.; PAI D. R.; YUHHUI C. Diabetic Foot Ulcer – Diagnosis and Management. **Clinical Research on Foot & Ankle**, v. 1 n.3, p.100-120, 2013.

SINGLA, N.; GULATI, N.; KAISTHA, N.; CHANDER, J. *Candida* colonization in urine samples of ICU patients: determination of etiology, antifungal susceptibility testing and evaluation of associated risk factors. **Mycopathologia**, v. 174, n. 170, p. 149-155, 2012.

SLOVENKAI M. P. Foot problems in diabetes. **Medical Clinics of North America**, v.1, n.1, p. 01-10, 1998.

SMITH, D. G.; ASSAL, M.; REIBER, G. E.; VATH, C.; LEMASTER, J.; WALLACE, C. Minor environment trauma and lower extremity amputation in high-risk patients with diabetes: incidence, pivotal events, etiology and amputation level in prospectively followed cohort. **Foot and Ankle International**, v. 14, n. 9, p. 690 - 695, Sep. 2003.

SOBEL, J. D.; WIESENFELD, H. C.; MARTENS, M.; DANNA, P.; HOOTON, T. M.; ROMPALO, A.; SPERLING, M.; LIVENGOD, C.; HOROWITZ, B.; VON, T. J.; EDWARDS, L.; PANZER, H.; CHU, T. C. Maintenance fluconazole therapy for recurrent vulvovaginal candidiasis. **The New England Journal of Medicine**, v. 30, n. 31, p. 876-883, 2004.

SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidosis. **The Lancet**, v.1 , n. 2, p. 1961–1971, 2007.

SPINILO, A.; CAPUZZO, E.; ACCIANO, S.; SANTOLO, A.; ZARA, F. Effect of antibiotic use on the prevalence of symptomatic vulvovaginal candidiasis. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 26, n. 17, p. 14–26, 1999.

TAPIA, C. V.; HERMOSILLA, G.; FORTES, P.; ALBURQUENQUE, C.; SERGIO BUCAREY, S.; SALINAS, H.; RODAS P. I.; DÍAZ, M. C. D.; MAGNE, F. Genotyping and Persistence of *Candida albicans* from Pregnant Women with Vulvovaginal Candidiasis. **Mycopathologia**, v. 4, n. 5, p. 1-9, nov. 2016.

THEILLA, L.; DUDIUK, C.; MORANO, S.; GAMARRA, S.; NARDIN, M. E.; MÉNDEZ, E.; GARCIA-EFFRON, G. Prevalence and antifungal susceptibility of *Candida albicans* and it's related species *Candida dubliniensis* and *Candida africana* isolated from vulvovaginal samples in a hospital of Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 48, n. 1, p. 43-49, Mar., 2016.

TIETZ, H. J.; KUSSNER, A.; THANOS, M.; DE ANDRADE, M. P.; PRESBER, W.; SCHO-NIAN, G. Phenotypic and genotypic characterization of unusual vaginal isolates of *Candida albicans* from Africa. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 30, 2462-2475, 1995.

TRICK, W.; FRIDKIN, S.; EDWARDS, J.; HAJJEH, R. A.; GAYNES, R. P. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989–1999. **Clinical Infectious Disease**, v. 35, n. 30, p. 627–630, 2002.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ. Biblioteca Universitária. **Guia de Normalização de Trabalhos Acadêmicos da Universidade Federal do Ceará**. Fortaleza, 2013.

VANDEPUTTE, P.; LARCHER, G.; BERGE, S. T.; RENIER, G.; CHABASSE, D.; BOUCHARA, J. P. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4608–4615, 2005.

VICENTE, V. A.; ATTILI-ANGELIS, D.; PIE, M. R. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Mycology**, v. 18, n. 20, p. 137–144, 2008.

VIDAL, L. Avaliação do Sistema de Classificação de Risco do Pé, Proposto pelo Grupo de Trabalho Internacional sobre o Pé Diabético, Hospital da Polícia Militar de Minas Gerais, 2002-2007. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte: 2009.

VILAR, L. **Endocrinologia clínica**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

VIJAYAKUMAR, R.; GIRI, S.; KINDO, A. J. Molecular species identification of *Candida* from blood samples of intensive care unit patients by polymerase chain reaction – restricted fragment length polymorphism. **Journal of Laboratorial Physicians**, v. 4, n. 1, p. 1–4, 2012.

VIJGEN, S. N. Y. S. S.; NAESENS, R.; MAGERMAN, K.; BOEL, A.; CARTUYVELS, R. Comparison of Vitek identification and antifungal susceptibility testing methods to DNA sequencing and Sensitive Yeast One antifungal testing. **Medical Mycology**, v. 49, n. 42, p. 107–117, 2010.

XU, Y.; CHEN, L.; LI, C. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* species to fluconazole and detection of *C. albicans* ERG11 mutations. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 61, n. 4, p. 798–804, 2008.

ZARDO V.; MEZZARI A. Os antifúngicos nas infecções por *Candida* spp. **News Lab**, v. 63, n. 60, p. 56-69, 2004.

WAGNER, F.W. Treatment of the diabetic foot. **Comprehensive Therapy Journal**, v. 10, n. 11, p. 29-38, 1981.

WANG, Y. H.; DONG, H. H.; ZHAO, F.; WANG, J.; YAN, F.; JIANG, Y. Y.; JIN, Y. S. The synthesis and synergistic antifungal effects of chalcones against drug resistant *Candida albicans*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 13, p. 3098-3102, Jul., 2016.

WEI, Y.; FENG, J.; LUO, C. Isolation and genotyping of vaginal non-*albicans* in women from two different ethnic groups in Lanzhou, China. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 34, n. 11, p. 227–235, 2010.

WHITE, T. C.; MARR, K. A.; BOWDEN, R. A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 35, p. 382-402, 1998.

WIJESURIYA, T. M.; WEERASEKERA M. M.; KOTTAHACHCHI, J.; RANASINGHE K. N. P.; DISSANAYAKE M. S. S.; PRATHAPAN, S.; GUNASEKARA, T. D. C. P.; NAGAHAWATTE A.; GURUGE L. D.; BULUGAHAPITIYAU.; FERNANDO S. S. N. Proportion of lower limb fungal foot infections in patients with type 2 diabetes at a tertiary care hospital in Sri Lanka. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 18. n.1, p. 20-31, Jan-Feb 2014.

WILLIAMS, D. W.; WILSON, M. J.; LEWIS, M. A. O.; POTTS, A. J. C. Identification of *Candida* species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 30, 2476–2489, 1995.

WINGETER, M. A.; GUILHERMETTI, E.; SHINOBU C. S.; TAKAKI I.; SVIDZINSKI, T.I. E. Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 40, n. 3, p. 272-276, mai-jun, 2007.

YAPAR, N.; UYSAL, U.; YUCESoy, M.; CAKIR, N.; YUCE, A. Nosocomial bloodstream infections associated with *Candida* species in a Turkish University Hospital. **Mycoses**, v. 49, n. 45, p. 134-138, 2006.

YASHAVANTH, R.; SHIJU, M. P.; BHASKAR, U.A.; RONALD, R.; ANITA, K. B. Prevalence of *Candida* species among uropathogens and their antifungal susceptibility pattern in a tertiary care hospital. **Journal Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 5, p. 2459-2461, 2013.

**APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO ESTRUTURADO APLICADO AOS PACIENTES
PORTADORES DE ÚLCERAS DE PÉ DIABÉTICO**

QUESTIONÁRIO ESTRUTURADO APLICADO AOS PACIENTES PORTADORES DE ÚLCERAS DE PÉ DIABÉTICO
--

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO	
NOME:	
GÊNERO: () MASCULINO () FEMININO	
IDADE:	ANOS
DATA DE NASCIMENTO: / /	
ENDEREÇO:	
BAIRRO:	CIDADE:

HISTÓRICO CLÍNICO
TIPO DE DIABETES: () TIPO 1 () TIPO 2 () NÃO SABE
HÁ QUANTO TEMPO SABE QUE TEM DIABETES ? ANOS () NÃO SABE
POSSUI OUTRAS DOENÇAS CONCOMITANTES AO DIABETES? () SIM () NÃO
QUAL (IS)?

AValiação GERAL
GLICEMIA DE JEJUM: mg/dL
CLASSIFICAÇÃO DA ÚLCERA DE PÉ (SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO DE WAGNER): () GRAU 0 () GRAU 1 () GRAU 2 () GRAU 3 () GRAU 4 () GRAU 5
PRESENÇA DE DOENÇA VASCULAR PERIFÉRICA ? () SIM () NÃO

TRATAMENTO COM ANTIBIÓTICOS ? () SIM () NÃO
QUAL (IS)?:
TRATAMENTO COM ANTIFÚNGICOS NAS ÚLTIMAS QUATRO SEMANAS: () SIM () NÃO
OUTROS MEDICAMENTOS DE USO CONTÍNUO ? () SIM () NÃO
QUAL (IS)? _____

INSPEÇÃO DO PÉ
AMPUTAÇÃO: () SIM () NÃO. LOCAL:
EDEMA: () SIM () NÃO. LOCAL:
NECROSE: () SIM () NÃO. LOCAL:
INFECÇÃO: () SIM () NÃO. LOCAL:

HÁBITOS/AUTOCUIDADO
EXAMINA OS PÉS DIARIAMENTE ? : () SIM () NÃO
SECA ENTRE OS DEDOS APÓS O BANHO ? : () SIM () NÃO
USA CREMES PARA HIDRATAR OS PÉS DIARIAMENTE ? : () SIM () NÃO
JÁ RECEBEU ORIENTAÇÃO QUANTO AOS CUIDADOS COM OS PÉS ? : () SIM () NÃO

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Declaro, por meio deste termo, que concordei em ser entrevistado(a) e participar na pesquisa de campo referente ao estudo intitulado: **INCIDÊNCIA DE INFECÇÕES FÚNGICAS EM ÚLCERAS DE PÉ DIABÉTICO**, desenvolvida por **Aristides Ávila do Nascimento**, a quem poderei consultar a qualquer momento que julgar necessário através do telefone (088) 99947 2454.

Afirmo que aceitei participar por minha própria vontade, sem receber qualquer incentivo financeiro ou ter qualquer ônus e com a finalidade exclusiva de colaborar para o sucesso da pesquisa. Fui informado (a) dos objetivos estritamente acadêmicos. Fui também esclarecido (a) de que os usos das informações por mim oferecidas estão submetidos às normas éticas destinadas à pesquisa envolvendo seres humanos, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde.

O acesso e a análise dos dados e amostra coletados se farão apenas pelos pesquisadores e seus coordenadores. Fui ainda informado (a) de que posso me retirar dessa pesquisa a qualquer momento, sem prejuízo para meu acompanhamento ou sofrer quaisquer sanções ou constrangimentos. Atesto recebimento de uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme recomendações da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Atenciosamente,

Assinatura do Pesquisador

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Declaro que tomei conhecimento do estudo cujo título é: **INCIDÊNCIA DE INFECÇÕES FÚNGICAS EM ÚLCERAS DE PÉ DIABÉTICO**. Compreendi seus propósitos e, concordo em participar da pesquisa, estou ciente de que em qualquer momento posso retirar meu consentimento na participação deste estudo.

CEP-UFC/Fortaleza
Endereço: Rua Coronel Nunes de Melo, 1000
Município: Fortaleza- UF: CE
Bairro: Rodolfo Teófilo
Telefone: (085) 3366-8344

Sobral, _____ de _____ de 201____.

Ciente: _____
Assinatura do Paciente/Responsável

Assinatura do Pesquisador

ANEXO C - PARECER TÉCNICO DO COMITÊ DE ÉTICA GOVERNO DO
ESTADO DO CEARÁOrganização Social mantida com recursos públicos
provenientes de seus impostos e contribuições sociais**MEMORANDO**

Nº 63/ 2015 C.E.

Sobral (CE), 14 de setembro de 2015.

DE: Comissão Interna de Pesquisa - Centro de Estudos**PARA:** Orientadora Responsável – Camila Gomes Virginio Coelho

Pesquisador – Aristides Ávila do Nascimento

REF.: PROJETO DE PESQUISA

Prezado(a) Pesquisador(a)

O projeto intitulado “**INCIDÊNCIA DE INFECÇÕES FÚNGICAS EM ÚLCERAS DE PÉ DIABÉTICO**” recebeu aprovação através de parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, sob número 1219760, estando, portanto, liberado para coleta de dados no serviço de Centro Cirúrgico do Hospital Regional Norte.

Cordialmente,

ISGH-HOSPITAL REGIONAL NORTE
Fca. Brunna de C. Costa Vasconcelos
Coordenadora
Centro de Estudos**Francisca Brunna de Carvalho Costa**
Coordenadora Centro de Estudos - HRN
Comissão Interna de Pesquisa
Tel: (88) 36779516
e-mail: centroddeestudoshn@gmail.com