



UFG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E
SAÚDE PÚBLICA**

HILDENE MENESES E SILVA

Caracterização e identificação de leveduras do gênero *Candida*
em pacientes transplantados de medula óssea

**Goiânia
2011**

HILDENE MENESES E SILVA

Caracterização e identificação de leveduras do gênero *Candida*
em pacientes transplantados de medula óssea

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Medicina
Tropical e Saúde Pública da Universidade
Federal de Goiás para obtenção do Título
de Mestre em Medicina Tropical e Saúde
Pública.

Orientadora: Dr^a Maria do Rosário
Rodrigues Silva

Goiânia
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

S586c Silva, Hildene Meneses
Caracterização e identificação de leveduras do gênero *Candida* em pacientes transplantados de medula óssea [manuscrito] / Hildene Meneses e Silva. – 2011.
53 f. : il., figs., tabs.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria do Rosário Rodrigues Silva.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2011.
Bibliografia.
Inclui lista de tabelas e figuras.

1. *Candida* sp. 2. Infecções nosocomiais. 3. Transplantados de medula óssea. I. Título.

CDU: 616.98

**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública
da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluna: Hildene Meneses e Silva

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria do Rosário Rodrigues Silva

Membros:

- 1. Dr^a. Maria do Rosário Rodrigues Silva**
- 2. Dr^a. Carolina Rodrigues Costa**
- 3. Dr^a. Orionalda de Fátima Lisboa Fernandes**

Data: 31/08/11

*À minha querida mãe **Hildete**, com quem posso compartilhar todos os momentos, à quem devo profunda admiração e respeito.*

*Ao meu pai, **José Ribamar**, por dividir comigo momentos inesquecíveis de muita alegria e por ter sido uma fonte inesgotável de amor e paz.*

*Aos meus filhos **Pedro Ivo** e **Marcela**, pela felicidade, amor e amizade que me proporcionam.*

*À minha irmã **Hilda** pelo apoio incondicional, amor, carinho, compreensão, e por tudo, pois sem ela tornar-se-ia tudo muito difícil.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, que está comigo em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis, e por ter-me guiado a mais esta conquista.

À minha orientadora, Doutora Maria do Rosário Rodrigues Silva, por ter me aceitado como sua orientanda, pelos seus sábios ensinamentos que muito contribuíram para a minha dedicação à Micologia Médica, pelo constante apoio, incentivo e enorme amizade demonstrada. Aqui dedico o meu agradecimento e reconhecimento à sua disponibilidade, generosidade, simpatia, dedicação profissional à sua postura como docente e, principalmente à fantástica pessoa que é! Obrigada por tudo!

Aos professores Carolina Rodrigues Costa, Evandro Leão Ribeiro, Lúcia Kioko Hashimoto e Souza, Orionalda de Fátima Lisboa Fernandes e Rosália dos Santos Amorim Jesuino pelas sugestões sempre oportunas.

Aos meus colegas do Laboratório de Micologia Maysa Paula da Costa, Milton Camplesi Junior, Fábio Silvestre de Ataíde, Murilo dos Santos, Fernando Yano, Flávio Ezzedinne El Assal, Núbia Pereira Pontes, Thaísa Cristina da Silva, Franciele Pereira de Carvalho, Cícero Júnior, Aline Almeida Souza, Carolina Martins Treméa, Tayse Silva dos Santos, Lais Carneiro Naziasene Lima e Pedro Henrique Dias Botelho pelos bons momentos e trocas de experiência que me proporcionaram.

À Rosemary Alves dos Santos, Anne Lucione de Melo Pereira Coutinho e Ailton José Soares pelo companheirismo e amizade durante esses anos.

Ao Hospital Araújo Jorge pela colaboração na execução deste trabalho

Ao Dr. Adriano Moarais Arantes, a enfermeira Luciana Lobo Duarte e Sandoval Neres pela enorme contribuição na realização deste trabalho.

Aos docentes e servidores técnico administrativo do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, pelo apoio, amizade e incentivo.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a execução do trabalho apresentado nesta dissertação, meu muito obrigada.

SUMÁRIO

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS	XI
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	XII
RESUMO	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Considerações Gerais/Justificativa	1
1.2. Revisão Bibliográfica	1
1.2.1. Leveduras do gênero <i>Candida</i>	1
1.2.1.1. Fatores que Influenciam a Infecção por <i>Candida</i>	2
1.2.1.1.1. Fatores relacionados ao hospedeiro	2
1.2.1.1.2. Fatores relacionados ao Micro-organismo	3
1.2.2. Infecções causadas por <i>Candida</i> spp	6
1.2.2.1. Infecções por <i>Candida</i> spp em Transplantados de Medula Óssea	8
1.3. Agentes Antifúngicos	9
1.3.1. Derivados azólicos	9
1.3.2. Poliênicos	11
1.3.3. Equinocandinas	12
2. OBJETIVOS	14
2.1. Geral	14
2.2. Específicos	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Procedência dos isolados e identificação	15
3.2. Determinação dos fatores de virulência das leveduras	16
3.2.1. Proteinase	16
3.2.2. Atividade Hemolítica	16
3.3. Suscetibilidade in vitro	17
3.3.1. Agentes Antifúngicos	17
3.3.2. Método de Microdiluição em caldo	17
3.3.2.1. Preparo do Inóculo	17
3.3.2.2. Realização e Leitura do Teste	18
3.3.3. Etest	18
3.3.3.1. Interpretação dos resultados dos testes de suscetibilidade in vitro	19
4. RESULTADOS	20
5. DISCUSSÃO	28
6. CONCLUSÕES	33

7. REFERÊNCIAS	34
8. ANEXOS	52

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Figura 1.....	18
Figura 2	20
Figura 3	21
Figura 4	22
Figura 5	24
Figura 6	24
Figura 7	26
Tabela 1	21
Tabela 2	22
Tabela 3.....	23
Tabela 4.....	25
Tabela 5.....	26

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilssufóxido
IFI	Infecção fúngica invasiva
MOPS	Morfolinopropanossulfônico
SPS	polianetol sulfonato sódico
TMO	Transplante de Medula Óssea
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
CI	Candidíase invasiva
NK	Natural killer
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SAP	Proteinase aspartil secretora
IFI	Infecção fúngica invasiva

RESUMO

As infecções fúngicas em pacientes imunocomprometidos, principalmente em indivíduos hospitalizados, que são submetidos a diferentes tipos de tratamento têm aumentado nas últimas décadas, sendo causa de mortalidade entre estes pacientes. O diagnóstico da infecção bem como a identificação correta do fungo além dos testes de suscetibilidade *in vitro* são importantes para controlar a doença e por conseguinte evitar a morte. Neste trabalho, foi realizada a identificação das espécies causadoras de candidemia em pacientes portadores de doenças hematológicas e submetidos a transplantes de medula óssea provenientes do Hospital Araújo Jorge na cidade de Goiânia. Os principais fatores predisponentes para aquisição de candidíases, os fatores de virulência inerentes ao micro-organismo bem como a suscetibilidade *in vitro* a diferentes antifúngicos dos isolados de *Candida* foram verificados para estes pacientes. Amostras clínicas dos pacientes foram coletadas e semeadas em ágar “Brain Heart Infusion” bifásico e ágar Sabouraud dextrose, incubadas a temperatura ambiente e a 36°C, e observadas diariamente. A identificação das leveduras foi realizada através de cultivo em ágar cornmeal para verificar a produção de clamidoconídios, produção de tubo germinativo em soro fetal bovino acrescido de 1% de tween 80, inoculação em agar cromogênico, CHROMagar e por métodos de assimilação de hidratos de carbono. Os isolados de leveduras obtidos foram submetidos aos testes de suscetibilidade *in vitro* usando o método da microdiluição em caldo e Etest. Testes de atividade hemolítica e de proteinase foram também realizados para estes isolados. Das 410 amostras clínicas procedentes de 144 pacientes transplantados foram identificadas onze leveduras do gênero *Candida*, sendo três (3) *Candida albicans*, cinco (5) *Candida parapsilosis*, uma (1) *Candida tropicalis* e duas (2) *Candida* spp. Os isolados de *C. parapsilosis* foram suscetíveis a todos os antifúngicos, enquanto dois (2) isolados de *C. albicans* e o de *C. tropicalis* (um) mostraram-se resistentes aos três derivados azólicos, fluconazol, Itraconazol e voriconazol. As amostras de *Candida* não identificadas com relação a espécie foram suscetíveis ao voriconazol e a caspofungina. não apresentaram atividade hemolítica e não foram capazes de secretar a enzima proteinase. Neste trabalho pode-se concluir que *C. parapsilosis* foi prevalente mostrando a emergência de outras espécies não albicans como agentes de candidíase e ainda que os testes de suscetibilidade *in vitro* são de grande importância para que a terapia seja usada adequadamente evitando a morte dos pacientes.

ABSTRACT

Fungal infections in immunocompromised patients, especially in hospitalized individuals, which are submitted to different types of treatment have increased in recent decades and are cause of death of these patients. The diagnoses of infection as well as the correct identification of the fungus, in addition to the *in vitro* susceptibility tests are important to control the disease and thus avoid death. This work was conducted to identify the species that causes candidemia in patients with hematologic malignancies and in those submitted to bone marrow transplantation from Araujo Jorge Hospital in the city of Goiânia. The main predisposing factors for the acquisition of candidiasis, the virulence factors inherent to the microorganism, as well as the *in vitro* susceptibility to different antifungal agents of *Candida* isolates were verified in this work. Clinical samples from patients were collected and cultivated in brain heart infusion and Sabouraud agar dextrose and incubated at room temperature and at 36°C. The identification of yeasts was performed by culture in cornmeal agar to check the chlamydospore production, by germ tube production in fetal bovine serum plus 1% tween 80, by inoculation onto chromogenic agar, CHROMagar and methods of assimilation of carbohydrates. The isolates were subjected to hemolytic activity and proteinase testing as well as to *in vitro* susceptibility testing using broth microdilution and Etest methods. Of the 410 clinical samples originated from 144 transplant patients we identified eleven yeasts, included three (3) *Candida albicans*, five (5) *C. parapsilosis*, one (1) *C. tropicalis* and two (2) *Candida* spp. All isolates of *C. parapsilosis* were susceptible to all antifungal agents, while two (2) isolates of *C. albicans* and one (1) *C. tropicalis* were resistant to three azole derivatives, fluconazole, itraconazole and voriconazole. *Candida* spp isolates did not show hemolytic activity, they were not able to secrete the enzyme proteinase either, they were resistant to fluconazole, itraconazole and amphotericin B and susceptible to caspofungin and voriconazole. In this study we can conclude that *C. parapsilosis* was prevalent, showing that the emergence of *Candida* non *albicans*. Besides we can conclude that *in vitro* susceptibility tests are of great importance for the adequate therapy to avoid the death of patients.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Gerais/Justificativa

Infecções fúngicas invasivas (IFIs) têm emergido nas últimas duas décadas como uma das principais causadoras de infecções nosocomiais, principalmente em pacientes com doenças imunológicas graves, em especial os portadores de doenças hematológicas e os transplantados de medula óssea (Karkowska-Kuleta et al. 2009, Metin et al. 2011). Estas infecções denominadas oportunistas, são de evolução rápida, difíceis de diagnóstico ou diagnosticadas tardiamente, resultando em crescente índice da taxa de mortalidade entre estes pacientes (Cornely 2008, Walsh et al. 2008).

Entre os fungos oportunistas responsáveis pelas infecções nosocomiais, as espécies de *Candida* são os principais agentes etiológicos envolvidos (Colombo et al. 2007). Estas leveduras são as principais causas de septicemia seguida de morte em pacientes de Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), e ocupa o quarto lugar na etiologia de todas as infecções da corrente sanguínea (Pfaller & Diekema 2007, Mean et al. 2008, Hollenbach 2008, Leroy et al. 2010).

Pacientes transplantados de medula óssea possuem vários fatores considerados de risco, como o tempo de duração da neutropenia, uso de glicocorticóides e antibióticos de amplo espectro, e rompimento da barreira mucocutânea os quais são predisponentes para a aquisição de candidíase invasiva (CI) (Marr et al. 2002, Hajjeh et al. 2004, Richardson 2005, Karkowska-Kuleta et al. 2009).

Diante desta exposição, o trabalho se propôs a verificar a incidência de candidíase nos pacientes transplantados, assim como os principais fatores de risco envolvidos para o desenvolvimento desta infecção fúngica, buscando desta forma uma terapia precoce que provavelmente reduzirá a letalidade destes pacientes.

1.2. Revisão Bibliográfica

1.2.1. Leveduras do gênero *Candida*

Candida é uma levedura que faz parte da microbiota do corpo humano e animais, colonizando a pele e mucosas dos tratos digestivo e urinário, bucal e vaginal. Atualmente existem cerca de duzentas leveduras incluídas no gênero *Candida*, sendo

pouco mais de 20 espécies responsáveis por infecções no homem. Estas leveduras são consideradas o principal grupo de fungos patógenos oportunistas, representando cerca de 8-10% das causas de infecções sanguíneas nosocomias em UTIs (Hossain et al. 2003, Borg-von et al. 2007, Kumar et al. 2008, Karkowska-Kuleta et al. 2009, Negri et al. 2010a). Desta forma, candidíase é a maioria das vezes de origem endógena, ocorrendo como consequência de um distúrbio imunológico do hospedeiro e dos fatores de virulência destas leveduras, que possuem habilidade de colonizar, penetrar e invadir o tecido (Brown et al. 2007, Hollenbach 2008). Dentre as espécies do gênero *Candida*, *Candida albicans* tem sido relatada como a mais prevalente, seguida de *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (Lu et al. 2004, Odds et al. 2006, Pfaller & Diekema 2007, Panizo et al. 2009).

1.2.1.1 Fatores que Influenciam a Infecção por Candida

Alteração no sistema imunológico do hospedeiro, é considerado um relevante fator de risco predisponente à aquisição de candidíase invasiva (CI). Além destes fatores relacionados ao hospedeiro, o próprio fungo apresenta fatores de virulência agravando ainda mais o estado de saúde do paciente (Playford et al. 2008).

1.2.1.1.1 FATORES RELACIONADOS AO HOSPEDEIRO

Candidíase pode ocorrer como consequência do rompimento do equilíbrio parasita-hospedeiro, desencadeado por alterações na barreira tecidual e na microbiota autóctone e pelo comprometimento das defesas naturais como a imunológica. Em enfermidades graves associadas a permanência prolongada em hospitais, há uma ocorrência maior do rompimento deste equilíbrio (Playford et al. 2008).

Pacientes que sofrem traumatismos constantes devido a procedimentos médicos invasivos, como uso de cateteres intravenosos, nutrição parenteral, sondas e com extensas queimaduras, sofrem alterações na superfície epitelial ou de mucosas, possibilitando a proliferação ou mudança do sítio anatômico da levedura, contribuindo para a instalação e infecção por *Candida* no organismo do hospedeiro (Pulcini et al. 2006, Celebi et al. 2007).

Pacientes que fazem uso de antibióticos de amplo espectro tornam-se mais propensos à infecção por estas leveduras. Há nestes casos, supressão da microbiota

bacteriana autóctone, permitindo maior proliferação das espécies de *Candida* (Galván & Mariscal 2006, Pfaller & Diekema 2007).

Mecanismos mediados por imunidade celular e humoral constituem uma eficiente proteção contra infecções por leveduras do gênero *Candida*. Os tipos de imunidade inata e adaptativa (celular e humoral) possuem um papel importante na proteção contra a infecção por *C. albicans*. Imunidade inata através de neutrófilos e macrófagos predomina na defesa do hospedeiro contra candidemia, enquanto a imunidade celular ativada predominantemente por citocinas das células T CD4+, protege as mucosas de infecção (Fidel 2002). Células natural killer (NK), complemento, proteínas plasmáticas e células fagocíticas como os macrófagos e neutrófilos fazem parte do sistema imune inato sendo responsáveis primariamente pela contenção da invasão do micro-organismo (Ismail et al. 2002). Estas células podem atuar como antifúngicos destruindo o patógeno ou ainda como estimuladoras do sistema imune adaptativo, produzindo citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias além da apresentação de antígenos (Romani 2004).

Pacientes portadores de doenças graves como neoplasias, síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), de doenças hematológicas e que são submetidos a tratamentos quimioterápicos apresentam uma intensa diminuição do número de neutrófilos, sendo, portanto altamente suscetíveis a infecções invasivas por *Candida* (Galván & Mariscal 2006, Richardson & Lass-Flör 2008)

Linfócitos T apresentam uma ação de grande importância no processo de invasão por *Candida*. Em crianças com problemas no timo, principal órgão formador de linfócitos T, e em pacientes com SIDA, nos quais as células T CD4+ estão reduzidas verifica-se uma maior facilidade de aquisição de candidíase (Merz 1990).

Segundo Lee et al. (2003), a imunidade humoral pode também auxiliar na defesa do hospedeiro contra *C. albicans*. Anticorpos específicos podem aumentar o mecanismo de defesa por opsonizar o patógeno e portanto facilitar a fagocitose, que é uma importante parte da resposta imune celular.

1.2.1.1.2 FATORES RELACIONADOS AO MICRO-ORGANISMO

Candida albicans e espécies não *albicans* possuem importantes fatores que facilitam a sua multiplicação no hospedeiro possibilitando a produção de infecções. Estes fatores estão relacionados principalmente a adesão ao tecido do hospedeiro, capacidade de transformação de leveduras para hifas, variabilidade de mudança

fenotípica (fenômeno switching), produção de exoenzimas hidrolíticas e hemolisinas, (Vargas et al. 2000, Fotedar & Al-Hedaithy 2003, Negri et al. 2010a).

O primeiro mecanismo de patogenicidade que o micro-organismo apresenta é a sua capacidade de adesão à superfície da célula do hospedeiro. Os constituintes da parede celular das leveduras do gênero *Candida* como glucano, manoproteína e quitina, não possuem apenas a propriedade de dar a forma estrutural à célula, mas também é o local onde se inicia a interação entre o micro-organismo e o meio ambiente (Calderoni & Fronzi 2001). As proteínas existentes na parede celular do fungo denominadas adesinas permitem a sua aderência a receptores extracelulares, como fibrinogênio, fibronectina e laminina presentes nos tecidos humanos (Yang 2003). As espécies de *Candida* podem aderir a superfícies de dispositivos médicos como o cateter, formando biofilmes. A formação destes biofilmes pode facilitar infecções na corrente sanguínea por estes micro-organismos. Além disso, é conhecido que biofilmes provavelmente mudem a suscetibilidade dos fungos aos diferentes antifúngicos, tornando-os resistentes a terapêutica habitual (Chandra et al. 2001). *C. parapsilosis* e *C. albicans* têm sido constantemente descobertas como causadoras de candidemia, acreditando-se que esta elevada frequência, principalmente quando se refere a *C. parapsilosis*, pode ser explicada pela alta capacidade desta espécie de aderir à superfícies plásticas como o cateter (Paula et al. 1999, Dagdeviren et al. 2005).

A característica dimórfica apresentada por espécies de *Candida* está diretamente relacionada à patogenicidade destas leveduras permitindo uma maior interação do fungo com o hospedeiro (Birse et al. 1993). A formação de hifas além de promover a invasão da levedura para dentro da mucosa, também evita que as células de *Candida* sejam englobadas por macrófagos e neutrófilos, o que provavelmente contribui para o aumento da virulência do fungo (Van Burik & Magee 2001, Yang et al. 2003, Karkowska-Kuleta et al. 2009).

A transição de leveduras para hifas pode ser influenciada por uma variedade de condições ambientais incluindo resposta fisiológica a temperatura de 37°C, pH igual ou superior a 7,0, concentração de CO₂ de 5,5% e presença de fontes de carbono (Eckert et al. 2007). A produção da forma unicelular é estimulada por temperaturas mais baixas e pH mais ácido e altas concentrações de glicose (Whiteway & Bachewich 2006).

Variações na morfologia das colônias de *Candida* principalmente de *C. albicans* caracteriza-se pela variabilidade fenotípica, denominado fenômeno “switching” (Lian et al. 2003, Laffey & Butler 2005). Esta mudança fenotípica, provavelmente induz

alterações na fisiologia e patogenicidade do micro-organismo sendo considerado de grande importância na sua adaptação na mudança de ambiente, durante a invasão no organismo do hospedeiro (Lian et al. 2003; Laffey & Butler 2005, Odds et al. 2006).

Dentre os atributos de virulência merece destaque a produção de enzimas extracelulares como as proteinases e fosfolipases (Hube & Naglik 2002, Kadir et al. 2007). A relação entre a expressão dos genes SAPs e as infecções invasivas têm sido estabelecidas para *C. albicans* e espécies não *albicans* (Furlaneto-Maia et al. 2008). A atividade de proteinase de *Candida* está associada com uma família de isoenzimas proteinase aspartil secretora (sap), com peso molecular entre 35 e 50 kDa codificadas pelos genes *SAP1-10*, que aumentam a capacidade do micro-organismo de colonizar e penetrar nos tecidos do hospedeiro e evadir da resposta imune (Naglik et al. 2003, Naglik et al. 2004). As proteinases estão associadas à formação de pseudomicélio, a aderência e ao fenômeno “switching” em leveduras de *Candida* (Bektic et al. 2001, Naglik et al. 2003).

As fosfolipases são enzimas hidrolíticas que em geral, catalisam a hidrólise de fosfolípidos, que são os maiores componentes da membrana celular do hospedeiro (Vinitha & Mamatha 2011). A secreção de fosfolipase extracelular por espécies de *Candida* é considerada um atributo de virulência, pois induz a lesão tecidual por danificar os constituintes lipídicos da membrana celular do hospedeiro auxiliando a invasão da mucosa epitelial (Niewerth & Korting 2001, Samaranayake 2006a). A fosfatidilcolina (lecitina) é um fosfolípido natural que funciona como substrato para as quatro fosfolipases denominadas A, B, C e D. As fosfolipases A e B são as de maior relevância e as mais frequentemente estudadas. A fosfolipase A, devido à presença de lisolecitina (produto tóxico) tem o potencial de destruir as membranas dos eritrócitos (hemólise). O encontro desta enzima no sítio de formação do broto da levedura e na formação do tubo germinativo possibilita uma maior ação de hidrólise dos fosfolípidos das membranas intracelulares. A fosfolipase B, também contribui para a patogenicidade das espécies de *Candida* por remover ácidos graxos e degradar o tecido do hospedeiro (Niewerth & Korting 2001). Os isolados de *Candida* spp podem apresentar diferentes níveis de atividade desta enzima. A produção elevada de fosfolipase está relacionada a um aumento nos níveis de patogenicidade do micro-organismo, já que os isolados que possuem altas quantidades de fosfolipase apresentam uma maior capacidade de aderência e invasão nas células do hospedeiro (Ibrahim et al. 1995, Shimizu et al. 1996).

Pouco se conhece sobre a atividade hemolítica das espécies de *Candida*, mas segundo Negri et al. (2010b), o potencial patogênico de *C. albicans* pode estar associado com a produção de hemolisina. Muitos micro-organismos patogênicos utilizam a hemoglobina como fonte de ferro. A aquisição do ferro é essencial para a sobrevivência e capacidade de estabelecer infecção dentro do hospedeiro (Manns et al. 1994, Watanabe et al. 1999, Luo et al. 2001, Negri et al. 2010b). *C. albicans* e outras espécies não *albicans* secretam o fator hemolítico degradando a hemoglobina (Luo et al. 2001, Furlaneto-Maia et al. 2008, Yigit & Aktas 2009). A atividade hemolítica onde podem ser detectados dois tipos de hemolisinas (α e β) é um atributo de virulência que contribui para a disseminação da patogênese de *Candida* (Odds 1988, França et al. 2010).

1.2.2. Infecções causadas por *Candida* spp

As infecções causadas por leveduras do gênero *Candida* dependendo do local da lesão, podem ser classificadas de duas formas distintas: candidíase superficial ou de mucosa e candidíase profunda ou sistêmica (Jayatilake & Samaranayake 2010).

Candidíase superficial é a infecção mais comum dentre as candidíases, acometendo a pele e mucosas, e normalmente é causada por *C. albicans*, que é a espécie comensal mais comum encontrada na boca, vagina e trato gastrointestinal de indivíduos saudáveis (Samaranayake 2006b). Candidíase bucal ou sapinho ocorre principalmente por um colapso na imunidade local do paciente, em consequência de traumatismo e atrofia epitelial, apresentando placas esbranquiçadas, eritematosas e doloridas. Em pacientes imunocomprometidos, como os portadores da SIDA, a candidíase bucal é considerada um sinal clínico clássico característico como pseudomembranosa, eritematosa e hiperplásica (Samaranayake 2006a, Jayatilake & Samaranayake 2010). Candidíase vaginal é uma infecção comum, semelhante clinicamente a candidíase orofaríngea, apresentando prurido e episódios de recorrência. Na pele, a infecção se manifesta nas dobras do corpo, incluindo os espaços interdigitais das mãos e pés, enquanto as lesões de unhas podem ser graves havendo erosão e espessamento da borda ungueal que se estende transversalmente pela lâmina tornando-se distrófica e escurecida (Jayatilake et al. 2009). Estas manifestações clínicas em decorrência da invasão da unha por *Candida* spp geralmente apresentam padrões clínicos específicos, sendo que paroníquia é o tipo mais comum e caracteriza-se pelo comprometimento da prega

ungueal proximal e lateral, resultando em típica inflamação e eritema (Abad-González et al. 2007; Jayatilake et al. 2009).

Candidíase sistêmica acontece preferencialmente em pacientes com a imunidade comprometida, onde o micro-organismo se dissemina no hospedeiro através do sangue, e pode se instalar em órgãos vitais como cérebro, coração e rins e está relacionada com altas taxas de mortalidade nestes indivíduos (Jayatilake & Samaranayake 2010).

O aumento na incidência de candidemia e de infecções invasivas por espécies de *Candida* ocorre devido a um conjunto de fatores. Pacientes críticos, internados por longo período em hospitais principalmente em unidades de cuidados especiais, fazendo uso de antibióticos e corticóides, administração de alimentação parenteral, neutropênicos e transplantados de medula óssea (TMO), possuem vários atributos de risco para aquisição de infecção por estes fungos. Estas leveduras são responsáveis pela maioria das fungemias em pacientes TMO, e representam os fungos oportunistas mais importantes implicados em infecções nosocomiais (Barnes & Marr 2007, Staber et al. 2007, Richardson & Lass-Flörl 2008).

Leveduras do gênero *Candida* possuem características específicas, as quais fazem com que determinados grupos de pacientes apresentem uma espécie determinada (Alangaden 2011). Estudos epidemiológicos realizados por Gupta et al. (2004) em pacientes internados em unidades de queimadura e por Fanello et al. (2001) em unidades geriátricas de curta duração, *C. albicans* foi o agente responsável pela transmissão nosocomial, mostrando a natureza exógena desta infecção. Normalmente esta é a espécie prevalente na maioria das infecções (Pfaller & Diekema 2004, Richardson & Lass-Flörl 2008).

Espécies não *albicans* como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, e *C. glabrata*, consideradas emergentes, têm surgido como causadoras de infecções invasivas nosocomiais, principalmente em pacientes internados em UTIs (Hajjeh et al. 2004, Wisplinghoff et al. 2004, Richardson & Lass-Flörl 2008).

C. tropicalis está associada a pacientes com doenças hematológicas, seguida de mucosite e neutropenia (Horn et al. 2009), enquanto *C. parapsilosis* está relacionada com candidemias em neonatos e pacientes transplantados. *C. parapsilosis* já foi detectada inúmeras vezes em mãos de profissionais de saúde e possui uma grande capacidade de produzir biofilmes, sendo que esta espécie apresenta surtos de candidemia associados com cateter venoso central e nutrição parenteral (Alangaden 2011).

C. krusei está relacionada à doenças hematológicas e transplantados de células do sistema hematopoiético, enquanto em pacientes não neutropênicos, à cirurgia gastrointestinal e exposição prévia ao fluconazol. Esta espécie intrinsecamente resistente ao fluconazol produz um alto índice de mortalidade (Hachem et al. 2008, Playfor et al. 2008, Horn et al. 2009, Sipsas et al. 2009,).

C. glabrata mostra uma frequência maior de isolamento entre os idosos com câncer e naqueles pacientes com exposição prévia ao fluconazol. Relatos de alguns pesquisadores associam o uso de antibióticos como a vancomicina ao isolamento desta espécie (Hachem et al. 2008, Alangaden 2011). Espécies não *albicans* como *C. guilliermondii* e *C. rugosa* têm sido isoladas em surtos nosocomiais envolvendo cateteres intravasculares sendo que resistência ao fluconazol é verificada em alguns casos (Mincez et al. 2009).

1.2.2.1 Infecções por *Candida* spp em Transplantados de Medula Óssea

Nos últimos 40 anos, o transplante de células do sistema hematopoiético ou TMO tem sido adotado como tratamento curativo opcional para uma variedade de doenças hematológicas graves, como leucemias, linfomas e mielomas. O constante aumento de transplantes, tem elevado o número de pacientes imunocomprometidos (Rosenhagen et al. 2009, Rieger et al. 2009). Os TMO, tanto alogênicos quanto autólogos, representam uma parcela significativa de pacientes que podem sofrer infecções fúngicas (IF). O tempo prolongado de neutropenia, disparidade genética entre doador e receptor, presença e tratamento da doença do enxerto contra o hospedeiro, uso de esteróides, idade do paciente, rompimento da barreira mucocutânea e falta de fluxo laminar nos hospitais são fatores importantes para aquisição destas infecções (Post et al. 2007, Brown 2007, Costa et al. 2008, Rieger et al. 2009, Nihtinen et al. 2010). Os pacientes transplantados do tipo alogênico apresentam maior risco porque tem uma neutropenia de maior duração, doença de rejeição a enxertos e fazem uso de corticoides por mais tempo (Barnes e Marr, 2007).

A terapia para infecções fúngicas invasivas (IFI) nestes pacientes não é bem definida, no entanto, os derivados azólicos e anfotericina B têm sido usados muitas vezes com eficácia nos casos de CI (White et al. 2002). A profilaxia realizada com derivados azólicos tem mostrado redução nas infecções invasivas por *Candida* e consequentemente a incidência de infecção e a mortalidade por esta levedura,

apresentam uma redução na proporção de aproximadamente 5% segundo Prentice et al. (2000).

1.3. Agentes Antifúngicos

Em consequência da similaridade bioquímica e fisiológica existente entre as células fúngicas e células humanas o arsenal terapêutico fúngico disponível para tratamento da candidíase torna-se bastante limitado. A maioria dos agentes antifúngicos disponíveis, como os derivados azólicos e anfotericina B, tem como alvo o ergosterol que é um esterol da membrana celular fúngica, que possui estrutura semelhante ao colesterol presente na célula humana (Odds *et al.* 2003). Medicamentos como as equinocandinas, representam uma ótima alternativa para o tratamento de candidíase. Estes antifúngicos atuam sobre a parede celular fúngica que apresenta constituição diferenciada das células dos mamíferos (Fortúm-Abete 2009).

1.3.1. Derivados azólicos

São compostos sintéticos que surgiram como alternativa ao uso da Anfotericina B por serem menos tóxicos e possuírem um amplo espectro de ação e melhores propriedades farmacocinéticas (Lyman & Walsh 1992).

Os antifúngicos azólicos de administração oral ou intravenosa são comumente utilizados no tratamento das micoses inibindo a produção do ergosterol (Como & Dismukes 1994, Ghannoum & Hossain 2000, Klepser et al. 2000, Silva 2005, Brown 2007) . Fluconazol, voriconazol e itraconazol são compostos triazólicos, que atuam bloqueando a enzima 14- α -demetilase, presente no citocromo P-450 da célula fúngica, impedindo a demetilação do precursor lanosterol em ergosterol (Vanden Bossche et al. 1994, Vanden Bossche 1997, Silva et al. 1998, Maertens 2004).

A administração de fluconazol em CI reduz a mortalidade dos pacientes submetidos a transplante de células hematopoiéticas (Goodman et al. 1992). Este derivado azólico é altamente eficaz na maioria das infecções por *Candida*, sendo capaz inclusive de penetrar no sistema nervoso central (Nucci & Colombo 2002). Fluconazol é usado como profilático no tratamento em pacientes neutropênicos com risco de desenvolverem IF (Burgess et al. 2000). A introdução deste antifúngico como profilaxia possibilitou a redução de candidíase invasiva de 10-25% para <5% nos últimos anos em

pacientes transplantados alogênicos de células estaminais hematopoiéticas (Mora-Duarte et al. 2002, Wingard & Leather 2004, Falagas et al. 2006, Staber et al. 2007). Embora a profilaxia com fluconazol em transplantados alogênicos tenha resultado na redução de infecções por *Candida*, essencialmente por *C. albicans*, este procedimento estimulou uma mudança de etiologia. Espécies de *Candida não-albicans*, como *C. krusei* e *C. glabrata* resistentes ao fluconazol, tornaram-se emergentes, dificultando o tratamento para estas infecções (Abi-Said et al. 1997, Marr et al. 2000, Richardson & Lass-Flörl 2008).

O itraconazol é um antifúngico de amplo espectro, disponível em duas formulações: oral e intravenosa, sendo que esta última é a mais utilizada. Este fármaco, entretanto deve ser administrado com cuidado, pois pode produzir efeitos tóxicos ao organismo do hospedeiro, como hipocalcemia e edema (Schaffner & Bohler 1993, Buggia et al. 1996, Sugar & Liu 1998, Kontoyiannis et al. 2000). A absorção de itraconazol em solução apresenta-se com maior eficácia do que quando formulado em cápsulas. Bons resultados desta formulação líquida em pacientes neutropênicos e submetidos a transplantes de medula têm sido verificados (Prentice et al. 2000). Cápsulas de itraconazol podem ser usadas como terapia de manutenção em pacientes com SIDA e como profilaxia em pacientes com neutropenia (Martin 1999).

O voriconazol é um triazólico que está estruturalmente relacionado ao fluconazol, porém possui atividade tanto para *Candida* quanto para *Aspergillus*. Este fármaco é relativamente novo no mercado, mas tem sido utilizado em pacientes transplantados que apresentam febre e neutropenia, com bons resultados (Walsh et al. 2002). Efeitos adversos como rash cutâneo, toxicidade hepática, e distúrbios visuais podem ser vistos com o uso de voriconazol. Maior eficácia de voriconazol sobre o fluconazol tem sido observada (Martinez 2006) sendo que em casos de candidíase do esôfago, observou-se uma cura em 94,8% dos pacientes tratados com voriconazol sobre 90,1% dos tratados com fluconazol. Corroborando para estes dados, Hegener et al. (1998) verificaram a eficácia de voriconazol em 12 pacientes com SIDA refratários ao fluconazol. Testes de suscetibilidade *in vitro* mostram que este antifúngico apresenta valores muito baixos de concentração inibitória mínima, sendo que *in vitro* voriconazol é efetivo para várias espécies de *Candida* inclusive *C. glabrata*, *C. krusei*, e *C. tropicalis* (Gerzenshtein et al. 2005).

Isolados de espécies de *Candida* resistentes aos azólicos e dificuldades no tratamento têm emergido em pacientes com infecções fúngicas oportunistas (Diekema

et al. 2005, Fleck & Hof 2008). *C. glabrata* e *C. krusei* têm se mostrado comumente resistentes ao fluconazol devido ao uso prolongado deste agente antifúngico (Taylor et al. 2000, Colombo et al. 2002). Segundo Barchiesi et al.(2002), pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) que fazem uso de terapia antiretroviral altamente ativo (HAART), freqüentemente apresentam leveduras na cavidade bucal resistentes ao fluconazol. A frequência de resistência em cepas isoladas de infecção da corrente sanguínea, é pouco conhecida. As taxas de resistência de isolados do Brasil procedentes da corrente sanguínea a antifúngicos azólicos são baixas, alcançando menos de 3%, excetuando-se *C. glabrata*, que tem habilidade para desenvolver resistência a este quimioterápico (Colombo et al. 2003, Antunes et al. 2004). Outra observação interessante com relação a resistência aos azólicos, refere-se a aderência e colonização de leveduras a material de dispositivo como o cateter (formação de biofilme) o qual induz a uma menor suscetibilidade ao fluconazol (Mateus et al. 2004).

São conhecidos três mecanismos de resistência aos azólicos. 1- Redução do acúmulo intracelular do fármaco resultante da utilização reduzida deste agente antifúngico ou do aumento da excreção do fármaco devido à ação de produtos de genes de resistência aos antifúngicos, 2- Alteração estrutural da enzima 14- α -demetilase, resultando em uma diminuição na sua ligação aos azólicos, 3- Síntese aumentada de 14- α -demetilase, devido à amplificação do gene ERG11 (transformação de lanosterol em ergosterol não é totalmente impedida quando sob a ação do derivado azólico) (Nenoff et al. 1999, Heilmann et al. 2010).

1.3.2. Poliênicos

A anfotericina B pertencente à ampla família dos macrolídeos poliênicos, atua ligando-se ao ergosterol da membrana celular fúngica, alterando sua permeabilidade o que acarreta desequilíbrio osmótico pela perda de íons intracelulares e conseqüentemente lise e morte das células (Vanden Bossche 1997). Anfotericina B pode ser usada para o tratamento de doenças endêmicas causadas por diferentes agentes como *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* que são causadores de lesões sistêmicas graves, e também tem sido amplamente utilizada no tratamento de CI (Cuenca-Estrela et al. 2000, Carrillo-Muñoz et al. 2001).

Os efeitos adversos mais comuns de anfotericina B são instabilidade cardiovascular, febre, hipoxemia, nefrotoxicidade. Os riscos de nefrotoxicidade

aumentam com a administração concomitante de outros agentes nefrotóxicos. Outras formulações ligadas a anfotericina B, podem diminuir a toxicidade desta substância como as preparações associadas a lípidos, ou seja anfotericina B lipossomal (Ambisome), dispersão coloidal de anfotericina B (Amphotec) e complexo lipídico de anfotericina B (Abelcet). Embora anfotericina B e suas formulações não sejam muito toleradas pelos pacientes, este fármaco tem sido usado em casos de transplantados que não respondem a outros tratamentos (Brown 2007).

Poucos relatos sobre resistência aos poliênicos têm sido verificados em isolados de *Candida*. *C. lusitaniae* e *C. tropicalis* já foram detectadas mostrando resistência a este poliênico (Boff et al. 2008). O mecanismo de resistência a anfotericina B pode ocorrer devido a uma alteração dos lipídios na membrana celular do fungo, onde o ergosterol dá lugar à formação de outros lipídios (Sanglard 2002).

1.3.3. Equinocandinas

É uma classe de fármacos, cujo mecanismo de ação consiste na capacidade que estas substâncias têm de interferir na síntese da parede celular do micro-organismo inibindo a β (1,3)-glucana sintase, impedindo a síntese de glucanas. O bloqueio da produção de glucanas resulta em desequilíbrio osmótico, o que pode interferir na viabilidade da célula fúngica (Martinez 2006). A inibição da síntese de glucanas também apresenta efeitos secundários sobre outros componentes da célula, como redução de lanosterol e ergosterol e o aumento das concentrações de quitina (Douglas et al. 1997). Estes agentes antifúngicos se ligam às proteínas plasmáticas possuindo uma boa distribuição no organismo humano, apresentando poucos efeitos colaterais (Denning 2003).

Entre as equinocandinas são conhecidas: micafungina, caspofungina e anidulafungina. A micafungina possui uma atividade fungicida natural para espécies de *Candida* e é a única equinocandina aceita para tratamento de candidíase de neonatos. Micafungina é também indicada nos casos de candidíase esofágica, candidemia, peritonites e abscessos e como profilático nas infecções por *Candida* em pacientes submetidos a transplante de células progenitoras hematopoiéticas (Theuretzbacher 2004). A caspofungina assim como o voriconazol tem demonstrado uma atividade antifúngica *in vitro* contra *Aspergillus sp* e nas espécies de *Candida*, incluindo isolados resistentes ao fluconazol (Kartsonis et al. 2002, Hollenbach 2008).

O desenvolvimento de resistência às equinocandinas é raro, sendo menos tóxicos do que os outros antifúngicos sistêmicos (Park et al. 2005). O mecanismo de resistência de micro-organismos a estes agentes antifúngicos pode ser decorrente de um aumento na síntese da proteína *Sbep* do complexo de Golgi, controlada pelo gene GAL1, que regula os mecanismos de transporte de componentes celulares para a parede da célula fúngica. Moudgal et al. (2005) relataram o desenvolvimento de resistência de *Candida* a múltiplas equinocandinas durante a exposição a esses agentes antifúngicos. Dados preliminares de um estudo *in vitro* utilizando equinocandinas sugerem CIMs desse fármaco maiores para isolados de *C. parapsilosis* do que para outras espécies de *Candida* (Pfaller et al. 2002).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Isolar e caracterizar leveduras obtidas de amostras clínicas de pacientes transplantados de medula óssea.

2.2. Específicos

1-Isolar e identificar as leveduras do gênero *Candida* de diferentes amostras clínicas

2-Identificar os principais fatores de risco para candidíase .

3-Verificar a produção de proteinase, como também a atividade hemolítica das espécies de *Candida* isoladas.

4- Determinar e comparar as concentrações inibitórias dos antifúngicos itraconazol, voriconazol, fluconazol, caspofungina e anfotericina B para os isolados de *Candida* spp usando duas metodologias de suscetibilidade *in vitro*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Procedência dos isolados e identificação

Foram analisadas 410 amostras clínicas provenientes de 144 pacientes transplantados de medula óssea provenientes do Hospital Araújo Jorge em Goiânia-GO, durante o período de dezembro de 2008 a junho de 2011. Dentre as amostras, 398 eram de sangue, oito (8) de lavado brônquico, três (3) de urina, um (1) líquido. Todos os pacientes diagnosticados sofrendo de doenças hematológicas graves, e submetidos ao transplante de medula óssea alogênico ou autólogo, concordaram em participar da pesquisa e deram consentimento informado por escrito e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer do Estado de Goiás (ACCG), protocolo nº 055/2008. Os dados relativos aos principais fatores de risco destes pacientes, como neutropenia, uso de antibióticos de amplo espectro e catéter venoso central, foram catalogados de acordo com o prontuário do Hospital Araújo Jorge (Anexo 1).

A colheita de sangue foi realizada assepticamente (15-20 mL) com seringa heparinizada (ou com anticoagulante ácido diamino etano tetra-acético-EDTA), e semeado em meio bifásico: fase sólida de ágar brain heart infusion (BHI), inclinado e fase líquida de caldo (BHI). Os tubos de ensaio foram incubados a 36°C e a temperatura ambiente, examinados diariamente, observando-se o crescimento do microrganismo no meio sólido ou pela turvação da fase líquida. Após o crescimento os fungos isolados foram transferidos para tubos de ensaio, contendo ágar Sabouraud dextrose, para posterior identificação (Telles Filho & Severo 1997).

As amostras de urina e fluidos corporais como lavado brônquico e líquido, foram coletadas e enviadas ao laboratório de micologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), para processamento e identificação. Estas amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos e o sedimento obtido foi realizado exame direto com hidróxido de potássio a 20% e cultivados em ágar Sabouraud dextrose mantidos a temperatura ambiente e a 36°C.

Todas as leveduras foram identificadas de acordo com Kurtzman & Fell (1998), usando a técnica de produção de tubo germinativo em soro fetal bovino, produção de clamidoconídios em ágar corn meal suplementado com 1% de tween 80 e teste de

assimilação de hidratos de carbono (auxanograma). Concomitantemente estes isolados foram inoculados em meio de CHROMagar Candida (CHROMagar, Paris, France) para identificação presuntiva. Para todos os testes subsequentes foi usado como controle a cepa padrão de *C. albicans* ATCC 28367 e ATCC de *C. parapsilosis* 22019.

3.2. Determinação dos fatores de virulência das leveduras

3.2.1. Proteinase

A detecção da atividade de proteinase foi realizada segundo a técnica de Ruchel et al. 1982. Alíquotas de 5 µl de suspensão de *Candida* numa concentração de 1×10^7 UFC mL⁻¹ foram colocadas em meio indutor de proteinase por 72 horas a 35°C. O meio indutor consiste de 0,2% de soro albumina bovina (SAB, fraction V, Sigma) e solução de vitaminas (Sigma) adicionadas de Yeast Carbon base (YCB - Difco, Detroit, MI, USA), ajustado a pH 5, esterilizado por filtração e adicionado de ágar (2%) autoclavado.

A atividade da proteinase foi medida pelo tamanho do halo de opacidade da hidrólise de SAB, única fonte de nitrogênio do meio. A atividade enzimática denominado de Pz foi calculada como proporção entre o diâmetro da colônia e diâmetro da zona de degradação do substrato. $Pz > 0,64$ foi considerado fortemente positivo, $1 < Pz > 0,64$ positivo e $Pz=1$ negativo.

3.2.2. Atividade Hemolítica

A detecção do fator hemolítico dos isolados de *Candida* obtidos das amostras clínicas foi realizado segundo Luo et al. 2001. Cada uma das amostras foi inoculada na superfície do meio de cultura contendo ágar Sabouraud dextrose com 3% de glicose e 7% de sangue de carneiro desfibrinado, pH ajustado a $5,6 \pm 0,2$ incubadas a 37°C por 48 horas. A presença de hemólise foi visualizada pelo halo ao redor da colônia (halo transparente no meio=beta hemólise, halo esverdeado=alfa hemólise e ausência de halo=gama hemólise). O fator hemolítico foi calculado pela razão entre o diâmetro da colônia mais da hemólise, dividido pelo diâmetro da colônia. Como controle positivo foi utilizado *C. albicans* (ATCC 10231) e como controle negativo *C. parapsilosis* (ATCC 22019) que não promove a formação de halo de hemólise.

3.3. Suscetibilidade *in vitro*

A suscetibilidade *in vitro* para as leveduras isoladas foi realizada utilizando duas metodologias: microdiluição em caldo para leveduras seguindo o documento M27-A3 (2008) proposto pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e pela técnica de difusão em agar (Etest®).

3.3.1. Agentes Antifúngicos

Voriconazol (Pfizer), anfotericina B (Squibb), caspofungina (Meck Sharp & Dohme) e itraconazol (Janssen-Pharmaceuticals) dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e fluconazol (Pfizer), dissolvida em água destilada foram utilizados para verificar a suscetibilidade *in vitro* através da metodologia de microdiluição em caldo. Estes mesmos antifúngicos foram avaliados utilizando a técnica de Etest®. Para microdiluição em caldo as concentrações dos antifúngicos variaram de 0,125 µg/mL a 64 µg/mL para fluconazol e caspofungina e de 0,031 µg/mL a 16 µg/mL para Anfotericina B, voriconazol e itraconazol. Para a técnica do Etest as concentrações dos antifúngicos foram as já definidas pelas tiras, as quais variaram de 0,016 µg/mL a 256 µg/mL para fluconazol e de 0,002 µg/mL a 32 µg/mL para caspofungina, voriconazol, anfotericina B e itraconazol.

3.3.2. Método de Microdiluição em caldo

Foi utilizado o meio de RPMI 1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio, tamponado com 0,165 mol/L de tampão MOPS (ácido morfolinopropanossulfônico) para pH 7,0 e esterilizado por filtração.

3.3.2.1 Preparo do Inóculo

Os isolados de leveduras foram cultivados em ágar Sabouraud dextrose por 24 horas a temperatura ambiente. Uma suspensão foi preparada em salina a 0,85% esterilizada e a densidade celular medida em espectrofotometria para uma transmitância de 85% em comprimento de onda de 530 nm. Esta suspensão foi posteriormente diluída a 1:50 e a seguir a 1:20 em RPMI 1640 de modo a permitir uma concentração final do inóculo de 1 a 5×10^3 UFC/mL.

3.3.2.2 Realização e Leitura do Teste

Foram utilizadas placas de microtitulação contendo 96 poços, nos quais em cada poço, foram pipetados 100 μ L do agente antifúngico em diferentes concentrações e 100 μ L do inóculo.

A leitura foi realizada após incubação de 48 horas a temperatura de 35°C. Para os derivados azólicos a concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de inibir pelo menos 50% do crescimento do microrganismo estudado, comparado ao controle (livre do agente antifúngico). Para anfotericina B a CIM foi definida como a menor concentração do agente antifúngico capaz de inibir o crescimento total do microrganismo. A figura 1 esquematiza a execução do teste de suscetibilidade *in vitro*. Uma cepa ATCC 22019 de *C. parapsilosis* foi usada como controle. Controle dos agentes antifúngicos, do inóculo e do meio de cultura (RPMI 1640) foi realizado em cada teste (Figura 1) e todos os ensaios foram realizados em duplicata.

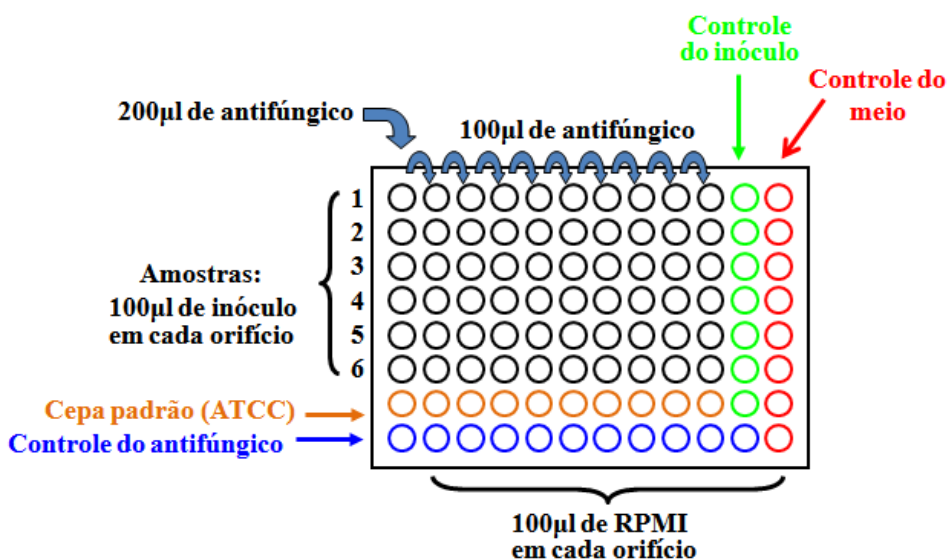


Figura 1: Esquema do procedimento para a realização do teste de suscetibilidade *in vitro* pelo método de microdiluição em caldo.

3.3.3. Etest

Esta técnica determina quantitativamente a susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos, baseado em gradientes de concentração em fita plástica, através da técnica de difusão em ágar. O método de Etest foi feito de acordo com as instruções do fabricante (AB Biodisk, Solna, Sweden). Placas de petri foram adicionadas de 20 mL de

meio de RPMI contendo 2% de glicose tamponado com MOPS, pH 7,0, e 1.5% de ágar agar (Difco Laboratories, USA). Uma suspensão (3 mL) do isolado de densidade celular correspondente a 0,5 da escala de Mac Farland foi inoculada nas placas de petri contendo o agar RPMI. A suspensão foi repassada usando-se um swab por toda a superfície do meio. Após 15 a 30 minutos em repouso as fitas de Etest foram colocadas na superfície do meio, e as placas foram incubadas por 48 horas a 35°C. A leitura de CIM foi realizada pela concentração em que a zona elíptica de inibição interceptou a fita de Etest. Amostra padrão de *C. parapsilosis* ATCC 22019 foi incluída como controle. Os ensaios foram realizados em duplicata.

3.3.3.1 Interpretação dos resultados dos testes de suscetibilidade in vitro

Isolados de leveduras foram considerados como resistentes seguindo valores de CIM preconizados no documento M27-A3 (2008) do CLSI em concentrações de ≥ 1 $\mu\text{g/mL}$ para itraconazol, ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ para o fluconazol, > 2 $\mu\text{g/mL}$ para caspofungina e ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$ para voriconazol. Para anfotericina B valores de CIM > 1 $\mu\text{g/mL}$ foram considerados resistentes, como sugerido por estudos de Nguyen et al. 1998.

4. RESULTADOS

Dos 144 pacientes estudados submetidos a transplante de medula óssea, e portadores de doenças hematológicas 56,25% pertenciam ao gênero masculino e o maior número de pacientes pertencia a faixa etária entre 41 e 60 anos de idade representando um percentual de 34% (Figura 2).

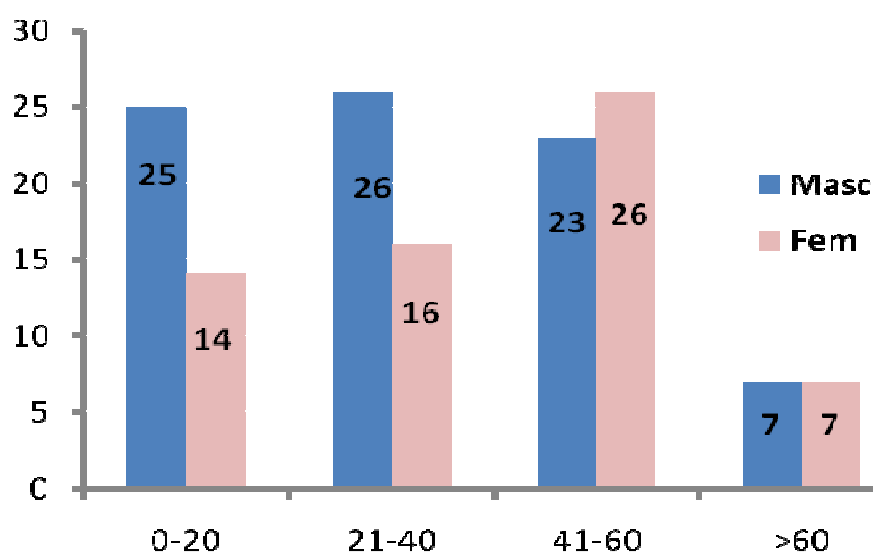


Figura 2: Idade e gênero de 144 pacientes submetidos a transplantes de medula óssea e portadores de doenças hematológicas

Patologias de Base

Verificou-se que as patologias de base mais frequentemente diagnosticadas nos pacientes estudados foram: leucemias, linfomas e mieloma múltiplo, perfazendo um total de 96,9%. A tabela 1 mostra as patologias encontradas nestes pacientes.

Tabela 1. Transtornos hematológicos verificados nos 144 pacientes estudados

Patologias de base	número	Porcentagem(%)
LMA	31	21,5
LLA	27	18,7
LMC	4	2,7

MM	25	17,3
LH	25	17,3
LNH	28	19,4
AA	2	1,4
SMD	1	0,7
HPN	1	0,7

LMA-Leucemia mieloide aguda, LMC-Leucemia mieloide crônica, LLA-Leucemia linfóide aguda, LH-Linfoma de Hodgkin, LNH-Linfoma não Hodgkin, MM- Mieloma múltiplo, AM-Aplasia de medula, AA-Anemia aplástica, SMD- Síndrome mielodisplásica, HPN- Hemoglobinúria paroxística noturna.

Dos 144 pacientes estudados foram isoladas 11 (7,63%) leveduras identificadas como pertencentes ao gênero *Candida*, obtidas em no mínimo duas amostras clínicas de um mesmo paciente. Os testes utilizados como produção de tubo germinativo e crescimento em CHROMagar (Figura 3), formação de clamidoconídios e assimilação de hidratos de carbono (Figura 4), permitiram identificar cinco (45,45%) *C. parapsilosis*, três (27,27%) *C. albicans* e um (9,09%) *C. tropicalis*. Duas amostras (18,8%) não foram identificadas quanto a espécie.

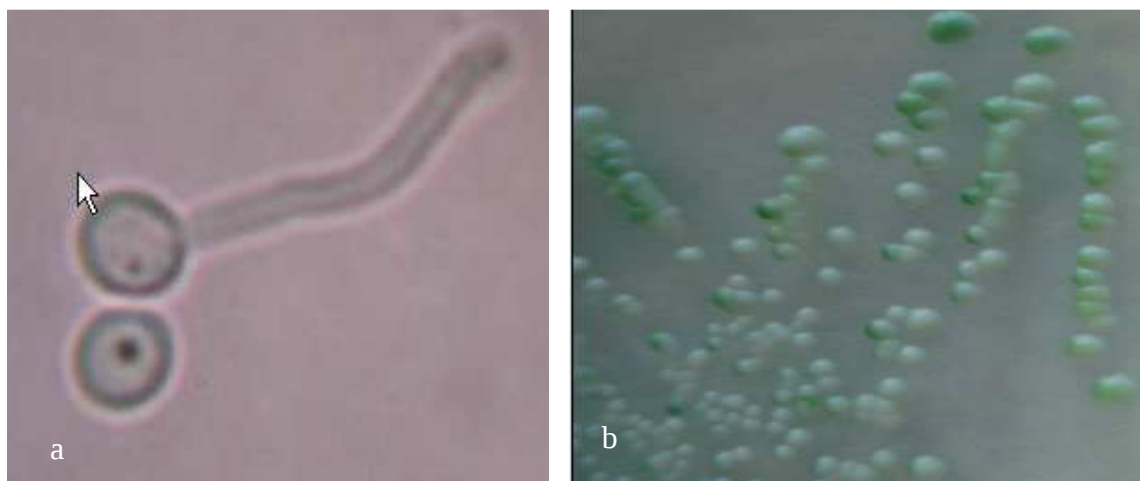


Figura 3. Tubo germinativo (a) e coloração esverdeada em CHROMagar (b) mostrada por *C. albicans* isolada de paciente com candidemia.

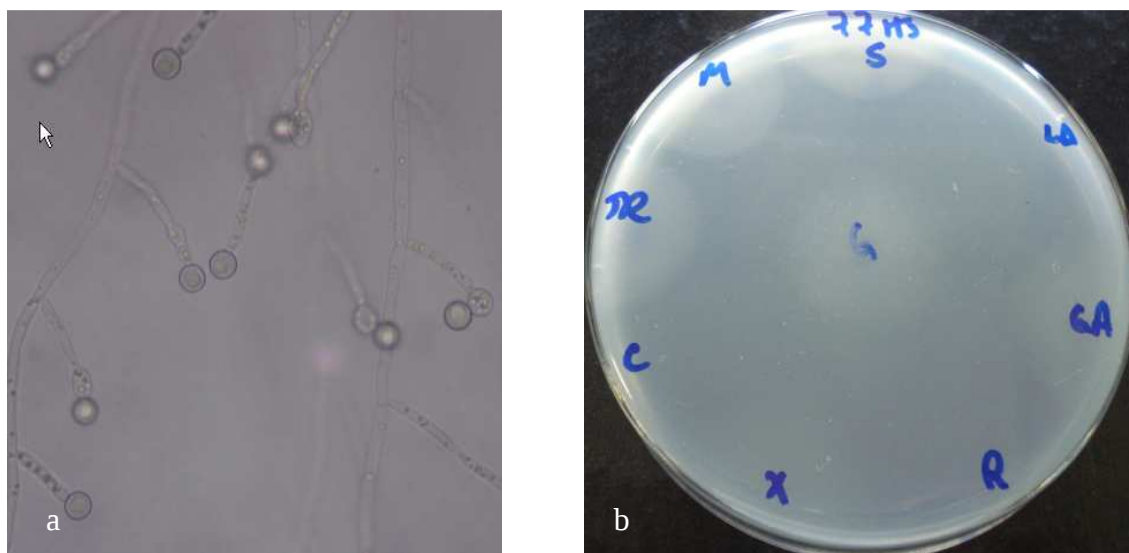


Figura 4. Presença de clamidoconídios em ágar Corn meal (a) e comportamento de assimilação de hidratos de carbono (b) verificados por *Candida albicans* isolada

As espécies de *Candida* isoladas do material clínico e o número de amostras positivas encontram-se na tabela 2.

Tabela 2. Amostras e espécies de leveduras isoladas de pacientes com transtornos hematológicos e submetidos a transplante de medula óssea.

Nº do isolado	Espécime clínica	No. amostras positivas	Fungo
05	Sangue periférico	2	<i>C. albicans</i>
15	Sangue de catéter e periférico	2	<i>C. parapsilosis</i>
35	Sangue periférico	2	<i>C. albicans</i>
38	Sangue de catéter e periférico	2	<i>C. parapsilosis</i>
45	Sangue periférico	3	<i>C. tropicalis</i>
77	Sangue de catéter e periférico	2	<i>C. parapsilosis</i>
105	Sangue de catéter e periférico	2	<i>Candida</i> spp
106	Sangue periférico	2	<i>C. parapsilosis</i>
120	Sangue periférico	3	<i>C. parapsilosis</i>
139	Sangue periférico	2	<i>Candida</i> spp
144	Sangue periférico	3	<i>C. albicans</i>

Foi observado vários fatores predisponentes associados aos pacientes com candidemia, sendo que o uso de cateter venoso central e neutropenia foram os mais frequentemente envolvidos. O transplante alogênico foi realizado em 72,7% dos 11 pacientes nos quais *Candida* foi isolada da corrente sanguínea. Estas condições e o tipo de transplante associado aos pacientes com candidemia encontram-se inseridos na tabela 3.

Tabela 3 Condições associadas aos 11 pacientes, nos quais se isolou *Candida* spp

Condições associadas	Número	Porcentagem (%)
Antibióticos	8	72,7
Cateter venoso central	11	100
Corticosteróide	11	100
Quimioterapia	11	100
Neutropenia	8	72,7
Antifúngico prévio	11	100
Transplante alogênico CPSP	8	72,7
Transplante autólogo	3	27,3

CPSP: células progenitoras de sangue periférico

As amostras de *Candida* tiveram comportamentos diferentes com relação aos antifúngicos estudados. Os isolados de *C. parapsilosis* foram suscetíveis a todos os antifúngicos, enquanto dois isolados de *C. albicans* e o de *C. tropicalis* (1) mostraram-se resistentes aos três derivados azólicos. Os dois isolados de *Candida* não identificados com relação a espécie foram suscetíveis apenas a caspofungina. Os resultados encontrados pelas duas metodologias foram muito semelhantes, sendo que todos os isolados tiveram o mesmo comportamento com relação a resistência ou suscetibilidade observada tanto pelo método de Etest como pela microdiluição em caldo. As figuras 5 e 6 mostram o comportamento de *Candida* pelas duas metodologias de suscetibilidade *in vitro*. A variação das concentrações de itraconazol, anfotericina B, fluconazol, voriconazol e caspofungina sobre os isolados de *Candida* se encontra na tabela 4.

Tabela 4. Variação de concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) de diferentes agentes antifúngicos sobre os isolados de *Candida* obtidos do sangue de pacientes transplantados de medula óssea e portadores de doenças hematológicas

Antifúngico /metodologia	<i>C. albicans</i> (n=3)	<i>C. parapsilosis</i> (n=5)	<i>C. tropicalis</i> (n=1)	<i>Candida</i> spp (n=2)
Itraconazol				
Microdiluição	0,25 - >16	<0,03 - 1	>16	4 - 16
Etest	0,25 - >32	<0,002 – 0,5	>32	32 - 32
Anfotericina B				
Microdiluição	0,25 – 0,5	0,125 - 1	0,5	4 - 8
Etest	0,25 – 0,38	0,125- 0,5	0,25	8 - 32
Fluconazol				
Microdiluição	0,5 - >64	0,25 – 0,5	64	>64 >64
Etest	0,38 - >256	0,19 – 0,75	>32	>256 >256
Voriconazol				
Microdiluição	<0,03>16	<0,03 - 1	>16	0,25 – 0,5
Etest	0,003 >32	<0,002 – 0,125	>32	0,19 – 0,25
Caspofungina				
Microdiluição	0,06 – 0,06	0,03 – 0,5	0,06	0,03- 0,06
Etest	0,125 – 0,125	0,125 – 0,75	0,047	0,125 – 0,25

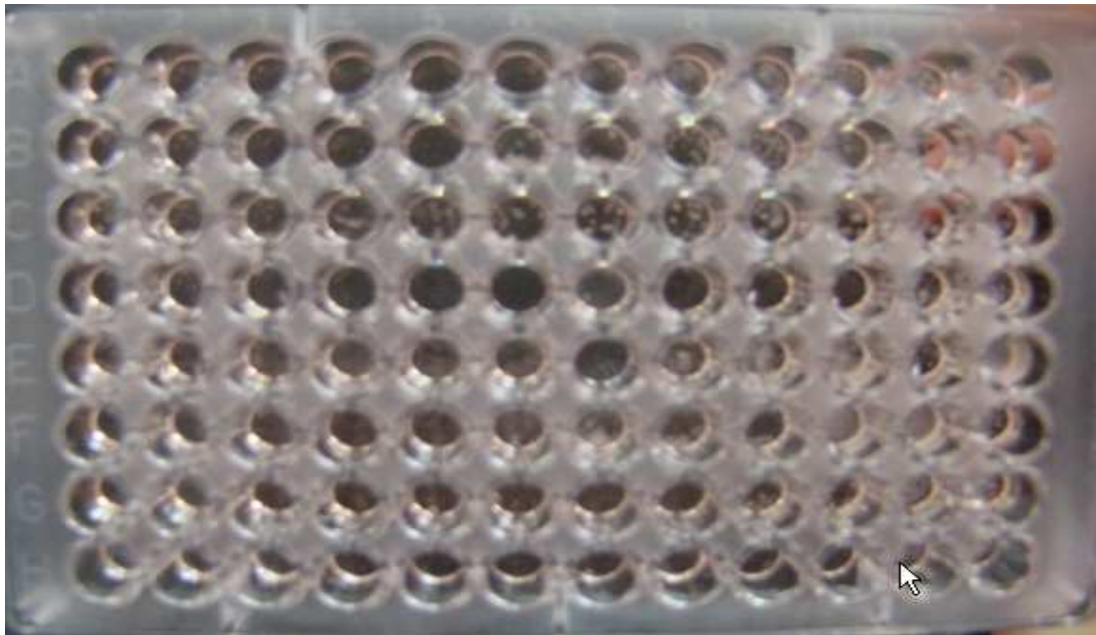


Figura 5. Placa de microtitulação mostrando concentrações inibitórias obtidas de itraconazol sobre seis (6) diferentes espécies de *Candida*.

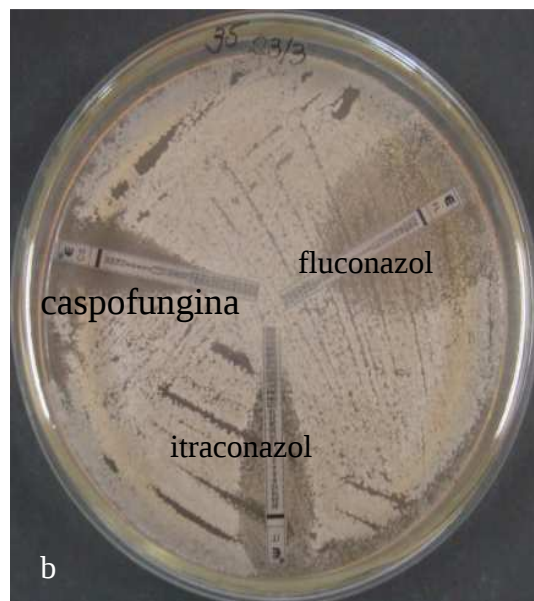
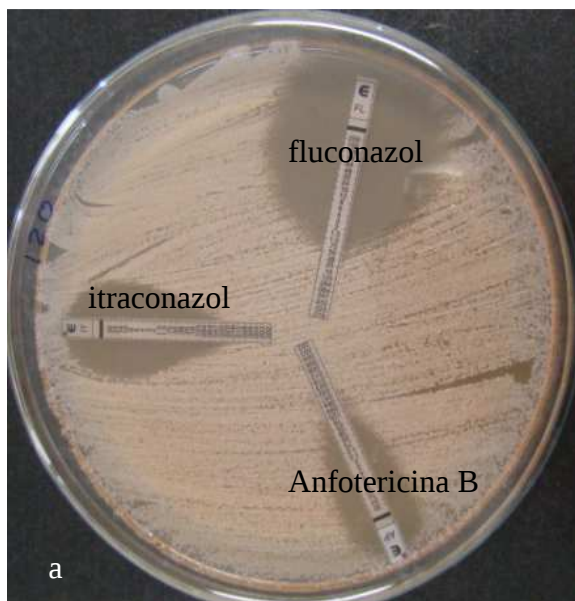


Figura 6: Placas de Petri mostrando as fitas de Etest e seus halos de inibição de crescimento das colônias de *Candida*. a- Isolado suscetível ao fluconazol, itraconazol e anfotericina B; b- isolado resistente ao fluconazol e ao itraconazol, mas suscetível a caspofungina

A atividade de proteinase dos fungos mostrou que oito isolados de *Candida* foram fortemente proteolíticos, e três (3) não foram capazes de exibir esta enzima. Com relação a atividade hemolítica verificou-se que cinco amostras (5) exibiram hemólise do tipo β e quatro (4) do tipo α . A figura 7 mostra forte atividade proteolítica e a hemólise do tipo β expressada por isolados de *Candida*.

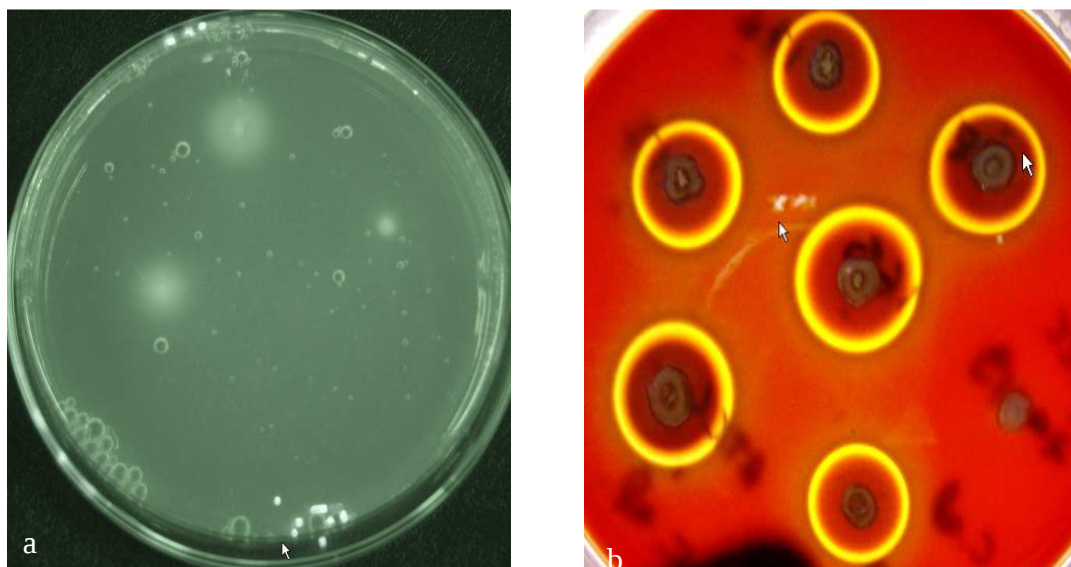


Figura 7.a- Placa de Petri mostrando forte atividade proteolítica de dois isolados de *Candida*. b- Atividade hemolítica tipo β de isolados de *Candida*

Tabela 5. Atividade de proteinase e de hemólise encontrada em 11 diferentes isolados de *Candida* obtidas de pacientes transplantados de medula óssea e com problemas hematológicos

nº do isolado /Espécie	Valores de pz	Atividade Hemolítica	
	proteinase	α	β
05/ <i>C. albicans</i>	0,2		1,5
15/ <i>C. parapsilosis</i>	0,4	1,5	
35/ <i>C. albicans</i>	0,37		1,4
38/ <i>C. parapsilosis</i>	0,18		1,2
45/ <i>C. tropicalis</i>	0,4		1,3
77/ <i>C. parapsilosis</i>	0,5	1,2	
105/ <i>Candida</i> spp	1		Sem atividade
106/ <i>C. parapsilosis</i>	0,5	1,1	

120/ <i>C. parapsilosis</i>	1	1,3
139/ <i>Candida</i> spp	1	Sem atividade
144/ <i>C. albicans</i>	0,15	1,7

Pz= diâmetro da colônia / diâmetro da zona de degradação do substrato + colônia. O fator hemolítico foi calculado pela razão entre o diâmetro da colônia mais da hemólise, dividido pelo diâmetro da colônia (halo transparente no meio=beta hemólise e halo esverdeado =alfa hemólise).

5. DISCUSSÃO

O transplante de medula óssea é uma modalidade terapêutica que beneficia um grande número de pacientes com câncer ou com outras doenças. Estes transplantes estão normalmente associados a leucemias como já detectados por diferentes pesquisadores (Nucci & Maiolino 2000, Rieger et al. 2009). Cerca de 60% dos pacientes estudados tiveram como principal causa para a realização de transplante, um tipo de leucemia, seja aguda ou crônica. Segundo Bhayat et al. (2010), a população de transplantados é semelhante entre homens e mulheres, com cerca de 5% maior no gênero masculino com faixa etária mais comum em indivíduos abaixo de 70 anos. A população deste trabalho era constituída de 56,2% homens e a faixa etária que mais realizou transplantes encontrava-se entre 41 a 60 anos.

Apesar dos benefícios que ocorrem quando se realiza um transplante, este tipo de tratamento pode ser considerado de risco, pois ocorrem complicações que tornam maior a taxa de morbi-mortalidade. Entre as complicações, as infecções são consideradas como principais causas de óbito (Rieger et al. 2009).

Candida é a mais comum causa de infecção fúngica invasiva, sendo responsável por aproximadamente 70 a 90% de todas as micoses invasivas (Leroy et al. 2009). A incidência de candidemia entre os pacientes transplantados é geralmente elevada, sendo que neste estudo foi de 7,6%. Entre transplantados de medula óssea do tipo alogênico, Rieger et al. (2009) verificaram que de 59 pacientes, 11,8% apresentaram infecções invasivas por fungos do gênero *Candida*.

Candida albicans foi durante muitos anos o agente etiológico mais comum deste tipo de infecção (Leroy et al. 2009), entretanto atualmente as espécies não *albicans* são consideradas predominantes (Ng et al. 2000, Capoor et al. 2005). Esta alteração de espécies pode ser explicada pelo uso de tratamento profilático realizado com derivados azólicos os quais são capazes de agir sobre *C. albicans* e dão lugar ao crescimento de outras espécies. *C. parapsilosis*, no presente estudo, foi a espécie predominante como agente de candidíase em 45,4% dos casos diagnosticados, o que mostra a emergência desta espécie. Similaridade de comportamento, onde *C. parapsilosis* apresenta-se como a principal responsável por candidíase invasiva tem sido observada por diferentes pesquisadores (Celebi et al. 2007). Segundo alguns estudiosos as espécies não *albicans* estão associadas a neoplasia, neutropenia e ao uso prévio de fluconazol (Abi-Said et al.

1997, Sendid et al. 2006). Embora as espécies de *Candida* sejam habitantes do trato gastrointestinal e pele, sendo a infecção, portanto, a maioria das vezes de origem endógena (Barnes & Marr 2007), *C. parapsilosis* é considerada agente de infecções exógenas, sendo capaz de colonizar a pele, tendo sido isolada de mãos de profissionais, de soluções glicosadas de uso hospitalar e de cateter venoso central. (Alangaden 2011).

A profilaxia com fluconazol em todos os onze indivíduos com candidíase invasiva verificada neste trabalho fez com que provavelmente outras espécies de *Candida* não *albicans* fossem confirmadas como agentes da doença, ou seja, cinco *C. parapsilosis*, uma *C. tropicalis* e duas amostras que não foram identificadas, mas não se tratam de *C. albicans*. Apesar do progresso em quimioterapia antifúngica, a proporção de taxa de mortalidade continua aumentando. Um alto índice de mortalidade foi registrado entre os pacientes com candidemia, verificando-se a morte em cinco (45,4%) destes. Nos Estados Unidos, a taxa de mortalidade entre os pacientes hospitalizados durante os anos de 1983-1986 foi de 38% (Gudlaugsson et al. 2003) o que evidencia a importância da descoberta precoce desta doença. Des Champs Bro et al. 2011 atribuem a taxa de mortalidade de 30 a 60% devido a candidíase sistêmica em pacientes com problemas onco-hematológicos

Os mais importantes fatores de risco para candidemia incluem cateter intravascular, hiperalimentação parenteral, uso de corticoides, de antibióticos de largo espectro e de quimioterápicos (Cheng et al. 2005). Entre as condições associadas aos 11 pacientes as mais frequentes foram o uso de corticosteroides e de quimioterápicos, além da presença de cateter venoso central observado em todos os pacientes com candidemia. Achados semelhantes foram relatados por Nucci et al. (1998) que verificaram que estas condições também estavam associadas a pacientes que apresentavam fungemia. O tipo de transplante avaliado com relação aos pacientes estudados em nossa casuística também pareceu afetar a presença de *Candida* invadindo a corrente sanguínea, pois em oito pacientes que realizaram o transplante alogênico esta levedura foi isolada, resultando em cinco mortes. As infecções são as complicações mais frequentes em pacientes transplantados com células alogênicas. Segundo Brown (2007) a incidência de infecções fúngicas invasivas é relevante após transplantes de células hematopoiéticas alogênicas resultando em uma maior chance de mortalidade.

Esta alta taxa de morbidade e mortalidade causada por leveduras detectada em pacientes imunocomprometidos torna os testes de suscetibilidade *in vitro* uma ferramenta importante para detecção de resistência dos isolados e consequentemente a

instituição de uma terapia adequada que possibilitará provavelmente que a doença não se torne letal. O acordo de resultados principalmente com relação a resistência dos isolados perante as duas metodologias usadas (Microdiluição em caldo e Etest) foi verificada neste trabalho. Segundo alguns pesquisadores a metodologia de Etest apresenta-se com valores de CIM de antifúngicos muito similares aos de microdiluição em caldo (Costa et al. 2004, Metin et al. 2011). Esta reprodutibilidade de resultados torna o Etest um método vantajoso, pois é de fácil realização quando comparado ao de microdiluição em caldo.

Resistência de *Candida* spp aos diferentes agentes antifúngicos tem sido pouco observada. Fluconazol é um medicamento com grande vantagem no tratamento de candidíase, pois apresenta um perfil baixo de toxicidade e boa eficácia (Chen et al. 2009) Segundo Chen os isolados de *Candida* são pouco resistentes ao fluconazol, estimando-se um percentual < 10%. Furlaneto-Maia et al. (2008) verificaram resistência ao fluconazol para 18,5% dos isolados de *Candida* obtidos da mucosa bucal de indivíduos idosos. Os resultados verificados no nosso trabalho mostraram valores superiores, onde cinco dos isolados de *Candida* (45,4%) de *Candida* foram resistentes ao fluconazol. De forma similar os isolados resistentes ao fluconazol apresentaram o mesmo comportamento com relação ao itraconazol, o que mostra uma resistência cruzada. Manfredi et al. (2006) verificaram que 6,5% dos pacientes estudados apresentaram resistência a estes agentes antifúngicos.

A suscetibilidade *in vitro* dos 11 isolados de *Candida* identificados em nossa casuística mostrou que três (duas *C. albicans* e uma *C. tropicalis*) isolados (27,2%), foram resistentes ao voriconazol. Este antifúngico apresenta maior atividade do que itraconazol e fluconazol contra os isolados de *Candida*. Cendejas-Bueno et al. 2010 verificaram resistência de várias espécies de *Candida* a este antifúngico em isolados clínicos obtidos na Espanha, sendo que maior resistência foi verificada com *C. glabrata* e *C. krusei*.

Anfotericina B e caspofungina têm *in vitro* excelente atividade para as espécies de *Candida*. Embora nove dos 11 isolados de *Candida* tenham apresentado valores de CIM muito baixos para estes antifúngicos, fato interessante ocorreu com os dois isolados de *Candida* os quais não foram identificados quanto à espécie, que foram resistentes a anfotericina B, com valores de CIM ≥ 4 µg/mL. Resistência a anfotericina B é geralmente incomum e ocorre normalmente para espécies não *albicans* (ST-

Germain et al. 2001). Reduzida suscetibilidade a anfotericina B tem sido verificado principalmente com *C. lusitaniae*, *C. glabrata* e *C. krusei* (Krogh-Madsen et al. 2006).

Caspofungina mostra atividade contra espécies de *Candida in vitro*, incluindo amostras resistentes aos derivados azólicos e a anfotericina B. (Keating & Figgitt 2003) Em nosso trabalho não se verificou resistência dos isolados de *Candida* a este agente antifúngico, apresentando CIMs muito baixas que variaram de 0,03 a 0,25 µg/mL.

A alta resistência aos derivados azólicos verificada em nosso trabalho não pode ser devidamente explicada. A provável justificativa pode ser a origem das amostras clínicas. Dados de candidíase invasiva dos pacientes transplantados mostram que o tratamento é difícil e resulta na morte dos pacientes.

Entre os atributos de virulência que favorecem o processo de patogênese principalmente a invasão das espécies de *Candida*, especialmente em candidíase disseminada merece destaque a produção de exoenzimas particularmente das proteinases. A ocorrência de proteinases tem sido previamente demonstrada em várias espécies de *Candida* inclusive, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (França et al. 2010) como observado em nossos isolados de sangue de transplantados de medula óssea. Oito dos 11 isolados foram altamente proteolíticos, verificando negatividade de produção de proteinase em apenas um (1) isolado de *C. parapsilosis* e inexplicavelmente nos dois isolados de *Candida* não identificados. Estes dois isolados também não foram capazes de exibir atividade hemolítica, no entanto apresentaram resistência ao fluconazol, itraconazol e anfotericina B. Existem algumas espécies de *Candida*, como *C. lusitaniae* (Dostal et al. 2003) que apresentam este comportamento, e embora até o momento não tenhamos identificado estes isolados as suas características são similares aos desta espécie.

Além de proteinase, já é bem conhecido que os micro-organismos têm a capacidade de se utilizar do ferro que é de grande importância para sua sobrevivência e habilidade de estabelecer infecção (Bullen 1981). Este metal não se apresenta livre no organismo animal, mas pode ser adquirido de compostos como a hemoglobina. O micro-organismo age provavelmente pela destruição da molécula heme tornando possível a extração do ferro. Segundo Watanabe et al. 1997, *C. albicans* secreta um fator hemolítico (α ou β) que causa a liberação de hemoglobina o qual é usado como fonte de ferro pelo fungo. Dos 11 isolados de *Candida*, verificou-se que todos os isolados de *C. albicans*, o único de *C. tropicalis* e um dos 5 isolados de *C. parapsilosis* exibiram atividade β hemolítica, enquanto 4 isolados de *C. parapsilosis* exibiram

somente o tipo α . A atividade exibida por várias espécies de *Candida* não albicans também tem sido verificada por Luo et al. (2001) que diferente do observado em nosso trabalho não conseguiram detectar atividade hemolítica em isolados de *C. parapsilosis*. Em estudos de França et al. (2010), *C. parapsilosis* foi capaz de exibir atividade hemolítica que se mostrou maior em secreção de traquéia do que em amostras do sangue. Estudos posteriores são necessários para esclarecer a natureza dos fatores hemolíticos e os seus possíveis efeitos no hospedeiro humano.

6. CONCLUSÕES

- 1- O encontro de 7,63% de casos de candidemia verificado nos pacientes transplantados mostra a alta incidência de fungos entre estes indivíduos
- 2- Identificação de *C. parapsilosis* em 45,4% entre os isolados mostra que as espécies de *Candida* não *albicans* têm aumentado e merecem um estudo mais detalhado de fatores de virulência correlacionados a esta espécie.
- 3- O uso de cateter intra venoso, de corticoides e quimioterápicos em pacientes que se submetem aos transplantes de células alogênicas são os fatores mais importantes para que o indivíduo tenha candidíase invasiva
- 4- A profilaxia realizada com derivados azólicos como o fluconazol, provavelmente tenha sido a causa de candidemia por *C. parapsilosis*.
- 5- A resistência observada para os derivados azólicos de isolados de *Candida* em um percentual relativamente grande mostra a importância dos testes de suscetibilidade *in vitro* em casos de candidemia para se estabelecer uma terapia adequada
- 6- A realização de duas metodologias de suscetibilidade *in vitro* mostrando a concordância entre os resultados de concentração inibitória mínima evidencia a veracidade dos resultados obtidos com relação a resistência aos agentes antifúngicos exibida pelos isolados.
- 7- Há fortes indicações de que os fatores de virulência dos micro-organismos estão intrinsecamente ligados. Atividade hemolítica e de proteinase foram positivas ou negativas pelos mesmos isolados de *Candida*.
- 8- Os isolados de *Candida* não identificados, não são de *C. albicans* e parecem ser causa de infecção de difícil tratamento pois se apresentam muito resistentes aos vários antifúngicos estudados.

7. REFERÊNCIAS

- Abad-González J, Bonifaz A, Ponce RM 2007. Onicomycosis por *Candida* asociada con diabetes mellitus. *Rev Mex Dermatol* 51: 135-141.
- Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, Raad I, Pinzcowski H, Vartivarian S 1997. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clin Infect Dis* 24: 1122-1128.
- Alangaden G 2011. J Nosocomial Fungal Infections: epidemiology, infection control, and prevention. *Infect Dis Clin N Am* 25 201-225.
- Antunes AGV, Pasqualotto AC, Diaz MC, D'azevedo PA, Severo LC 2004. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. *Rev Inst Med trop S. Paulo* 46: 239-241.
- Barchiesi F, Maracci M, Radi B, Arzeni D, Baldassarri I, Giacometti A, Scalise G 2002. Point prevalence, microbiology and fluconazole susceptibility patterns of yeast isolates colonizing the oral cavities of HIV-infected patients in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Antimicrob Chemother* 50: 999-1002.
- Barnes PD, Marr KA 2007. Risks, diagnosis and outcomes of invasive fungal infections in haematopoietic stem cell transplant recipients. *Brit J Haematol* 139: 519-531.
- Bektic J, Lell CP, Fuchs A, Stoiber H, Speth C, Lass-Florl C, Borg-von Zepelin M, Dierich MP & Wurzner R 2001. HIV protease inhibitors attenuate adherence of *Candida albicans* to epithelial cells *in vitro*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 31: 65–71.
- Bhayat F, Das-Gupta E, Hubbard R 2010. Bone marrow transplantation in AML, and socioeconomic class: a UK population-based cohort study. *BMC Cancer* 10:514.

Birse CE, Irwin MY, Fonzi WA, Sypherd PS 1993. Cloning and characterization of ECE1, a gene expressed in association with cell elongation of the dimorphic pathogen *Candida albicans*. *Infect Immun* 61: 3648–3655.

Boff E, Lopes PGM, Spader T, Scheid LA, Loreto E, Dal Forno NF, Aquino V, Severo LC, Santurio JM, Alves SH 2008. Reavaliação da suscetibilidade de *Candida* à Anfotericina B: estudo comparativo com isolados de três hospitais do estado do Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 41:36-40.

Borg-von ZM, Kunz L, Rüchel R, Reichard U, Weig M 2007. Gross U. Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. to six antifungal agents: results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August 2005. *J. Antimicrob Chemother* 60: 424-8.

Brown AJ, Odds FC, Gow NA 2007. Infection-related gene expression in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 10:307-313.

Brown, JMY 2007. Fungal infections after hematopoietic cell transplantation. Thomas' Hematopoietic cell transplantation, Third Edition Ed. Blackwell Publishing Ltda, 683 pp

Bullen J 1981. The significance of iron in infection. *Rev Infect Dis* 13: 1127-1138.

Buggia I, Zecca M, Alessandrino EP, Locatelli F, Rosti G, Bosi A, Pession A, Rotoli B, Majolino I, Dallorso A, Regazzi MB 1996. Itraconazole can increase systemic exposure to busulfan in patients given bone marrow transplantation. GITMO (Grupo Italiano Trapianto Midollo Osseo). *Anticancer Res* 16:2083-8.

Burgess DS, Hastings RW, Summers KK, Hardin TC & Rinaldi MG 2000. Pharmacodynamics of fluconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Candida albicans*. *Diagnostic Microbiol and Infect Dis* 36: 13-18.

Calderone RA & Fonzi WA 2001. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiol* 9: 327-335.

Capoor MR, Nair D, Deb M, Verma PK, Srivastava L, Aggarwal P 2005. Emergence of non-albicans *Candida* species and antifungal resistance in a tertiary care hospital. *Jpn J Infect Dis* 58: 344-348.

Carrillo-Muñoz AJ, Brió S, Quindós G 2001. Una nueva generación de fármacos antifúngicos. *Rev Iberam Micol* 18: 2-5.

Celebi S, Hacimustafaoglu M, Ozdemir O, Ozkaya G 2007. Nosocomial candidemia in children: results of a 9-year study. *Mycoses* 51: 248-257.

Cendejas-Bueno E, Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M 2010. Identification of pathogenic rare yeast species in clinical samples: comparison between phenotypical and molecular methods. *J Clin Microbiol* 48: 1895-1899.

Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, Ghannoum MA 2001. Antifungal Resistance of Candidal Biofilms Formed on Denture Acrylic *in vitro*. *J Dent Res* 80: 903-908.

Chen PL, Lo HJ, Wu CJ, Lee HC, Chang CM, Lee NY, Wang AH, Lin WL, Ko NY, Lee CC, Ko WC 2009. Species distribution and antifungal susceptibility of blood *Candida* isolates at a tertiary hospital in southern Taiwan 1999-2006. *Mycoses* 54: 17-23.

Cheng MF, Yang YL, Yao TJ, Lin CY, Liu JS, Tang RB, Yu KW, Fan YH, Hsieh KS, Ho M, Lo HJ 2005. Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-albicans *Candida* species *BMC Infect Dis* 5:22.

Clinical and Laboratory Standard Institute (2008). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard- Third Edition M27-A3. National Committee for Clinical. Laboratory Standards, Wayne, Pennsylvania, USA.

Colombo AL, Guimarães T, Silva LR, de Almeida Monfardini LP, Cunha AK, Rady P, Alves T, Rosas RC. 2007. Prospective observational study of candidemia in Sao Paulo,

Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. *Infect Control Hosp Epidemiol* 28:570-576.

Colombo AL, Matta D, Almeida LP, Rosas R 2002. Fluconazole Susceptibility of Brazilian *Candida* Isolates Assessed by a Disk Diffusion Method. *J Infect Dis* 6: 118-123.

Colombo AL, Nakagawa Z, Valdetaro F, Branchini MLM, Kussano EJU, Nucci M 2003. Susceptibility profile of 200 bloodstream isolates of *Candida* spp. collected from Brazilian tertiary care hospitals. *Med Mycol* 41: 235-239.

Como JA, Dismukes WE 1994. Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. *N Engl J Med* 330: 262-72.

Cornely AO 2008. Aspergillus to Zygomycetes: causes, risk factors, prevention, and treatment of invasive of invasive fungal infections. *Infection* 36:296-313.

Costa M, Passos, XS, Miranda ATB, Araújo RSC, Paula CR, Silva MRR 2004. Correlation of in vitro itraconazole and fluconazole susceptibility with clinical outcome for patients with vulvovaginal candidiasis. *Mycopathologia* 157: 43-47.

Costa IC, Felipe I, Gaziri LCJ 2008. Resposta Imune a *Candida albicans*. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina 29: 27-40.

Cuenca-Estrela M, Mellado E, Guerra TMD, Monzón A, Tudela JLR 2000. Susceptibility of fluconazole- resistant clinical isolates of *Candida* spp. to echinocandin LY303366, itraconazole and amphotericin B. *J Antimicrob Chemother* 46: 475-477.

Dagdeviren M, Cerikcioglu N, Karavus M 2005. Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* strains isolated from clinical species of hospitalised patients. *Mycoses* 48: 321-326.

Denning D W 2003. Echinocandin antifungal drugs. *The Lancet* 362:1142-1151.

Des Champs-Bro B, Leroy-Cotteau A, Mazingue F, Pasquier F, François N, Corm S, Lemaitre L, Poulains D, Yakoub-Agha I, Alfandari S, Sendids B 2011. Invasive fungal infections: epidemiology and analysis of antifungal prescriptions in onco-hematology. *J of Clin Pharm and Therap* 36: 152-160.

Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Tendolkar S, Hollis R, Pfaller M 2005. Prospective global surveillance for *Candida* spp. infection: four year results from the ARTEMIS study. Abstract M-2238. 45th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, D.C, December.

Dostál J, Hamal P, Pavlíčková L, Souček M, Ruml T, Pichová I, Hrušková-Heidingsfeldová O 2003. Simple Method for Screening *Candida* Species Isolates for the Presence of Secreted Proteinases: a Tool for the Prediction of Successful Inhibitory Treatment *Journal Of Clinical Microbiology* 41: 712–716.

Douglas CM, D'Ippolito JA and Shei GJ, C M Douglas, J A D'Ippolito, G J Shei, M Mainz, J Onishi, J A Marrinan, W Li, G K Abruzzo, A Flattery, K Bartizal, A Mitchell M B Kurtz 1997. Identification of the FKS1 gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3-beta-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*, 41:2471–2479.

Eckert SE, Sheth CC, Mühlshlegel FA 2007. Regulation of morphogenesis in *Candida* species. In: *Candida: Comparative and Functional Genomics*, ed. C. d'Enfert and B. Hube, Wymondham, United Kingdom: Caister Academic Press, 263–291.

Falagas ME, Apostolou KE, Pappas VD 2006. Attributable mortality of candidemia: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 25: 419–425.

Fanello S, Boouchara JP, Jousset N, Delbos V, LeFlohic AM 2001. Nosocomial *Candida albicans* acquisition in a geriatric unit: epidemiology and evidence for person-to-person transmission. *J Hosp Infec* 47: 46-52.

Fidel JPL 2002. The protective immune response against vaginal candidiasis: lessons learned from clinical studies and animal model. *International Reviews of Immunology* Philadelphia 21: 515-548.

Fleck R, Hof H 2008. Breakpoints for posaconazole susceptibility testing: background and discussion about the need of establishing values. *Mycoses* 51: 1-4.

Fortún-Abete J 2009. La micafungina en el tratamiento de la candidiasis invasiva en pacientes sometidos a trasplante de órgano sólido. *Rev Iberoam Micol* 26: 65-68.

Fotedar R, Al-Hedaithy SSA 2003. Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Mycoses* 48: 62-67.

França EJG, Furlaneto-Maia L, Quesada RMB, Favero D, Oliveira MT, Furlaneto MC 2010. Haemolytic and proteinase activities in clinical isolates of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* with reference to the isolation anatomic site. *Mycoses* 54: 44-51.

Furlaneto-Maia L, Specian AF, Bizerra FC, Oliveira MT, Furlaneto MC 2008. *In vitro* evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida spp.* obtained from elderly healthy individuals *Mycopathologia* 166: 209-217.

Galván B, Mariscal F 2006. Epidemiología de la candidemia en UCI. *Rev Iberoam Micol* 23:12-15.

Gerzenshtein, L, Patel SM, Scarsi, KK, Postelnick MJ, Flaherty, JP 2005. Breakthrough *Candida* Infections in Patients Receiving Voriconazole *Ann Pharmacother* 39: 1342-1345.

Ghannoum MA, Hossain MA 2000. New investigational antifungal agents for treating invasive fungal infections. *Expert Opinion on Invest Drugs* 9:1797-1813

Goodman JL, Winston DJ, Greenfield RA et al 1992. A controlled trial of fluconazole to prevent fungal infections in patients undergoing bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 326:845-51.

Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Berg JV, Hu J, Messer S, Herwaldt L, Pfaller M, Diekema D 2003. Attributable Mortality of Nosocomial Candidemia, Revisited *Infect Dis Soc of Am* 37: 1172-7

Gupta N, Haque A, Lattif AA, Narayan RP, Mukhopadhyay G, Prasad R 2004. Epidemiology and molecular typing of *Candida* isolates from burn patients. *Mycopath* 158: 397-405.

Hachem R, Hanna H, Kontoyiannis D, Jiang Y, Raad I 2008. The changing epidemiology of invasive candidiasis: *Candida glabrata* and *Candida krusei* as the leading causes of candidemia in hematologic malignancy. *Cancer* 112: 2493-9.

Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, Marshall G, Beth A, Arthington-Skaggs L, Mirza SA, Phelan M, Morgan J, Lee-Yang W, Ciblak MA, Benjamin LE, Sanza LT, Huie S, Yeo SF, Brandt ME, Warnock DW 2004. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J Clin Microbiol* 42: 1519-1527.

Hegener P, Troke PF, Fatkenheuer G, Diehl V, Ruhnke M 1998. Treatment of fluconazole-resistant candidiasis with voriconazole in patients with AIDS (letter). *AIDS* 12:2227-8

Heilmann CJ, Schneider S, Barker KS, Rogers PD, Morschhauser J 2010. An A643T mutation in the transcription factor Upc2p causes constitutive ERG11 upregulation and increased fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:353–359.

Hollenbach E 2008. Invasive candidiasis in the ICU: evidence based and on the edge of evidence. *Mycoses* 51: 25-45.

Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, Marr KA, Pfaller MA, Chang CH, Webster KM. 2009. Epidemiology and outcomes of candidemia

in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis* 48: 1695-703.

Hossain H, Ansari F, Schulz-Weidner N, Wetzel WE, Chakraborty T, Doma E 2003. Clonal identity of *Candida albicans* in the oral cavity and the gastrointestinal tract of pre-school children. *Oral Microbiol and Immunol* 18: 302-308.

Hube B, Naglik JR 2002. Extracellular hydrolases. In: Calderone RA, editor. *Candida and candidiasis*. Washington: ASM Press; 107-22.

Ibrahim AS, Mirbord F, Filler SG, Banno Y, Cole GT, Kitajima Y, Edwards JE Jr, Nozawa Y, Ghannoum MA 1995. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun* 63: 1993-1998.

Ismail N, Olan JP, Feng H, Walker DH 2002. Current status of immune mechanisms of killing of intracellular microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam 207: 111-120.

Jayatilake JAMS, LP Samaranayake 2010. Experimental superficial candidiasis on tissue models. *Mycoses* 53: 285–295.

Jayatilake JAMS, Tilakaratne WM, Panagoda GJ 2009. Candidal onychomycosis: A Mini-Review. *Mycopathologia* 168:165–173.

Kadir T, Gumru B, Uygun-Can B 2007: Phospholipase activity of *Candida albicans* isolates from patients with denture stomatitis: the influence of chlorhexidine gluconate on phospholipase production. *Arch Oral Biol* 52:691-6.

Karkowska-Kuleta J, Rapala-kozik M & Kozik A 2009. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochimica Polonica*, 56: 211-224.

Kartsonis N, DiNubile MJ, Bartizal K, Hicks PS, Ryan D, Sable CA 2002. Efficacy of caspofungin in the treatment of esophageal candidiasis resistant to fluconazole. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 31:183–187.

Keating GM, Figgitt DP 2003. Caspofungin. A review of its use in oesophageal candidiasis, invasive candidiasis and invasive aspergillosis. *Drugs* 63: 2235–631.

Klepser ME, Hoffman HL, Evans EJ 2000. Novel triazole antiungal agents. *Expert Opin Investig Drugs* 9: 539-605.

Kontoyiannis DP, Lewis RE, Sagar N, May G, Prince, RA, Rolston KVI 2000. Itraconazole-amphotericin B antagonism in *Aspergillus fumigatus*: an E-test-based strategy. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 2915-8.

Krogh-Madsen M, Arendrup MC, Heslet L, Knudsen JD 2006. Amphotericin B and caspofungin resistance in *Candida glabrata* isolates recovered from a critically ill patient. *Clin Infect Dis*. 42: 938-944.

Kumar CPG, Menon T, Rajasekaran S, Sekar B, Prabu D 2008. Carriage of *Candida* species in oral cavities of HIV infected patients in South India. *Mycoses* 52: 44-4.

Kurtzman CP, Fell JW 1998. The Yeasts, A Taxonomic Study. Fourth edition, Elsevier.

Laffey SF & Butler G 2005. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology* 151:1073–1081.

Lee SJ, Zheng N, Clavijo M, Nussenzweig MC 2003. Normal host defense during systemic candidiasis in mannose receptor-deficient mice. *Infection and Immunity*, Washington 71: 437-445.

Leroy O, Gangneux JP, Montravers P, Mira JP, Gouin F, Sollet JP, Carlet J, Reynes J, Rosenheim M, Regnier B, Lortholary O 2009. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: A multicenter, prospective, observational study in France. *Crit Care Med* 37: 1612-1618.

Leroy O, Mira JP, Montravers P, Gangneux JP, Lortholary O 2010. Comparison of albicans vs. non-albicans candidemia in French intensive care units. *Critical Care* 14:R98.

Lian C, Zhao J, Zhang Z, Liu W 2003. Genotype of *Candida* species associated with different conditions of vulvovaginal candidosis. *Mycoses* 47: 495-502.

Lu JJ, Lee SY, Chiueh TS 2004. In vitro antifungal susceptibility testing of *Candida* blood isolates and avaluation of the E-test method. *J Microbiol Immunol Infect.* 37:335-42.

Luo G, Samaranayake LP, Yau JY 2001. *Candida species* exhibit differential in vitro hemolytic activities. *J Clin Microbiol* 39: 2971-4.

Lyman CA, Walsh TJ 1992. Systemically administered antifungal agents. A review of their clinical pharmacology and therapeutic applications. *Drugs* 44: 9-35.

Maertens JA 2004. History of development of azole derivaties. *Clin Microbiol Infect Dis* 10: 1-10.

Manfredi M, McCullough MJ, Polonelli L, Conti S, Al-Karaawi ZM, Vescovi P, Porter SR 2006. In vitro antifungal susceptibility to six antifungal agents of 229 *Candida* isolates from patients with diabetes mellitus. *Oral Microbiology Immunology* 21: 177-182.

Manns JM, Mosser DM, Buckley HR 1994. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. *Infect Immun* 62: 5154-6.

Marr KA, Carter R, Crippa F, Wald A, Corey L 2002. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 34: 909–917.

Marr KA, Seidel K, Slavin MA, Bowden RA, Schoch HG, Flowers ME, Corey L, Boeckh M 2000. Prolonged fluconazole prophylaxis in associated with persistent protection against candidiasis-related death in allogeneic marrow transplant recipients: long-term follow-up of a randomized, placebo-controlled trial. *Blood* 96: 2055- 2061.

Martin, MV 1999. The use of fluconazole and itraconazole in the treatment of *Candida albicans* infections : a review. *Jour of Antimic Chemoth* 44: 429-437.

Martinez R 2006. An update on the use of antifungal agents. *J Bras Pneumol* 32: 449-460.

Mateus C, Crow AS, Jr, Ahearn DG 2004. Adherence of *Candida albicans* to Silicone Induces Immediate Enhanced Tolerance to Fluconazole. *Antimicl Agentes Chemoth* 48: 3358–3366.

Mean M, Marchetti O, Calandra T 2008. Bench-to-beside review: *Candida* infections in the intensive care unit. *Crit Care*. 12:204-212.

Merz WG 1990. *Candida albicans* strain delineation. *Clin Microbiol* 3: 321-334.

Metin DY, Hilmioglu-Polat S, Samlioglu P, Doganay-Oflazoglu, B, Inci R, Tumbay E 2011. Evaluation of antifungal susceptibility testing with microdilution and Etest methods of *Candida* blood isolates. *Mycopathologia*. 172: 187-199

Minces LR, Ho KS, Veldkamp PJ, Clancy CJ. 2009. *Candida rugosa*: a distinctive emerging cause of candidemia. A case report and review of the literature. *Scand J Infect Dis* 41: 892-7.

Mora-Duarte J, Betts R, Rotstein C, Colombo AL, Thompson-Moya L, Smietana J, Lupinacci R, Sable C, Kartsonis N, Perfect J 2002. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *N Engl J Med* 347:2020–2029.

Moudgal V, Little T, Boikov D, Vasquez JA 2005. Multiechinocandin- and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis; *Antimicrob Agents Chemother* 49: 767-769

Naglik JR, Albrecht A, Bader O, Hube B 2004. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol* 6:915-926.

Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B 2003. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 400–428.

Negri M, Martins M, Henriques M, Svidzinsk TI, Azeredo J, Oliveira R 2010a. Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. *Mycopathologia* 169:175-82.

Negri MF, Faria MG, Guilhermett E, Alves AA, Paula CR, Svidzinski, TIE 2010b. Hemolytic activity and production of germ tubes related to pathogenic potential of clinical isolates of *Candida albicans*. *Rev. Ciênc Farm Básica Apt.* 31: 899-93.

Nenoff P, Oswald U, Hausteil UF 1999. *In vitro* susceptibility of yeasts for fluconazole and itraconazole. Evaluation of a microdilution test. *Mycoses* 42: 629-639.

Ng KP, Saw TL, Na SI Soo-Hoo 2000. Systemic *Candida* infection in University Hospital 1997-1999: the distribution of *Candida* biotypes and antifungal susceptibility patterns. *Mycopathologia* 149: 141-146.

Nguyen MH, Clancy CJ, Yu VL, Yu YC, Morris AJ, Snyderman R, Sutton DA, Rinaldi MG 1998. Do *in vitro* susceptibility data predict the microbiologic response to amphotericin B? Results of a prospective study of patients with *Candida* fungemia. *J Infect Dis* 177: 425-430.

Niewerth N & Korting C 2001. Phospholipase from *Candida albicans*. *Mycoses* 44: 361-367.

Nihtinen A, Anttila VJ, Richardson M, Ruutu T, Juvonen E, Meri T, Volin L 2010. Factors influencing the performance level of *Candida* mannan antigen testing in allogeneic stem cell transplant recipients not receiving fluconazole prophylaxis. *Transplant infectious Disease*. ISSN 1398-2273.

Nucci M, Silveira MI, Spector N, Silveira F, Velasco E, Akiti T, Barreiros G, Derossi A, Colombo AL, Pulcheri W 1998. Risk factors for death among cancer patients with fungemia. *Clin infec Dis* 27: 107-111.

Nucci M, Colombo AL 2002. Emergence of resistant *Candida* in neutropenic patients. *Brazil J Infect Dis* 6: 124-28.

Nucci M, Maiolino A 2000. Infecções em transplante de medula óssea. *Medicina, Ribeirão Preto*, 33: 278-293.

Odds FC 1988. *Candida* and candidosis 2^a Ed. London, Baillière Tindall, 468p.

Odds FC, Brown AJ, Gow NA 2003. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* 11:272–279

Odds FC, Gow NAR, Brown AJP 2006. Toward a molecular understanding of *andida albicans* virulence. In molecular principles of fungal pathogenesis. Heitman J, Filler G, Edwards JE Jr, Mitchell AP, Eds, PP 305-319. ASM Press, Washington DC.

Panizo MM, Revia´kina V, Dolande M, Selgrad S 2009. *Candida* spp. *in vitro* susceptibility profile to four antifungal agents. Resistance surveillance study in Venezuelan strains. *MedMycol* 47:137–43.

Park S, Nelly J, Nielsen Kahn J 2005. Specific substitutions in the echinocandins target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* spp. isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 3264-3273.

Paula CR, Marques SA, Matsumoto FE, Melo TA, Gambale W 1999. Nosocomial yeast infection in a public children's hospital of São Paulo, Brasil. *Trends in invasive Fungal infect*: 161 Abstract Book, 14-16 October, Malta.

Pfaller MA, Diekema DJ 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 20:133-163.

Pfaller MA, Diekema DJ 2004. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 42: 4419-4431.

Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Messer SA, Hollis RJ 2002. Trends in antifungal susceptibility of *Candida spp* isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY Antimicrobial Surveillance program, 1997 to 2000. *J Clin Microbiol* 40: 852-856.

Playford EG, Marriott D, Nguyen Q 2008. Candidemia in nonneutropenic critically ill patients: risk factors for non-albicans *Candida spp*. *Crit Care Med* 36: 2034-9.

Post MJ, Lass-Flör C, Gastl G, Nachbaur D 2007. *Transplant Infectious Disease*. ISSN 1398-2273. pp. 143–162.

Prentice HG, Kibbler CC, Prentice AG 2000. Towards a targeted, risk-based, antifungal strategy in neutropenic patients. *British Journal of Haematology* 110: 273-284

Pulcine C, Pradier C, Samat-Long C, Hyvernat H, Bernardin G, Ichai C, Dellamonica P, Roger PM 2006. Factors associated with adherence to infectious diseases advice in two intensive care units. *J Antimicrobiol Chemoth* 57: 546-550.

Richardson M, Lass-Flörl 2008. Changing epidemiology of systemic fungal infection. *Clin Microbiol Infect* 14: 5-24.

Richardson MD 2005. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *J Antimicrob Chemother* 56:5-11.

Rieger CT, Rieger H, Kolb HJ, Peterson S, Huppmann, Fiegl M, Ostermann H 2009. Infectious complications after allogenic stem cell transplantation: incidence in matched-related and matched-unrelated transplant settings. *Transpl Infect Dis* 11:220-226.

Romani 2004. Immunity to fungal infections. *Nature reviews: Immunology*, London, 4: 1-13.

Rosenhagen M, Feldhues R, Schmidt J, Hoppe-Tichy HK. Geis. A 2009. Risk profile for invasive aspergillosis in liver transplant recipients. *Infection* 37:313-9.

Rüchel R, Tegeler R, Trost M 1982. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia* 20:233-244.

Samaranayake LP 2006a. Differential phospholipase gene expression by *Candida albicans* in artificial media and cultured human oral epithelium. *APMIS*. 114: 857-66.

Samaranayake LP 2006b. *Essential microbiology for dentistry*. 3rd ed. London: Churchill Livingstone.

Sanglard D 2002. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Current Opinion in Microbiology* 5: 379–385.

Sendid B, Cotteau A, François N, D'Haveloose A, Camus D, Poulain D 2006. Candidaemia and antifungal therapy in a French University Hospital: rough trends over a decade and possible links. *BMC Infect Dis* 6: 80-89.

Schaffner A, Bohler A 1993. Amphotericin B refractory aspergilosis after itraconazole: evidence for significant antagonism. *Mycoses* 36: 421-4.

Shimizu MT, Almeida Q, Fantinato V, Unterkircher CS 1996. Studies on hyaluronidase, chondroitin sulfates, proteinase and phospholipase secreted by *Candida species*. *Mycoses* 39: 161-167

Silva MRR, de Paula CR, Silva SC, Costa TR, Costa MR 1998. Drug resistance of yeast isolated from oropharyngeal candidiasis in AIDS patients. *Rev Microbiol* 29: 272-275.

Silva P 2005. Drogas Antifúngicas. In: Farmacologia. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 5^a ed, p. 1081-1090.

Sipsas NV, Lewis RE, Tarrand J, Hachem R, Rolston KV, Raad II, Kontoyiannis DP 2009. Candidemia in patients with hematologic malignancies in the era of new antifungal agents (2001-2007): stable incidence but changing epidemiology of a still frequency lethal infection. *Cancer* 115: 4745-52.

St-Germain G, Laverdière M, Pelletier R, Bourgault AM, Libman M, Lemieux C, Noël G 2001. Prevalence and Antifungal Susceptibility of 442 *Candida* Isolates from Blood and Other Normally Sterile Sites: Results of a 2-Year (1996 to 1998) Multicenter Surveillance Study in Quebec, Canada. *Jour of Clin Microb* 39: 949-953.

Staber P, Langner S, Dornbush, HJ, Neumeister P 2007. Antifungal management in cancer patients. *Wien Med Wochenschr* 20: 503-510.

Sugar AM, Liu XP 1998. Interactions of itraconazole with amphotericin B in the treatment of murine invasive candidiasis. *J infect Dis* 177: 1660-3.

Taylor BN, Fichtenbaum C, Saavedra M, Slavinski J, Swoboda R, Wozniak K, Arribas A, Powderly W, Fidel PL Jr 2000. In vivo virulence of *Candida albicans* isolates causing mucosal infections in people infected with the human Immunodeficiency Virus. *J Infect Dis* 182: 955-959.

Teles Filho FQ, Severo LC 1997. Infecções causadas por fungos. In: Rodrigues AC (org.). *Infecções hospitalares: prevenção e controle*. São Paulo: Sarvier. p. 639-47

Theuretzbacher U 2004. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of echinocandins. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23: 805-812.

Van Burik JA & Magee PT 2001. Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Annu Rev Microbiol* 55: 743–772.

Vanden Bossche H 1997. Mechanisms of antifungal resistance. *Rev Iberoam Micol* 14: 44-49.

Vanden Bossche H, Marichal P, Odds FC 1994. Molecular mechanism of drugs resistance in fungi. *Trends Microbiol* 2: 393-400.

Vargas K, Messer SA, Pfaller M, Lockhart SR, Stapleton JT, Hellstein J, Soll DR 2000. Elevated phenotypic switching and drug resistance of *Candida albicans* from human immunodeficiency virus-positive individuals prior to first thrush episode. *J Clin Microbiol* 38: 3595–607.

Vinitha Mohandas, Mamatha Ballal 2011. Distribution of *Candida* Species in different clinical samples and their virulence: Biofilm formation, proteinase and phospholipase production: A study on hospitalized patients in Southern India .*J of Global Infect Dis*: 3: 4-8.

Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, Morrison VA, Segal BH, Steinbach WJ, Stevens DA, Burik JV, Wingard JR, Patterson TF 2008. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of Infections Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 46:327-360.

Walsh TJ, Pappas P, Winston DJ 2002. Voriconazole compared with liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with neutropenia and persistent fever. *N Eng J Med* 346: 225-34.

Watanabe T, Takano M, Murakami M, Tanaka H, Matsuhisa A, Nakao N, Mikami T, Suzuki M, Matsumoto T 1999. Characterization of haemolytic factor from *Candida albicans*. *Microbiology* 145: 689-94.

Watanabe T, Tanaka H, Nakao N, Mikami T, Matsumoto T. 1997. Hemoglobin is utilized by *Candida albicans* in hyphal form but not yeast form. *Biochem Biophys Res Commun* 232: 350-3.

White TC, Holleman S, Dy F, Mirels LF, Stevens DA 2002. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrobiol Agents and Chemotherapy* 46:1704-13.

Whiteway M, Bachewitch C 2006. Signal transduction in the interactions of fungal pathogens and mammalian hosts. In: Heitman J, Filler S, Edwards JE, Mitchell A. (Eds.), *Molecular Principles of Fungal Pathogenesis*. ASM Press, Washington, DC.

Wingard H, Leather 2004. A new era of antifungal therapy, *Biol. Blood Marrow Transplant* 10:73–90.

Wisplinghoff H, Bishoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond, MB 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospital analysis of 24179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 39: 309-317.

Yang YL, Cheng HH, HO YA, Hsiao CF, Lo HJ 2003. Fluconazole resistance rate of *Candida* species from different regions and hospital types in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 36:187-19.

Yang YL 2003. Virulence factors of *Candida* species. *J Microbiol Immunol Infect* 36: 223-228.

Yigit N, Aktas E 2009. Comparison of the efficacy of different blood médium in determining the hemolytic activity of *Candida* species. *J Mycol Med* 19:110-5.

8. Anexos

Anexo 1. Formulário dos pacientes

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia

Rua Delenda Rezende de Melo, S/N - Setor Universitário - Goiânia - GO

CEP 74605-050 - Fone (062) 3209 - 6127 - FAX (062)3209 - 6363

I. DADOS PESSOAIS

PACIENTE PRONTUÁRIO..... LEITO.....
DATA DE NASCIMENTO/...../..... ESTADO CIVIL SEXO
NATURALIDADE.....
ENDEREÇO.....
..... CIDADE..... ESTADO.....
TELEFONE
ANTECEDENTES PATOLÓGICOS.....
.....
DATA DA INTERNAÇÃO NO TMO:/...../.....
TIPO DE TRANSPLANTE
DATA DO TRANSPLANTE/...../.....
SAÍDA DO TMO/...../.....
OBS.:
MÉDICO RESPONSÁVEL PELO TMO:.....

II. EQUIPAMENTOS INVASIVOS UTILIZADOS

	Data da Introdução	Data da Retirada
() Respirador	/...../.....	/...../.....
() Sonda nasogástrica	/...../.....	/...../.....
() Sonda nasoentérica	/...../.....	/...../.....
() Sonda vesical de demora	/...../.....	/...../.....
() Sonda vesical de alívio	/...../.....	/...../.....
() Cateteres	/...../.....	/...../.....
() Outros	/...../.....	/...../.....

III. HEMOGRAMA

	1º Coleta	2º Coleta	3º Coleta	4º Coleta	5º Coleta
Leucócitos	/...../.....	/...../.....	/...../.....	/...../.....	/...../.....
1. Total					
2. Segmentados					
3. Bastonetes					
4. Eosinófilos					
5. Basófilos					
6. Linfócitos					
7. Monócitos					
8. LA					
PLAQUETAS					
HEMÁCIAS					

IV. QUADRO CLÍNICO

.....
.....
.....

VI. LABORATÓRIO

A. SANGUE PERIFÉRICO	Data	Resultado
1º Coleta	/...../.....	

B. SANGUE CATÉTER	Data	Resultado
1º Coleta	/...../.....	
2º Coleta	/...../.....	
3º Coleta	/...../.....	
4º Coleta	/...../.....	
5º Coleta	/...../.....	
6º Coleta	/...../.....	

Antibioticoterapia profilática	Profilaxia CMV	Antifúngico profilático
Ceftazidina	Acyclovir	Fluconazol
Amicacina	Gancyclovir	Itraconazol
Imipenem	Filtros	Cetoconazol
Vancomicina	Sangue se der CMV neg.	Anfotericina B

OBSERVAÇÕES DO PESQUISADOR

53

Anexo 2. Parecer do Comitê de Ética, TCLE

PROTOCOLO CEPACCG Nº 055/08

Goiânia, 03/11/2008

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES): Profª. Drª. Maria do Rosário Rodrigues Silva, Prof. Milton Camplesi Júnior e Bióloga Núbia Pontes Pereira.

TÍTULO: Caracterização e identificação de fungos causadores de infecções nosocomiais em pacientes transplantados de medula óssea.

Área Temática: Grupo III

Área de Conhecimento: Ciências Biológicas/Microbiologia

Local de Realização: Hospital Araújo Jorge/ACCG e Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da ACCG **analisou e aprovou** o projeto de Pesquisa acima referido, juntamente com os documentos apresentados e os mesmos foram considerados em acordo com os princípios éticos vigentes.

Todas as exigências deste CEP/ACCG foram atendidas pelos pesquisadores.

Não há necessidade de aguardar o parecer da CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

O Pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPACCG, relatórios trimestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão (ões) e publicação (ões).


DRA. JULIANA CASTRO DOURADO PINEZI
Coordenadora do CEP/ACCG



(62) 3878-7000 | 3243-7000
Rua 239, nº 206, St. Universitário
Goiânia - Goiás - Brasil - CEP 74.605-070
www.accg.org.br