



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ- REITORIA DE PESQUISA E PÓS- GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

**PERFIL DE SENSIBILIDADE E GENOTIPAGEM DE
LEVEDURAS ISOLADAS DE PACIENTES COM
CANDIDEMIA EM DOIS HOSPITAIS DE REFERÊNCIA
TERCIÁRIA DE FORTALEZA-CEARÁ**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre pela Universidade Federal do Ceará.

Orientadora: Prof^a. Silvia Helena Barem Rabenhorst.

Mestranda: Delia Jessica Astete Medrano

FORTALEZA-CEARÁ

2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ- REITORIA DE PESQUISA E PÓS- GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

**PERFIL DE SENSIBILIDADE E GENOTIPAGEM DE CEPAS DE LEVEDURAS
SOLADAS DE PACIENTES COM CANDIDEMIA EM DOIS HOSPITAIS DE
REFERÊNCIATERCIÁRIA DE FORTALEZA-CEARÁ**

DELIA JESSICA ASTETE MEDRANO

Dissertação apresentada á coordenação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre pela Universidade Federal do Ceará.

Defesa formal aprovada em 24/ 09 /2004 pela Banca Examinadora constituída por:

Prof^a. Silvia Helena Barem Rabenhorst

Professora do Departamento de Patologia e Medicina Legal
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Julio Costa Sidrim

Docente do Faculdade de Medicina do Departamento de Patologia e Medicina Legal da
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Aldo Ângelo Moreira Lima

Professor da Unidade de Pesquisas Clínicas da Faculdade de Medicina
Universidade Federal do Ceará –UFC

Prof. Zoilo Pires de Camargo

Professor do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP / SP

Agradecimentos

É com muita satisfação que expresso meus agradecimentos a inúmeras pessoas que contribuíram para a realização deste projeto.

À Prof^a Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst, pela sua grande paciência apoio e confiança.
Ao Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, pela sua grande paciência e oportunidade no meu desenvolvimento profissional.

Ao Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, exemplo de competência, disponibilidade e disciplina.

Às minhas queridas colegas, Raimunda Sâmia N. Brilhante e Rossana de Aguiar Cordeiro, que me mostraram grande ajuda, paciência e, sobretudo, amizade confiável e especial em todo momento.

A todos os professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, pela grande ajuda, esforço e desenvolvimento profissional para os alunos.

Aos técnicos do laboratório, Terezinha de Jesus Santos Rodriguez e Olavo Morais, minha gratidão pela ajuda incomparável.

Ao Hospital Infantil Albert Sabin, em especial à Dr^a. Vaulice Sales Café, por sua grande confiança e amizade.

Ao Hospital Dr. César Cals, bem como aos técnicos e funcionários.

À FUNCAP e à CAPES pelo apoio financeiro ao longo do trabalho

Aos professores da Banca Examinadora, Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa, Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo, Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima, que aceitaram este convite e muito me honram com suas presenças.

Resumo

As infecções fúngicas sistêmicas causadas por leveduras do gênero *Candida* são consideradas micoses oportunistas de alto risco em ambientes hospitalares. Essas infecções representam importante desafio terapêutico, em razão do surgimento de espécies resistentes a antifúngicos, associados a altos índices de mortalidade. Por esta razão, este trabalho objetivou: Verificar a frequência de fungemias no Hospital Geral Dr. César Cals (HGCC) e Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS); identificar os agentes etiológicos implicados; determinar o perfil de sensibilidade aos antifúngicos e avaliar o perfil genotípico das espécies isoladas de pacientes com quadros de recorrência. Para isso foram recuperadas, de 4 627 hemoculturas, 55 hemoculturas positivas para leveduras do HGCC, e, de 5 316 hemoculturas, 87 positivas para leveduras do HIAS. Destas, 23 do HGCC e 43 pacientes do HIAS que possuíam histórias clínicas com dados completos entraram neste estudo. O diagnóstico micológico foi realizado por meio das características bioquímicas e morfológicas dos agentes etiológicos isolados. O teste de sensibilidade aos antifúngicos - anfotericina B, fluconazol, itraconazol e cetoconazol - utilizou o método de microdiluição em caldo, descrito no documento M27-A2 do NCCLS. As técnicas de genotipagem foram realizadas por eletroforese em campo pulsátil (PFGE) e amplificação aleatória do DNA (RAPD). Entre o período do junho do 2000 a junho do 2002, no HGCC, foram analisadas 4 627 hemoculturas, sendo positivas 1051, das quais 55 (5,2%) foram positivas para leveduras do gênero *Candida*. Em contrapartida, no período de junho do 2001 a junho do 2002, no HIAS, foram analisadas 5316 hemoculturas, sendo positivas 1520 amostras, das quais 87 (5,72%) foram positivas para leveduras dos gêneros *Candida* e *Rhodotorula*. A principal espécie envolvida, dentro do gênero *Candida*, foi a *C. parapsilosis* com 36% e 42% no HGCC e HIAS, respectivamente. Os principais fatores de risco foram: a antibioticoterapia prévia (n=19; 90%), cateter venoso central, nutrição parenteral, sondagem gástrica, ventilação mecânica, cirurgia e prematuridade. Quanto à resistência a drogas antifúngicas, foi observado que anfotericina B apresentou um índice de resistência de 4%, fluconazol- 52%, itraconazol- 50% e cetoconazol- 86%. A técnica do PFGE caracterizou um perfil cromossômico de 6 bandas para *C. parapsilosis* e 4 para *C. tropicalis*. Esta técnica permitiu a diferenciação de uma cepa com padrão de bandas alterado para o último episódio do paciente 4. A técnica de RAPD caracterizou um padrão de distribuição de bandas predominante para *C. parapsilosis* e foi capaz de caracterizar 4 perfis

genômicos, indicando re-infecção em 3 pacientes e 2 perfis genômicos foram encontrados para *C. tropicalis*. Este ensaio demonstra a emergência das *Candida* não-*albicans*, especialmente a *C. parapsilosis*, como principal responsável pelos casos de candidemias em dois hospitais de indicação terciária de Fortaleza, associado a uma alta resistência *in vitro* aos antifúngicos. A variabilidade genética encontrada nas *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, mediante as técnicas do PFGE e RAPD, revelaram quadros de re-infecção, os quais erguem a possibilidade de que estas sejam decorrentes de uma contaminação entre pacientes ou indiretamente, por intermédio de trabalhadores da saúde.

Abstract

The systemic infections caused by yeasts of the genus *Candida* are considered opportunist mycoses of high risk in hospital environments. These infections represent important therapeutical challenge, by reason of arising of species resistant to some antifungals, associated with high rate of mortality. Therefore, this work sought: To verify the frequency of fungemias at Dr. César Cals Hospital and Albert Sabin Children Hospital; identify the etiological agents implicated; determine the sensitivity profile to antifungal and evaluate the genotypical profile of the species isolated from patients with recurrency. For this, were recuperated from 4627 hemocultures, 55 yeast-positive hemocultures at HGCC and from 5316 hemocultures 87 yeast-positive hemocultures at HIAS. From them, 23 patients at HGCC and from 43 at HIAS that had clinical histories with complet data entered this study. The mycological diagnosis was performed through biochemical and morphological characteristics of the etiological isolated. The test of sensitivity to antifungal- amphotericin B, fluconazole, itraconazole and cetoconazole- utilized the microdilution method in broth, reported in the document M27-A2 of the NCCLS. The genotyping techniques were performed through PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*), RAPD (*Randomly amplified polymorphic DNA analysis*). Within the period from june of 2000, to june of 2002 at HGCC, were analysed 4627 hemocultures, being positives 1051, of which 55 (5,2%) were positive for yeast of the genus *Candida*. On the other hand, in the period from june of 2001 to july of 2002 at HIAS, were analysed 5316 hemocultures, of which 87 (5,72%) were yeast-positive of the genus *Candida* and *Rhodotorula*. The main specie involved in the genus *Candida*, was *C. parapsilosis* with 36% and 42% of the cases at HGCC and HIAS respectively. The main risk factors associated with candidemia, were: the previous antibiotic therapy, central venous catheter, parenteral nutrition, gastric probe, mechanical ventilation, surgery and prematurity. About the resistance to antifungals drugs was observed that amphotericin B showed a resistance level of 4%, fluconazole-56%, itraconazole-52% and cetoconazole- 86%. The PFGE technique characterized a cromossomic profile of 6 bands for *C. parapsilosis* and 4 for *C. tropicalis*. This technique permitted the diferentiation of one cepa with changed pattern of bands for the last episode of the patient 4. The technique of RAPD chacacterized a distribution pattern of predominant bands for *C. parapsilosis* and was capable of characterize 4 genetical profiles, denoting reinfection in 3 patients and 2 genomic profiles were found for *C. tropicalis*. This assay

shows the emergency of the non- *albicans Candida*, specially the *C. parapsilosis*, as main responsible for the cases of candidemia in the two hospitals of tertiary indication of Fortaleza, associated with a high resistance in vitro to antifungals. The genetical variability found in *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* through the PFGE and RAPD techniques, revealed reinfection pictures, which rises the possibility that these be due to a contamination among patients or indirectly through the healthy workers.

INDICE

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Lista de Gráficos

Resumo

Abstrac

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	O gênero <i>Candida</i>	15
1.2	Candidíases sistêmica	20
1.2.1	Epidemiologia das candidemias.....	20
1.2.2	Fatores de risco para infecções causadas por <i>candida</i> spp.....	22
1.2.3	Diagnóstico.....	22
1.2.4	Conduta terapêutica.....	24
1.3	Resistência antifúngica	25
1.4	Teste de sensibilidade aos antifúngicos	27
1.5	Técnicas de Biologia Molecular aplicada ao estudo das leveduras do Gênero <i>Candida</i>	28
1.5.1	PFGE.....	29
1.5.2	RAPD.....	30
1.6	Objetivos	32
1.6.1	Objetivos gerais.....	32
1.6.2	Objetivos específicos.....	32
2	MATERIAL E MÉTODOS	33
2.1	Levantamento de dados clínico-epidemiológico dos pacientes	33
2.2	Identificação das leveduras	34
2.2.1	Características macromorfológicas.....	34
2.2.2	Características micromorfológicas.....	35
2.2.2.12	Prova do tubo germinativo.....	35
2.2.2	Microcultivo em Corn-Meal com Tween 80.....	35

2.2.3	Exigências nutricionais e fisiológicas.....	36
2.2.3.1	Assimilação de carboidratos (auxonograma).....	36
2.2.3.2	Assimilação de nitrogênio.....	37
2.2.3.3	Fermentação de carboidratos.....	38
2.2.4	Estoque das amostras.....	39
2.3.	Teste de sensibilidade aos antifúngicos	39
2.3.1	Metodologia.....	40
2.4	Análises da variabilidade genética	42
2.4.1	Extração do DNA cromossômico para leveduras.....	42
2.4.2	Condições eletroforéticas do PFGE.....	43
2.4.3	Análises de polimorfismo.....	44
2.4.4	Extração do DNA genômico para leveduras (RAPD).....	45
2.4.5	Reações de amplificação do DNAs utilizando seqüências iniciadoras aleatórias (RAPD).....	46
2.4.5.1	Seqüência iniciadora utilizada.....	46
2.4.5.2	Preparo das reações de amplificação (RAPD).....	46
2.4.5.3	Condições para a reação de RAPD.....	46
2.4.5.4	Eletroforese de DNA amplificado.....	46
2.4.5.5	Análises de polimorfismo.....	47
2.5	Análises estatística	47
2.6	Aspectos éticos-deontológicos da pesquisa.....	47
2.7	Fluxograma experimental	48
3	RESULTADOS	49
3.1	Identificação laboratorial.....	49
3.2	Pacientes envolvidos.....	51
3.3	Episódios de candidemia.....	52
3.4	Fatores de risco.....	53
3.5	Conduta terapêutica.....	56
3.6	Mortalidade.....	56
3.7	Teste de sensibilidade.....	59
3.7.1	CIMs das espécies de <i>Candida</i> frente aos antifúngicos testados.....	61

3.8	Tipificação genotípica	63
3.8.1	Cariotipagem eletroforética-PFGE.....	63
3.8.2	Amplificação do DNA ao acaso (RAPD).....	64
4	DISCUSSÃO	70
5	CONCLUSÕES	78
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
7	ANEXOS	99
7.1	Anexo I: Ficha clínico epidemiológica	100
7.2	Anexo II: Ficha de identificação das leveduras	102
7.3	Anexo III: Meios de cultura	105
7.4	Anexo IV: Quadro das provas bioquímicas	111
7.5	Anexo V: Banco de dados	113
8	PUBLICAÇÕES	117
	Artigo 1	118
	Artigo 2	131

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Principais leveduras patogênicas ao homem.....	18
2	Principais manifestações clínicas das candidíase A Candidíases mucosa; B Candidíases cutânea.....	19
3	Métodos utilizados para detecção de infecções fúngicas. A Métodos convencionais; B Métodos automatizados.....	23
4	Princípio da técnica do RAPD.....	31
5	A .Sistema de automação <i>Bactec System</i> . B. Isolamento das levedura em agar-batata.....	34
6	Distribuição dos blocos de agarose 1%.....	44
7	Aparelho <i>Gene Navigator</i>	44
8	Cariotipagem eletroforética através do PFGE, das <i>Candida</i> spp.....	65
9	Diagrama da cariotipagem eletroforética.....	66
10	RAPD representativo das amostras de <i>Candida</i> spp. com a seqüência iniciadora OPA-03 em gel de poliacrilamida 7%.....	67
11	Diagrama representativo dos diferentes perfis obtidos por RAPD das amostras de <i>Candida</i> spp com a seqüência iniciador OPA –03.....	68

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico	Título	Página
1	Principais microrganismos isolados das hemoculturas positivas do HGCC e do HIAS.....	49
2	Distribuição das espécies de leveduras isoladas no HGCC e no HIAS.....	50
3	Pacientes envolvidos no HGCC e HIAS.....	51
4	Distribuição dos principais Fatores de Risco envolvidos no HGCC e HIAS.	54
5	Distribuição dos CIMs das espécies de <i>Candida</i> frente aos antifúngicos testados.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela	Título	Página
1	Critérios de sensibilidade a fluconazol, itraconazol, cetoconazol e anfotericina B.....	42
2	Fatores clínicos, epidemiológicos e laboratoriais de 23 pacientes com candidemia internados no HGCC.....	114
3	Fatores clínicos, epidemiológicos e laboratoriais de 43 pacientes com candidemia internados no HIAS.....	115
4	Episódios de candidemia em 5 pacientes do HGCC e 1 paciente do HIAS.....	52
5	Principais fatores de risco, em relação às espécies envolvidas em quadros de candidemia em pacientes do HGCC e HIAS.....	55
6	Distribuição da mortalidade segunda a faixa etária do pacientes no HGCC e HIAS.....	57
7	Distribuição da mortalidade segunda a conduta terapêutica do pacientes no HGCC e HIAS.....	58
8	Distribuição dos CIMs das cepas de <i>Candida</i> spp, frente a anfotericina B.....	61
9	Distribuição dos CIMs das cepas de <i>Candida</i> spp, frente a fluconazol	61
10	Distribuição dos CIMs das cepas de <i>Candida</i> spp, frente a itraconazol.....	62
11	Distribuição dos CIMs das cepas de <i>Candida</i> spp, frente a cetoconazol.....	62
12	Distribuição dos CIMs das cepas de <i>Candida</i> spp, oriundas de pacientes que evoluíram a óbito e cura frente aos antifúngicos testados.....	116
13	Distribuição das espécies de <i>Candida</i> frente aos azólicos e a perfil genotípicos de cada um delas.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS / SIMBOLOS

Siglas	Significado
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CIM	Concentração Inibitória Mínima
HGCC	Hospital Geral Dr. César Cals
HIAS	Hospital Infantil Albert Sabin
NCCLS	National Committee Laboratory Standards
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis

1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas em ambientes hospitalares causadas por leveduras do gênero *Candida* são micoses oportunistas implicadas no aumento das taxas de fungemias em hospitais terciários de diferentes partes do mundo, respondendo por mais do 80% das infecções fúngicas documentadas, sobretudo no que diz respeito às da corrente sanguínea (SANDVEN *et al.*, 1998, 2000; FERNANDES *et al.*, 2000; COLOMBO *et al.*, 2003). Por esta razão estas infecções possuem grandes impactos na saúde pública, principalmente em ambientes hospitalares de alto risco como UTIs e berçários (COLOMBO *et al.*, 1999; SIDRIM & ROCHA, 2004). Além disso, devido o surgimento de espécies resistentes a antifúngicos associadas a altos índices (40 a 60%) de mortalidade no mundo todo, representam um importante desafio terapêutico (HUANG *et al.*, 1999).

O aumento da prevalência das infecções fúngicas é devido ao aumento do número de pacientes com imunossupressão adquirida ou induzida tais como: câncer, transplante de medula óssea ou de órgãos sólidos, infecção por HIV e administração prolongada de corticosteróide, os quais, tornam os pacientes vulneráveis para infecções fúngicas oportunistas (RODRIGUEZ & MOREIRA, 1999). Em adição, procedimentos cirúrgicos complexos, com uso de dispositivos implantáveis, tais como cateter venoso central sondagem gástrica e administração de antibióticos de amplo espectro, proporcionaram aumento dramático da incidência de infecções fúngicas hospitalares (SIDRIM & ROCHA, 2004).

1.1 O gênero *Candida*

O gênero *Candida* é constituído por leveduras anamórficas, representados por 163 espécies, cujos mecanismos de divisão celular envolvem o brotamento simples, brotamento fissão e divisão binária (GUARRO *et al.*, 1999; BRION *et al.*, 2001; HOOG *et al.*, 2001).

As leveduras do gênero *Candida* têm grande importância pela alta frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano. Possuem ampla distribuição, podendo ser encontradas no solo, alimentos, ambiente e fazendo parte da microbiota do homem e de outros animais (GUARRO *et al.*, 1999; SIDRIM & ROCHA, 2004).

Estes microrganismos comensais tornam-se patogênicos caso ocorra um desequilíbrio do binômio parasita-hospedeiro (BRION *et al.*, 2001; SIDRIM & ROCHA, 2004). A

colonização é o primeiro passo nesse sentido, pois populações numerosas de leveduras tentam vencer as defesas do indivíduo, sem causar-lhe danos (BRION *et al.*, 2001). Seguem-se, então, alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou comprometimento das barreiras anatômicas secundariamente (RODRIGUEZ & MOREIRA, 1999).

As alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro podem ser decorrentes de mudanças fisiológicas, característica da idade, ou, ainda, associadas a doenças degenerativas, neoplasias, a imunodeficiências congênitas ou adquiridas e imunossupressão induzida por atos médicos (COLOMBO *et al.*, 2003). Todas estas alterações no mecanismo de defesa do hospedeiro, quando associadas a fatores patogênicos do gênero *Candida*, ocasionam uma infecção do tecido sangüíneo, com potencial disseminação para outros sítios profundos (SIDRIM & ROCHA, 2004).

Entre os fatores relacionados à patogênese das espécies de *Candida*, podem ser citados: 1) capacidade de crescimento a 37°C; 2) pleomorfismo, cujo papel é importante nos processos iniciais de invasão tecidual; 3) produção de alguns metabólitos pelas espécies de *Candida*, que podem ser capazes de desencadear manifestações alérgicas do tipo imediato e tardio; 4) produção de enzimas como lipases e proteinases; e 5) variabilidade fenotípica e aderência mediadas por mananoproteínas (SIDRIM & ROCHA, 2004).

Entre as espécies de *Candida* conhecidas, 17 são implicadas em quadros de infecção humana.

A *Candida albicans* é a espécie mais freqüentemente isolada de infecções superficiais e invasivas em casuística de todas as partes do mundo mais relacionada a quadros de infecção humana, apresentando vários fatores de patogenia e virulência (RODRIGUEZ & MOREIRA, 1999; LOPEZ *et al.*, 2003; MARCHETTI *et al.*, 2004) (Figura 1).

Candida tropicalis é uma espécie isolada com freqüência nos pacientes com doenças hematológicas malignas. Esta espécie é relatada como o segundo ou terceiro agente etiológico mais comum de candidemia em pacientes com neoplasias, sendo sua freqüência maior em leucemias e menor em tumores sólidos (GUPTA *et al.*, 2001; FOONGLADDA *et al.*, 2004) (Figura 1).

Candida parapsilosis é um patógeno cuja ocorrência é freqüente em crianças e prematuros internados em unidades de cuidados intensivos, onde a prevalência desta espécie é de 17 a 50% dos casos. *C. parapsilosis* prolifera em soluções contendo glicose, tem grande

capacidade de produzir biofilmes e, freqüentemente, de colonizar a pele (LEVY *et al.*, 1998) (Figura 1).

Candida glabrata é a segunda ou terceira espécie mais comum nos quadros de candidemia isolada dos hospitais dos Estados Unidos da América e Europa, sendo sua maior ocorrência em pacientes idosos (RODRIGUEZ & MOREIRA, 1999) (Figura 1).

Candida guilliermondii, é reconhecida por diferentes autores como agente emergente das infecções invasivas, relacionadas freqüentemente a pacientes com câncer (COLOMBO *et al.* 2003) (figura 1).

Candida krusei mostra-se como patógeno hospitalar ocasional, particularmente em pacientes portadores de doenças hematológicas malignas e/ou submetidos a transplantes de medula óssea (BRION *et al.*, 2001) (Figura 1).

Em adição, outras espécies de *Candida* podem ser consideradas patogênicas para humanos, tais como: *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis* e *C. inconspícua* (GUARRO *et al.*, 1999; HOOG *et al.*, 2001).

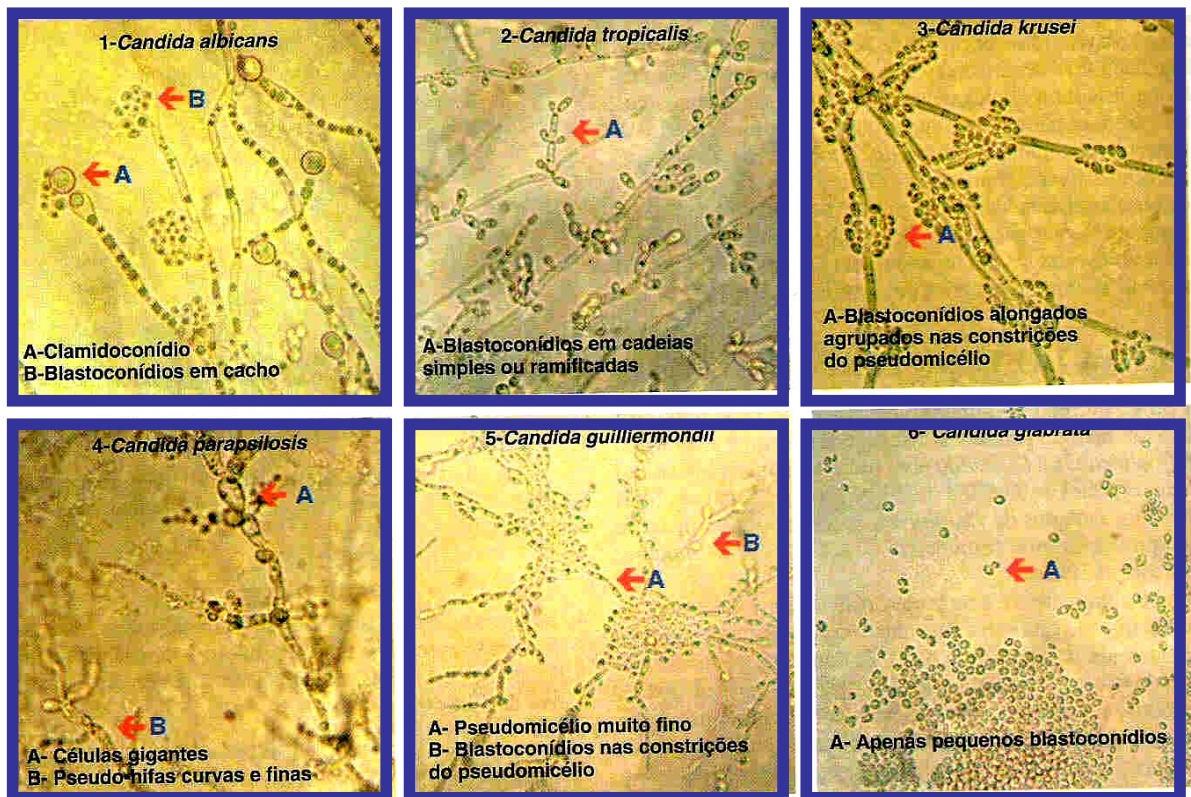


Figura 1. Principais leveduras do gênero *Candida* patogênicas ao homem (Fonte: MILAN & ZAROR., 2004, p.92)

As manifestações clínicas das candidíases apresentam considerável diversidade de quadros, podendo ser divididos em três grandes grupos: cutâneo-mucosa (Figura 2-A e 2-B), alérgica e sistêmica ou visceral. Assim, dependendo da localização e do estado imunológico do hospedeiro, tais espécies fúngicas podem invadir órgãos, disseminando-se por via sanguínea e linfática (SIDRIM & ROCHA, 2004).

A



Fonte: <http://bcornelius00.tripod.com/>

B



Fonte: www.siamhealth.net/Health/Photo_teaching/canda.htm

Figura 2. Principais manifestações clínicas das candidíases **A.** Candidíase mucosa. **B.** Candidíases cutânea

1.2 Candidíases Sistêmica

A candidíase sistêmica caracteriza-se por uma sintomatologia infecciosa localizada, e, em algum período de sua evolução, dissemina-se a outros órgãos por via sangüínea (SALDAR *et al.*, 2002; SIDRIM & ROCHA, 2004). Suas manifestações clínicas são bastante variáveis e em geral não específicas (ELLIS *et al.*, 2002), como, por exemplo: sintomatologia cardíaca, digestiva, respiratória, hepática, renal, ocular e do sistema nervoso central, podendo ser observada de forma isolada ou associada. Em todas estas situações, podem ser detectados episódios de fungemias com caráter transitório e autolimitado, particularmente em hospedeiros imunocompetentes (COLOMBO *et al.*, 2003; SIDRIM & ROCHA, 2004).

Não existem, até o momento, dados clínicos ou laboratoriais que permitam ao clínico diagnosticar o momento exato do aparecimento de um quadro de fungemia, ou, ainda, identificar se o episódio será transitório ou originará quadro de candidemia com invasão tecidual em outros órgãos (COLOMBO *et al.*, 2003).

Apesar do limitado número de casos da disseminação da infecção para múltiplos órgãos durante a ocorrência de candidemia, a morte pode ocorrer. Estas complicações infecciosas podem aparecer semanas ou meses após o episódio de candidemia, como acontece em alguns casos de retinite, meningite ou osteomielite por *Candida spp.* (COLOMBO *et al.*, 2003).

O aparecimento de lesões cutâneas pode ser a primeira manifestação de doença invasiva ou um marcador de disseminação da doença. Tais lesões podem acometer de 10 a 15% dos pacientes, apresentando-se caracteristicamente como formações maculo papulares ou pequenos nódulos com base eritematosa ou purpúrica, sendo ainda descritos outros aspectos morfológicos de lesões (FERNANDES *et al.*, 2000).

1.2.1 Epidemiologia das candidemias

As candidemias são a 4^a causa mais comum de infecções hospitalares sangüíneas (ABI-SAID *et al.*, 1997; SIDRIM & ROCHA, 2004), estando associadas ao aumento da permanência hospitalar e à elevada taxa de mortalidade (NUCCI *et al.*, 1998; PITTET *et al.*, 1997; MACDONALD *et al.*, 1998; RENTZ *et al.*, 1998).

Entre 1976 e 1980, estudos realizados no Canadá revelaram que as espécies de *Candida* representavam a 13^a causa de infecções fúngicas hospitalares (FERNANDES *et al.*, 2000) passando, no período entre 1991 e 1996, a ser 4^a causa destas infecções (ABI-SAID *et al.*,

1997). Consecutivamente, na Europa, VOSS *et al.* (1997) observaram um aumento alarmante de candidemia em diversos hospitais, passando de 53 a 95 episódios por ano.

No Brasil, COLOMBO *et al.* (2003) conduziram um estudo epidemiológico na cidade de São Paulo, no qual observaram que as espécies de *Candida* estavam envolvidas em 4,3% do total das infecções fúngicas representando o 4^a causa das infecções hospitalares.

Nas duas últimas décadas, foram observadas por diversos estudos mudanças significativas na epidemiologia da candidemia, em virtude, principalmente, da diversificação das espécies envolvidas (RENTZ *et al.*, 1998; MARCHETTI *et al.*, 2004). Assim, por exemplo, nos anos 60, a *Candida albicans* era responsável por 85 a 90% de todas as infecções fúngicas sangüíneas nos Estados Unidos da América, Canadá e Europa (RODRIGUEZ & MOREIRA, 1999). A partir do ano 1990, espécies de *Candida* não-*albicans* começaram a ser os principais agentes etiológicos envolvidos nos quadros de infecções fúngicas invasivas no mundo todo (TRUBENOVA *et al.*, 2001; CHARLES *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2003).

Existem variações geográficas no padrão etiológico das infecções invasivas causadas por espécies não-*albicans*. Na América do Norte nota-se o predomínio da *C. glabrata*, como causadora de infecções fúngicas sangüíneas (NGUYEN *et al.*, 1996; BODEY *et al.*, 2002). Dados oriundos da América do Sul, Japão, Taiwan e Índia demonstraram uma baixa prevalência de *C. albicans* e o predomínio de *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* (SANDVEN *et al.*, 2000; GUPTA *et al.*, 2001; FOONGLADDA *et al.*, 2004). Estudos realizados no Brasil revelaram que *C. albicans* é a principal espécie implicada em quadros de candidemia e, dentro das espécies não-*albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* são consideradas os patógenos mais importantes (NUCCI *et al.*, 1998; DA SILVA *et al.*, 2001; RESENDE *et al.*, 2002; GOLDANI *et al.*, 2003; MATSUMOTO *et al.*, 2002).

Na verdade, a emergência das *Candida* não-*albicans* como importantes patógenos responsáveis por fungemias é apontada em vários estudos, como consequência do uso profilático ou empírico de drogas antifúngicas (NGUYEN *et al.*, 1996; REES *et al.*, 1998; SIDRIM & ROCHA, 2004).

A associação de candidemias hospitalares com a mortalidade varia de 40 a 60% entre os pacientes que desenvolvem a infecção durante a internação, em virtude, principalmente, da falta de um diagnóstico clínico-laboratorial rápido e preciso (HUANG *et al.*, 1999; CHARLES *et al.*, 2003; AL-JASSER *et al.*, 2004).

1.2.2 Fatores de risco para infecções causadas por *Candida* spp

De maneira geral, o número expressivo de episódios de candidemia ocorre em pacientes imunocomprometidos, seja em decorrência de uma doença de base ou uso de tratamento com drogas imunossupressoras ou, ainda, em pacientes que estão em uso de múltiplos acessos intravasculares (FRIDKIN *et al.*, 1996, REES *et al.*, 1998; SANDVEN, 2000).

Outros importantes fatores de risco incluem: internação prolongada em uma unidade de cuidados intensivos, cirurgias abdominais, perfuração digestiva, antibioticoterapia prévia e/ou prolongada, nutrição parenteral, hemodiálise, sonda vesical e candidúria (BLUMBERG *et al.*, 2001; NUCCI *et al.*, 2002; BORDERON *et al.*, 2003).

1.2.3 Diagnóstico

O diagnóstico das candidemias apresenta ainda dificuldades requerendo técnicas e meios de cultura adequados. Existem 2 tipos de sistemas de cultura de sangue utilizados: sistemas de detecção manual (Figura 3-A) e técnicas alternativas automatizadas (Figura 2-B). Dentre as técnicas alternativas automatizadas, encontram-se a lise centrifugação e os sistemas de culturas de sangue com monitoramento contínuo (Figura 3-B), que são indubitavelmente superiores aos sistemas de detecção manual em termos de sensibilidade de detecção (MAGANDIA *et al.*, 2001; SIDRIM & ROCHA, 2004).

Um dos princípios da tecnologia de automação está baseado na detecção da produção de CO₂ ou consumo de O₂ por frasco de cultura produzido pelo metabolismo microbiano. Os equipamentos automatizados utilizam um sistema de detecção fluorescente e não invasivo para a realização das leituras a cada 10 minutos, determinando, assim, indiretamente a presença de microrganismos (MAGANDIA *et al.*, 2001).

Apesar de todos esses avanços, o sistema automatizado de hemocultura ainda possui baixa positividade. Até mesmo em pacientes com suspeita forte de candidemia, as hemoculturas são positivas somente em cerca de 50% dos episódios (MAGANDIA *et al.*, 2001). Com a finalidade de obter maior sensibilidade no diagnóstico, estão sendo estudadas várias estratégias, tais como, testes sorológicos, técnicas de Biologia Molecular, já utilizadas para identificar as fontes endógenas ou exógenas de infecções por *Candida* (FERNANDES *et al.*, 2000; SIDRIM & ROCHA, 2004).

A



B



Figura 3 Métodos utilizados para detecção de infecções fúngicas. **A** Métodos convencionais. **B** Métodos automatizados.

1.2.4 Conduta terapêutica

Segundo a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA), refere que a escolha da droga a ser usada em casos de candidemias depende das manifestações clínicas do paciente, da espécie de *Candida* isolada e do resultado dos testes de sensibilidade a antifúngicos (REX *et al.*, 2000).

Todos os pacientes hemodinamicamente instáveis com suspeita de candidemia devem ser tratados com anfotericina B (REX *et al.*, 2000). Esta droga é um agente antifúngico macrolídeo poliênico descoberta por GOLD *et al.* (1956), a partir da fermentação do actinomiceto *Streptomyces nodosus*. Posteriormente, em 1960, a anfotericina B foi descrita como o padrão-ouro para a terapêutica das micoses profundas (LEONARD *et al.*, 1999). O mecanismo de ação baseia-se na ligação dos sítios hidrofóbicos aos esteróis, sobretudo no ergosterol, que é abundante na membrana celular dos fungos. Em consequência desta ligação, formam-se poros e canais na membrana, permitindo o extravasamento de eletrólitos do meio intracelular, particularmente o potássio (LEONARD *et al.*, 1999). A capacidade de formar poros através das membranas plasmáticas inibe a ação de enzimas de membrana tais como: ATPase para prótons de *C. albicans* ou a ATPase Na /K dos eritrócitos e peróxidos dos lipídios insaturados (LEBEAU & GRILLOT *et al.*, 1999).

A anfotericina B pode ser administrada de forma parenteral (FERNANDES *et al.*, 2000). Geralmente na terapia das infecções fúngicas sistêmicas, é administrada por via intravenosa, sendo o fármaco mais eficaz disponível para tratamento das infecções fúngicas sistêmicas. É quase sempre utilizada no tratamento das infecções fúngicas potencialmente fatais em pacientes com comprometimento dos mecanismos de defesa comprometidos. Algumas vezes é administrado junto com a fluocitosina para o tratamento inicial das infecções fúngicas agudas, rapidamente progressivas e potencialmente fatais (LEONARD *et al.*, 1999).

A dosagem deste antifúngico não é padronizada, sendo recomendadas dosagens que podem variar entre 0,3 a 1,0mg/kg/dia. A variação está na dependência dos efeitos colaterais observados nos pacientes, bem como da gravidade de infecção (ROCHA & SIDRIM, 2004).

Para pacientes clinicamente estáveis, devem ser tratados com fluconazol (DE BAULE *et al.*, 1996; MARTIN *et al.*, 1999; ROCHA & SIDRIM, 2004). Os derivados azólicos, como cetoconazol, itraconazol e os mais recentes, voriconazol e caspofunginas, são opções viáveis, mas o fluconazol é o principal fármaco antifúngico utilizado nas infecções invasivas (DE PAW *et al.*, 2000; ROCHA & SIDRIM, 2004)

Em geral, os derivados azólicos são drogas fungistáticas que podem possuir dois núcleos triazólicos na molécula (LEONARD *et al.*, 1999). Estas drogas fazem parte de um grupo de agentes sintéticos, com estrutura química semelhante, possuem amplo espectro de atividade antifúngica. Os antifúngicos imidazólicos caracterizam-se por suas estruturas pentacíclicas com dois átomos de nitrogênio, providas de uma cadeia complexa. Os triazólicos são caracterizados por possuírem um pentacíclico composto por 3 átomos de nitrogênio (LEBEAU & GRILLOT *et al.*, 1999).

O mecanismo de ação dos compostos azólicos reside na inibição preferencialmente das enzimas do citocromo P-450 nas células fúngicas. Nessas células, os azólicos interferem com a biossíntese do ergosterol, inibindo a enzima responsável pela demetilação do lanosterol em ergosterol, a 14- alfademetilase. Este fenômeno origina um acúmulo de precursores, ocorrendo também uma depleção do ergosterol. Esta interferência origina anomalias na permeabilidade da membrana (MARTIN *et al.*, 1999; REX *et al.*, 2000; RANG *et al.*, 2001).

O fluconazol não apresenta nenhuma atividade sobre o sistema endócrino e possuem excelente penetrabilidade no líquido. Este fármaco mostra-se ativo contra vários patógenos fúngicos sistêmicos, incluindo *Aspergillus* sp, *B. dermatitidis*, *C. albicans*, *C. neoformans*, *C. immitis* e *Histoplasma capsulatum*. As dosagens recomendadas estão entre 100 a 400mg/dia por via oral ou endovenosa. A duração do tratamento para candidemia deve ser de quatorze dias após a última hemocultura positiva ou quando os sinais e sintomas da infecção tenham desaparecido (REX *et al.*, 2001).

1.3 Resistência Antifúngica

A resistência aos antifúngicos pode ser classificada em:

A resistência *in vitro*- este tipo de resistência pode ser separado em duas categorias- 1) resistência *in vitro* primária, chamada também de intrínseca ou inata (SANGLARD *et al.*, 2002; VIUDES *et al.*, 2002). Apresenta-se naturalmente no microrganismo, como, por exemplo, a *Candida krusei* frente ao fluconazol; 2) resistência *in vitro* secundária, que aparece quando o microrganismo inicialmente sensível se faz resistente, como por exemplo, cepas de *Candida* isoladas de pacientes com candidíases oral e com tratamento prolongado com fluconazol (BALKIS *et al.*, 2002; KREMERY *et al.*, 2002).

B resistência *in vivo*- chamada também de resistência clínica. Aparece como resultado de falha do tratamento antifúngico e não se associa com a diminuição da sensibilidade *in vitro* (VIUDES *et al.*, 2002). Este tipo de resistência decorre de vários fatores, tais como: farmacocinética da droga antifúngica, fatores dependentes do hospedeiro (estado imunitário, doenças de base e inclusive a troca dos cateteres intravenosos) e fatores relacionados ao microrganismo (virulência e resistência) (VIUDES *et al.*, 2002).

A resistência primária para anfotericina B *in vitro* é descrita em torno de 2 a 5% nas cepas de *Candida* spp., tendo sido descritas para espécies de *C. lusitinae*, *C. guillermondii*, *Fusarium* spp, *Pseudoallescheria boydii*, *Cladosporium carrionii* e *Fonsecaea pedrosoi* (BILLE, 2000, SIDRIM & ROCHA, 2004).

Casos documentados de resistência adquirida a anfotericina B não se apresentam numerosos, provavelmente pelas dificuldades técnicas na realização dos testes de sensibilidade (ELLIS *et al.*, 2002). O número maior de publicações evidenciando o fenômeno da resistência de fungos aos poliênicos refere-se ao gênero *Candida*, sendo frequentemente as espécies envolvidas *C. lusitinae*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. albicans* (ALVES *et al.*, 1997; LEBEAU & GRILLOT *et al.*, 1999).

A resistência inata é uma das principais falhas no tratamento com 5-fluocitosina sendo bastante comum em *C. albicans* e também em *Aspergillus* spp, *C. neoformans* e espécies de *Candida* não-*albicans* (ALVES *et al.*, 1997). A resistência adquirida a 5-fluocitosina durante o tratamento também é encontrada em 30% das cepas de *C. albicans*, de tal maneira que a monoterapia com este antifúngico não é recomendada na prática da clínica, justificando, assim, a terapia combinada de fluocitosina com anfotericina B (ODDS *et al.*, 1996; BILLE, 2000).

A resistência inata é uma das principais falhas no tratamento com o fluconazol, especialmente contra *C. krusei* e *C. glabrata* (GHANNOUM *et al.*, 1999). A resistência adquirida a este antifúngico também é comum, em pacientes imunocomprometidos, submetidos a longos tratamentos, sendo as espécies envolvidas neste tipo de resistência *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (CANUTO *et al.*, 2002).

O desenvolvimento da resistência das espécies de *Candida* ao itraconazol parece ser menos intensa, possivelmente em razão dos poucos trabalhos que estudam a relação da sensibilidade *in vitro* e a evolução clínica do paciente com infecções produzidas por estas espécies, embora relatos desta resistência já tenham sido publicados (REX *et al.*, 1997; CHEN

et al., 1996, 2003; GHANNOUN *et al.*, 1999; VIUDES *et al.*, 2002). Contrariamente, resistência ao cetoconazol é a que mais reporta a literatura, possivelmente por ter sido uma das primeiras drogas deste grupo de azólicos disponíveis no mercado, apontando, assim, a redução da sensibilidade após a entrada dos triazólicos (ALVES *et al.*, 1997; SIDRIM & ROCHA, 2004).

1.4 Testes de sensibilidade aos antifúngicos

Os testes de sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos são realizadas para avaliar o seu potencial terapêutico, comprovar a sensibilidade do fungo isolado frente aos antifúngicos e ter controle da terapia antifúngica (ESPINEL-INGROFF *et al.*, 2000).

O princípio destes testes é expor um inóculo definido de microrganismo em estudo a conhecidas concentrações da droga a serem testadas em condições que suportem o crescimento do microrganismo e pouco ou nada interfiram com a atuação da droga e observar se o crescimento fúngico é minimizado ou não. A leitura final dos testes da diluição permite identificar a concentração inibitória mínima (CIM) da droga que inibe o crescimento do microrganismo em estudo (ALVES *et al.*, 1997).

A padronização das condições dos testes de sensibilidade para leveduras foi definida em 1992 pelo Comitê Nacional de Estandarização do Laboratório Clínico (NCCLS) com a publicação do documento M27-A2 (REX *et al.*, 1997), a fim de padronizar testes de sensibilidade a drogas antifúngicas, com base no método da macrodiluição em caldo (REYES & GHANNOUM, 2000).

Por ser o teste de macrodiluição mais laborioso e dispendioso, foi proposta, em 1997, a técnica de microdiluição em caldo, por ser mais prático e economizar reagentes. Além da maior facilidade na sua execução, a microdiluição permite a análise de grande número de amostras, com economia de reagentes (BARRY *et al.*, 2000, 2002; POSTERANO *et al.*, 2000; COLOMBO & ALVES, 2004).

O principal método comercial para os testes de sensibilidade é o Etest[®], que consiste em uma fita plástica contendo droga em diferentes concentrações expressas no reverso da tira. Uma vez colocada na superfície do meio solidificado, a droga difunde-se rapidamente para o meio, mantendo um gradiente fixo de concentração em torno dela. A difusão da droga a partir da fita para o agar causa inibição do microrganismo e em caso de sensibilidade à droga, forma uma

área de inibição do crescimento em formato de elipse. A concentração inibitória mínima é lida como a concentração da droga expressa na fita exatamente no ponto onde a tira intercepta a elipse de inibição de crescimento (COLOMBO & ALVES, 2004). O Etest[®] reúne a vantagem da simplicidade de métodos baseados na difusão em ágar com as informações quantitativas fornecidas pelos métodos da diluição. A utilização do Etest[®] com drogas antifúngicas é analisada em estudos mais recentes e alguns autores ressaltam a grande variação dos índices de concordância na dependência da combinação organismo-droga estudada (COLOMBO & ALVES, 2004).

A realização dos testes de sensibilidade aos antifúngicos não é justificável para alguns autores pelo fato de que a CIM de antifúngicos não define necessariamente a eficácia no tratamento de pacientes portadores de infecções fúngicas (SANGLARD *et al.*, 2002). Vários fatores podem causar falha do tratamento, independentemente da eficácia microbiológica da droga utilizada como: 1) resposta imunológica do hospedeiro; 2) presença do foco infeccioso (presença de próteses ou cateteres); 3) farmacocinética do antifúngico (níveis séricos do antifúngico, interações medicamentosas antagônicas); e 4) espécie de fungo envolvido (DATRY *et al.*, 2001). Nos pacientes aidéticos e com candidíase oral, no entanto, apresentam uma boa correlação clínico-laboratorial (GHANNOUM *et al.*, 1999; KREMERY *et al.*, 2000). Contrariamente, os testes de sensibilidade realizados em pacientes candidêmicos não aidéticos não proporcionam uma prova sólida de resistência (GHANNOUM *et al.*, 1999; VIUDES *et al.*, 2002).

1.5 Técnicas de Biologia Molecular aplicadas ao estudo das leveduras do gênero *Candida*

Recentes avanços em Biologia Molecular de fungos permitem o entendimento da dinâmica do processo infeccioso e monitoramento da emergência de espécies resistentes a drogas e identificação de espécies e subespécies do gênero *Candida* spp. Desta forma, os métodos moleculares estão sendo, agora, muito utilizados em investigações epidemiológicas de infecções fúngicas (MATSUKO *et al.*, 1994; MCEWEN *et al.*, 2000; ODSS *et al.*, 2003).

Os fungos são organismos eucariontes, com a capacidade de acomodar seqüências adicionais no seu genoma, o que traz, por consequência, a existência de vários fenômenos

(mutação, recombinação sexual, parassexualidade- isto é recombinação sem cariogamia nem meiose) que são responsáveis pela variabilidade destas espécies. Assim pela detecção do polimorfismo cromossômico, pode-se detectar o aumento da variabilidade destas espécies (ZOLAN, 1995; FIERRO *et al.*, 1999).

Polimorfismo genômico refere-se à ocorrência de dois ou mais genótipos alternativos que representam variações alélicas, passíveis de produzir diferentes fenótipos ou mudanças no DNA que afetam o padrão de restritivo (FARAH, 1999).

Dentre as diversas técnicas de Biologia Molecular empregadas na obtenção de “Impressões digitais do DNA” das espécies de *Candida* podem ser citadas: eletroforeses em campo pulsátil (do inglês, *Pulsed-Field Gel Electrophoresis-PFGE*), polimorfismo de comprimento nos fragmentos de restrição do rDNA/rRNA (do inglês, *Restriction Fragment Length Polymorphism RFLP*) e polimorfismo do DNA aleatoriamente amplificado (do inglês, *Random Amplified Polymorphic DNA- RAPD*) (DIB *et al.*, 1996; ZANCOPÉ-OLIVEIRA *et al.*, 2000).

1.5.1 PFGE

Cariotipagem eletroforética é a expressão usada para designar a análise de cromossomos mediante a determinação do tamanho e números diante da separação destes em gel de agarose quando submetidos a um ou mais campos elétricos (SCHWARTZ & CANTOR, 1984; DOI *et al.*, 1992).

A separação nítida de moléculas de DNA de até 10 000 kilobases não é possível por eletroforese convencional. Desta forma, a análises de fragmentos de DNA cromossômico de leveduras, digeridas ou não com enzimas de restrição para detecção de sítios raros, é realizada em um sistema de eletroforese multidirecional, conhecida como eletroforese em campos alternados (PFGE). O princípio desta técnica baseia-se na separação de fragmentos de grande magnitude, aplicados em gel de agarose, pela alternância de 2 campos elétricos pulsados em diferentes direções (FARAH, 1999). O polimorfismo cromossômico de *Candida* spp. foi demonstrado por vários autores por intermédio da técnica de PFGE (ZOLAN, 1995).

Assim, com o emprego desta técnica do PFGE, parece ser possível, de forma mais rápida, analisar amostras de vários isolados dentro de espécie, ao mesmo tempo, e evidenciar

rapidamente o polimorfismo que elas apresentam (ZOLAN, 1995; DASSANAYAKE *et al.*, 2000).

1.5.2 RAPD

A técnica do RAPD envolve a amplificação simultânea de vários locos anônimos no genoma utilizando iniciadores de seqüência arbitrária (TAYLOR *et al.*, 1999). O polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) surgiu com a idéia de se utilizarem iniciadores mais curtos e de seqüência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando assim a necessidade de conhecimento prévio de seqüência, como no caso do PCR (HANNULA *et al.*, 1999). O RAPD é realizado com o uso de única seqüência iniciadora de seqüência arbitrária (geralmente 9-10 bases), a qual se hibridiza com afinidade suficiente em seqüências do DNA genômico em baixas temperaturas (<40° C), permitindo que este iniciador aleatório, que não mostra homologia completa em relação ao DNA-molde, possa ter pareamento com 2 a 3 nucleotídeos e a partir do terminal 3' do iniciador na fita-molde (FERREIRA *et al.*, 1998; FARAH, 1999; BARDAKCI *et al.*, 2001). Um número definido de produtos de amplificação é gerado, pelo fato de as seqüências parcialmente complementares à do iniciador estarem em fitas opostas no DNA. Pela diferenciação no padrão de bandas detectadas por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida, é possível a diferenciação de vários microrganismos (MUNÓZ *et al.*, 2003) (Figura 4).

O resultado dessa amplificação é essencialmente a geração de impressões digitais do DNA simples e reprodutíveis para a identificação de linhagens em gel de eletroforese. O RAPD é utilizado amplamente com diferentes níveis de sucesso (LUPETTI *et al.*, 2002).

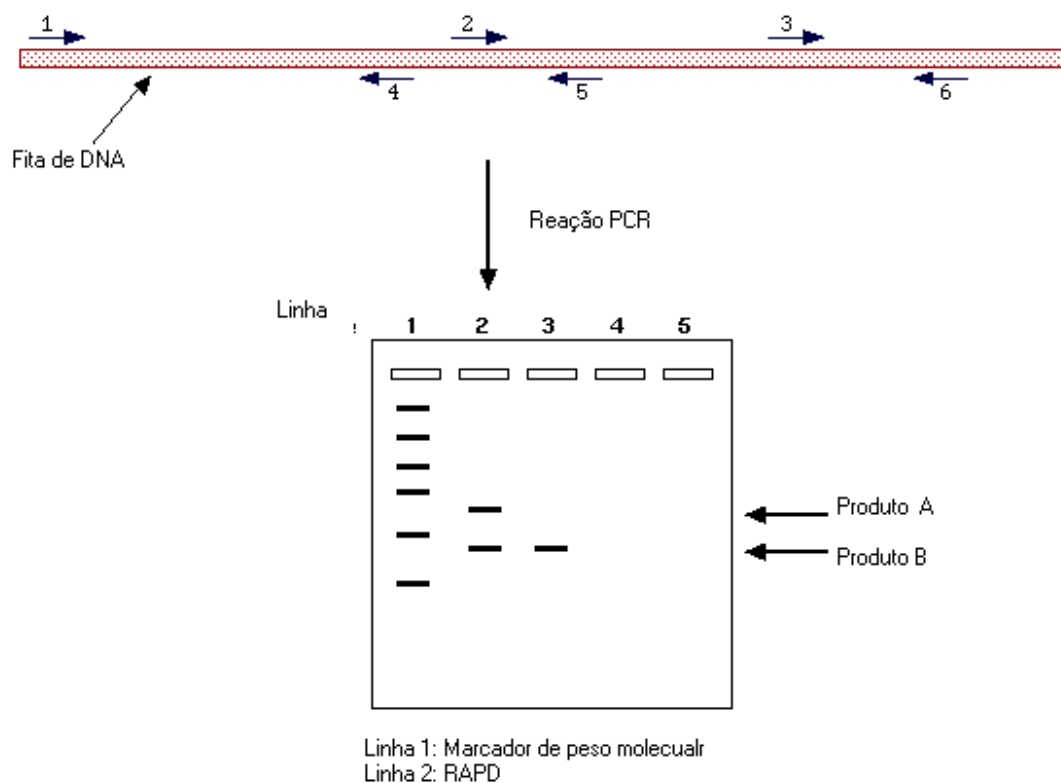


Figura 4. Princípio da técnica do RAPD

(Fonte: <http://avery.rutgers.edu/WSSP/StudentScholars/project/archives/onions/rapd.html>)

Assim, diante do aumento de incidência das infecções fúngicas nos hospitais e da variabilidade de frequências das espécies de *Candida* como agentes etiológicos envolvidos em tais infecções, torna-se necessária a realização de estudos com levantamentos epidemiológicos em hospitais de referência terciária que proporcionem uma real situação das infecções nos hospitais deste nível em cada região. Adicionando a esse levantamento, torna-se necessária a avaliação do padrão de resistência desses isolados, por meio dos testes de sensibilidade, *in vitro*, dos antifúngicos, os quais deverão ser realizados para uma avaliação melhor do padrão de resistência desses isolados.

Soma-se ainda a necessidade de uma discriminação detalhada, utilizando técnicas moleculares, dos diferentes isolados, principalmente em pacientes com dois ou mais episódios de

candidemia, visando a estabelecer refratariedade terapêutica, recorrência, reinfecção ou suprainfecção.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo Geral

- ✓ Verificar a frequência de fungemias e do agente etiológico implicado em pacientes que apresentam quadros clínicos suspeitos de sepses em hospitais de referência terciária de Fortaleza (Hospital Geral Dr. César Cals e Hospital Infantil Albert Sabin); determinar o perfil de sensibilidade aos antifúngicos e avaliar o perfil genotípico das espécies isoladas em pacientes portadores de mais de um episódio de candidemia.

1.6.2 Objetivos Específicos:

- ✓ Realizar um estudo epidemiológico retrospectivo dos quadros de fungemia no HGCC e no HIAS;
- ✓ determinar o perfil de sensibilidade das espécies de leveduras isoladas de quadros de fungemia e a correlação clínica com aos antifúngicos fluconazol, itraconazol, cetoconazol e anfotericina B, usando técnica de microdiluição em placa, padronizada pelo NCCLS (2002); e
- ✓ analisar o cariótipo eletroforético e o perfil genético das espécies de *Candida* isoladas nos pacientes com quadros de fungemia recorrentes por intermédio do PFGE e do RAPD.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado em duas fases, a primeira das quais se fundamentou na identificação dos agentes fúngicos isolados das hemoculturas processadas pelo *Bactec System* (*Becton Dickinson, Diagnostic Instrument Systems, Sparks, MD, USA*) no laboratório de Microbiologia de ambos os hospitais: Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS) e Hospital Geral Dr. César Cals (HGCC) em Fortaleza- Ceará. Segue-se um levantamento retrospectivo dos dados clínico-epidemiológicos dos pacientes com fungemia internados nos respectivos hospitais.

Todas as hemoculturas positivas para leveduras dos hospitais *locus* do estudo foram encaminhadas ao Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) no Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará. As amostras foram cadastradas no Sistema de Banco de Dados (SISCEMM), processadas e analisadas para a identificação da espécie fúngica envolvida e, posteriormente, estocadas na micoteca, de acordo as normas implementadas no laboratório (Anexo I).

Na segunda fase deste ensaio, foram tomadas, dentre as amostras que apresentaram histórias clínicas com dados completos, 50 cepas de leveduras a seguir estocadas na micoteca do CEMM, as quais foram descongeladas para o estudo dos testes de sensibilidade aos antifúngicos após a verificação da viabilidade destas cepas e genotipagem dos isolados de pacientes portadores de mais de um episódio de candidemia.

2.1 Levantamento descritivo dos pacientes (primeira fase)

Nos laboratórios de Microbiologia do HGCC e HIAS, após identificação laboratorial das hemoculturas positivas para leveduras, realizou-se uma revisão dos prontuários de cada paciente, com o preenchimento de fichas cadastrais contendo: dados demográficos, motivo da internação, diagnóstico presuntivo, dados clínicos relevantes, fatores predisponentes, diagnóstico final, conduta terapêutica e evolução do paciente (Anexo I). Foram incluídos nesta pesquisa apenas os prontuários que possuíam os dados acima citados completos.

2.2 Identificação das leveduras

2.2.1 Características macromorfológicas

Para a identificação das espécies envolvidas nos hospitais de indicação terciária citados, todas as 142 hemoculturas positivas para leveduras (Figura 5-A) foram cadastradas em fichas de identificação para leveduras (Anexo II) e posteriormente semeadas em ágar-batata (Anexo III) por aproximadamente 48 horas a temperatura ambiente. Posterior à incubação, foram observadas as características macromorfológicas, cor e textura das colônias (Figura 5-B).

A



B



Figura 5 **A** Sistema de automação *Bactec system*. **B** Isolamento das leveduras em ágar-batata.

Adicionalmente as leveduras foram semeadas em CHROMagar–Candida[®] (*Microbiology, Paris, France*) (Anexo III) para identificação presuntiva de algumas espécies, mediante a diferenciação cromogênica das suas colônias e facilitando, assim, o reconhecimento de culturas mistas.

2.2.2 Características micromorfológicas (MILAN & ZAROR, 2004)

2.2.2.1. Prova do tubo germinativo.

O teste do tubo germinativo, permite a distinção entre *Candida albicans* ou *Candida dubliniensis* (tubo germinativo positivo) de outras espécies de levedura (tubo germinativo negativo). Esta técnica baseia-se na formação de uma projeção alongada sem constrição que emerge da levedura, quando está em contato com o soro humano, à temperatura de 37°C, durante 2 a 3 horas.

Procedimento

- 1) Com o auxílio de uma alça de platina esterilizada, retirou-se uma pequena alíquota de cada uma das colônias da levedura, submetida a crescimento prévio de 24 a 48 horas, a qual foi inoculada em tubos contendo 0,5 a 1,0mL de soro estéril humano e incubada a 37° C durante 2 a 3 horas.
- 2) Removou-se, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, uma gota da suspensão em lâmina-lamínula. As lâminas foram examinadas ao microscópio óptico, com objetivas de 10 a 40X, tomando-se o cuidado de não confundir tubos germinativos com pseudo-hifas provenientes da cultura.

2.2.2.2 Microcultivo em Corn-Meal com Tween 80 (Anexo III)

A técnica baseia-se no princípio de que a incubação das leveduras em meio Tween 80 e sob baixa tensão de oxigênio estimula a produção de conídios e filamentação, sendo possível sugerir o gênero, ou até mesmo a espécie, pelo estudo da presença e disposição dos blastoconídios, artroconídios, hifas verdadeiras e pseudo hifas.

Procedimento

- 1) Após o preparo do meio Corn-Meal com Tween 80 (Anexo III), este foi distribuído em placas de Petri de 70mm de diâmetro, as quais foram acondicionadas a 4° C.
- 2) Com o auxílio de caneta para retroprojektor, dividiu-se o reverso da placa, contendo o meio, em duas ou três partes iguais, para identificar o número dos cultivos que seriam semeados.
- 3) A semeadura foi realizada com alça de platina estéril, fazendo de 3 a 4 estrias paralelas sobre o ágar, de 4 a 4cm de extensão e equidistantes de 3 a 4 mm umas das outras. Cuidando-se para, não perfurar o ágar com a alça.
- 4) As estrias foram cobertas na sua porção central, com lamínula esterilizada de 20mm². Pressionou-se delicadamente a lamínula com uma pinça, para retirar o ar retido entre a lamínula e a superfície do ágar. As placas foram incubadas a 30°C, durante 48 a 96 horas.
- 5) No momento da observação, a placa foi removida e posicionada no microscópio óptico. A área estriada foi examinada, com as objetivas de 10 a 40X, visando a detectar as estruturas.

2.2.3 Exigências nutricionais e fisiológicas (MILAN & ZAROR, 2004)

A identificação das leveduras foi baseada fundamentalmente nas provas de assimilação de carboidratos e nitrogênio e na prova de fermentação de carboidratos.

2.2.3.1 Assimilação de Carboidratos (Auxonograma)

A assimilação de carboidratos refere-se à habilidade que uma levedura tem de crescer aerobicamente na presença de determinado carboidrato fornecido como única fonte de carbono. A assimilação em meio sólido ou técnica auxonográfica emprega meio de ágar destituído de qualquer fonte de carbono, adicionado da suspensão da levedura e distribuído em placa. Após a solidificação, são dispostos em porções os carboidratos. A positividade é avaliada pela observação de halo de crescimento da levedura em presença do carboidrato fornecido. São utilizados os seguintes carboidratos: dextrose, galactose, trealose, xilose, sacarose, celebiose, lactose, manitol, inositol, L-arabionose, melibiose, rafinose, dulcitol, ramnose, inulina e maltose, sobre o ágar.

Procedimento

- 1) Foi preparada uma suspensão recente de levedura (24 a 48 horas) a ser identificadas em 2mL de água destilada esterilizada, ajustando-se posteriormente a turbidez de acordo com o padrão de número 5 da escala de Mcfarland.
- 2) O meio *Yeast Nitrogen Base* (Difco) (Anexo III) foi previamente preparado de acordo com as normas do fabricante, armazenado em tubos de 20x 200mm, contendo 20mL do meio, a 4°C.
- 3) No momento do uso, os tubos foram fundidos em forno de microondas, seguido de resfriamento até a temperatura de 50°C em banho-maria.
- 4) Após a estabilização da temperatura, 2mL da suspensão da levedura foram adicionados a 40mL do meio e vertidos em placa de Petri esterilizada, de 150X15mm. Simultaneamente foram realizados suaves movimentos de rotação da placa, com a finalidade de homogeneizar o inóculo.
- 5) Quando o meio solidificou-se, a placa foi disposta sobre cartela-guia, onde se encontravam escritos os nomes dos açúcares distribuídos, de acordo com a numeração previamente dispostas na placa.
- 6) Pequenas alíquotas dos carboidratos foram distribuídas equidistantemente sobre o ágar, com o auxílio de espátulas individuais esterilizadas.
- 7) As placas foram incubadas a 25-30°C, durante 24 a 96 horas, com a face que contém o meio com os açúcares voltada para cima.
- 8) A leitura foi realizada diariamente, sendo a positividade observada através do surgimento de halo de crescimento, na área correspondente a cada carboidrato.
- 9) A dextrose foi utilizada como controle positivo para avaliar a viabilidade do inóculo da levedura.

2.2.3.2 Assimilação de nitrogênio.

A assimilação do nitrogênio é a habilidade que uma levedura tem de crescer aerobicamente na presença de um composto nitrogenado inorgânico fornecido como única fonte de nitrogênio. A assimilação de fontes nitrogenadas em meio sólido emprega ágar destituído de

qualquer fonte de nitrogênio, adicionado da suspensão da levedura e distribuído em placa. Após a solidificação, são distribuídos em compostos nitrogenados inorgânicos e um orgânico sobre o ágar.

Procedimento

- 1) Preparou-se uma suspensão recente da levedura (24 a 48 horas) a ser identificada em 1 mL de água destilada esterilizada, ajustando-se posteriormente a turbidez, de acordo com o padrão de número 5 da escala de McFarland.
- 2) O meio *Yeast Carbon Base* (Difco) (Anexo III) foi previamente preparado, de acordo com as normas do fabricante e armazenado em tubos de 20 X 200 mm, contendo 20 mL do meio, a 4° C.
- 3) No momento do uso, os tubos foram fundidos em forno de microondas e resfriados até a temperatura de 50° C em banho-maria.
- 4) Após a estabilização da temperatura, 1 mL da suspensão da levedura foi adicionado a 20 mL do meio, sendo essa mistura vertida em placa de Petri de 90 X 15 mm esterilizada. Simultaneamente foram realizados suaves movimentos de rotação da placa, com a finalidade de homogeneizar o inóculo.
- 5) Após solidificação do meio, a placa foi disposta sobre cartela-guia.
- 6) Pequenas alíquotas das fontes de nitrogênio foram distribuídas equidistantemente sobre o ágar, com o auxílio de espátulas individuais esterilizadas.
- 7) O controle positivo foi realizado com a utilização de uma alíquota de peptona.
- 8) As placas foram incubadas a 25 a 30° C, durante 24 a 96 horas, com a face que contém o meio com as fontes de nitrogênio voltada para cima.
- 9) A leitura foi feita por meio de um halo de turvação em torno das fontes nitrogenadas.

2.2.3.3 Fermentação de Carboidratos (MILAN & ZAROR, 2004).

Fermentação dos carboidrato é a habilidade que uma levedura tem de crescer anaerobicamente na presença de determinados açúcares fornecidos como única fonte de energia, observada pela produção de gás carbônico e alteração do pH. Pode ser realizada em meio líquido ou semi-sólido. A prova é realizada inoculando-se a suspensão da levedura em tubo de ensaio contendo o meio de cultura, a solução de açúcar a 2% e um tubo de Durham invertido. A

positividade é observada na produção de gás no interior do tubo de Durham. São utilizados os carboidratos: dextrose, maltose, sacarose, galactose, lactose.

Procedimento

- 1) Foi preparada uma suspensão da levedura em 1,2 mL de água destilada esterilizada, ajustando a turbidez de acordo com o padrão 5 da escala de Mcfarland.
- 2) Com o auxílio de um pipetador automático, foram inoculados 200uL da suspensão da levedura em tubos de ensaio contendo dextrose, maltose, sacarose, galactose ou trealose.
- 3) Os tubos foram incubados a 25 a 30° C, durante 28 dias, sendo a leitura realizada depois de 24 a 48 horas e, subseqüentemente, a cada 5 dias, e observando-se a produção de gás.

Os resultados destas provas foram comparados com o quadro de leitura das provas (Anexo IV).

2.2.4 Estoque das amostras

Após previa identificação laboratorial, apenas 100 de 142 cepas de leveduras foram estocadas na micoteca do CEMM (Centro Especializado em Micologia Médica). Estas foram estocadas em três fases diferentes: ágar-batata acrescido com DMSO (10%) conservadas a –20°C; ágar-batata com glicerol (10%) estocado a –20°C e por fim solução salina com óleo mineral, conservado a temperatura ambiente. O restante das cepas não estocadas foi perdido durante a manipulação no CEMM.

Posteriormente, as 50 cepas do HGCC e 87 cepas de leveduras do HIAS estocadas na micoteca foram descongeladas e subcultivadas em ágar-batata por 48h a 30°C para estudo da sua viabilidade, seguindo-se a realização dos testes de sensibilidade aos antifúngicos e genotipagem das cepas.

2.3 Teste de sensibilidade aos antifúngicos

O teste de sensibilidade das cepas de *Candida* spp., foi realizado pelo método da microdiluição em caldo, de acordo com as normas de padronização do NCCLS (2002) publicadas nos documentos M27-A2. Esta metodologia foi realizada em duplicata para cada levedura e repetida 3 vezes em experimentos diferentes.

2.3.1 Metodologia

A Cepas estudadas - Para este estudo, 50 de 100 cepas fúngicas foram retiradas da micoteca do CEMM. As cepas estudadas foram: *Candida parapsilosis* (n=25), *Candida tropicalis* (n=13), *Candida albicans* (n=9), *Candida guilliermondii* (n=2), *Candida glabrata* (n=1).

Além dos isolados clínicos, foram incluídas em cada ensaio como controle a *C. parapsilosis* ATCC 22019, e a *Candida krusei* ATCC 6258.

B Meio utilizado - Foi utilizado o meio líquido RPMI-1640 (*Sigma Chemical Co., St Louis, MO*) (Anexo III) com L-glutamina, 2,0 g/L de glicose sem bicarbonato de sódio e tamponado com MOPS (ácido 2-[N-morfolino]- propanoossulfônico) 0,165M, a pH 7,0. Este meio foi diluído em água destilada esterilizada (46,5g/L), filtrada em Millipore 0,2µm (*Corning Incorporated Costar, Corning, NY, EUA*), e conservado a 4° C. Este meio após sua confecção foi utilizado por até 3 semanas.

C Preparação do inóculo das leveduras - As leveduras foram previamente subcultivadas em ágar-batata e incubadas por 48 horas a temperatura ambiente. Em seguida, foi preparada uma suspensão inicial das leveduras, cuja concentração variou de 1×10^6 - 5×10^6 células/mL, por meio da leitura em espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 530nm, com transmitância ajustada para 90%. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas a partir da suspensão inicial em RPMI 1640 para obtenção do inóculo final, contendo 5×10^2 a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

D Preparo de antifúngicos – Preparou-se uma solução estoque de 1600ug/mL para anfotericina B (*Sigma Chemical Corporation, St. Louis, MO, EUA*) cetoconazol (*Janssen Pharmaceutica*) e, itraconazol (*Janssen Pharmaceutica, Titutsville, NJ, EUA*), as quais foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) 100%, e para o fluconazol a solução estoque foi de 6400ug/mL (*Pfizer Incorporated, New York, NY, EUA*) dissolvidas em água destilada estéril.

Os antifúngicos testados foram diluídos previamente em dez diferentes concentrações seriadas, a saber: para itraconazol, cetoconazol e anfotericina B, as concentrações foram de 16-

0,01µg/mL, dissolvidas em RPMI, e para o fluconazol- de 64- 0,03 µg/mL, dissolvidas em RPMI, em razão de um para 2.

E Procedimento

- 1) Utilizaram-se placas estéreis de polistireno para microtitulação (*Corning Inc. Costar*) de 96 poços com fundos redondos.
- 2) Foram distribuídos 100uL de RPMI 1640 em cada poço até completar 12 colunas.
- 3) Tomaram-se 100uL da solução do antifúngico preparado, e, a partir da coluna 1, realizaram-se diluições em duplicata seriadas até a coluna 11.
- 4) Da suspensão do inóculo preparado, distribuíram-se 100uL em cada poço, desde a coluna 1 até a coluna 12, em duplicata para cada cepa.
- 5) A gama final de concentrações do antifúngico, depois de colocado o inóculo, esteve entre (16µg/mL) na coluna 1 a (0,01µg/mL) na coluna 11 para anfotericina B, itraconazol e cetoconazol, e de 64µg/ml a 0,06 µg/mL para fluconazol.
- 6) Na coluna 12, ficou como controle positivo de crescimento fúngico;
- 7) As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas.
- 8) As leituras realizaram-se em 24 e 48 horas de incubação, mediante a observação de crescimento com ajuda de um visor de aumento. As placas foram colocadas em suporte contendo espelho, permitindo a observação clara do seu reverso, correlacionando com o padrão de crescimento do poço número 12 (sem droga antifúngica).

F Análises dos resultados das CIMS - Os critérios para definição de susceptibilidade ao fluconazol e itraconazol (tabela 1) foram aqueles sugeridos pelo NCCLS (NCCLS, 1997). Em relação ao cetoconazol e anfotericina B (tabela 1), em virtude da falta de consenso na literatura, foram estabelecidas valores (tabela 1) já utilizados por outros autores (REX *et al.*, 1995, 1997).

Tabela 1 - Critérios de sensibilidade a fluconazol, itraconazol, cetoconazol e anfotericina B

Susceptibilidade	Antifúngicos – CIMs (µg/mL)			
	Fluconazol	Itraconazol	Cetoconazol	Anfotericina B
Sensível	≤ 8	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 1
S-DD	16 e 32	0,25 e 0,5	0,25 e 0,5	—
Resistente	≥ 64	≥ 1	≥ 1	≥ 2

S-DD – susceptibilidade dependente da dose. Indica a necessidade de elevada dose terapêutica para resposta clínica satisfatória (NCCLS, 2002).

2.4 Análises da variabilidade genética

Foram estudadas 13 cepas fúngicas pertencentes a 6 pacientes portadores de mais de um episódio de fungemia com intervalos de 1 a 2 semanas entre um e outro episódio. As cepas estudadas foram *C. parapsilosis* isoladas de 5 pacientes e *C. tropicalis* isoladas de 1 pacientes.

Os estudos moleculares para determinar se os re-isolamentos pela mesma espécie eram quadros de recorrência ou re-infecção. Por definição, recorrência caracteriza-se por o reaparecimento de culturas positivas pelo mesmo agente etiológico, enquanto que re-infecção, paciente com novas infecções provocado por diferentes cepas da espécie inicialmente envolvida

2.4.1. Extração do DNA cromossômico para leveduras

Para extração do DNA cromossômico das amostras, foi utilizado o protocolo descrito por Shwartz & Cantor (1984) com modificações:

- 1) Células mantidas em ágar Sabouraud por 48h a temperatura ambiente foram inoculadas em 7mL de caldo Sabouraud e incubadas *overnight* sob rotação 100rpm, a 30°C.
- 2) Após esse período, as células foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.
- 3) As células foram lavadas duas vezes com 0,05M EDTA pH 8,0 nas condições de centrifugação supracitadas e adicionadas ao *pellet* 100uL de EDTA 0,05M.

- 4) 250uL dessa suspensão celular foi tratada com 100uL de Lyticase (*Sigma Chemical*) (2mg/mL) contendo 2mg da enzima em 10mM de fosfato de sódio a pH 8,0 e glicerol 50%, seguindo-se de incubação a 37°C por 2 horas.
- 5) Após esse período, foi adicionado às suspensões celulares 1mL de gel de agarose a 1% de baixo ponto de fusão (*Low Melt preparative grade, Bio-Rad Laboratories*) preparado em 0,05M EDTA, pH 8.0 e esfriado a 50°C.
- 6) O homogeneizado obtido foi dispensado em moldes de acrílico (*Bio-Rad*) e incubado a 4°C por 15min. Os blocos de células formados foram acondicionados em tubos do tipo Falcon e incubados por 16 horas a 37°C em 10mL de 0,5M EDTA pH 8,0, contendo 7,5% de 2-mercaptoetanol.
- 7) Após incubação, os blocos foram lavados com 50mM EDTA pH 8,0 nas mesmas condições descritas há pouco.
- 8) Posteriormente, os blocos foram incubados a 50°C por 48h em banho-maria com Proteinase K (*Sigma Chemical*) 0,75mg/mL em NDS *buffer* (0,5M EDTA pH 8.0, Laurylsarcocinate de sódio 1%).
- 9) Finalmente, os blocos foram lavados 3 vezes com 0,05M EDTA pH 8,0 a temperatura ambiente por 24h e estocados a 4°C em solução de 0,5M EDTA pH 8,0.

2.4.2 Condições eletroforéticas do PFGE

Foi utilizado gel de agarose a 1% (*Agarose Ultra pure, Gibco BRL*) em tampão TBE 0,5X (tris-base 5,40gr, ácido bórico 2,75gr, EDTA 0,05M pH 8,0 20mL e água destilada 1000mL). A corrida eletroforética foi programada no aparelho *Gene navigator (Pharmacia)* com 4 fases:

1)-140 seg por 34:30min, 2)-50seg por 30min, 3)-70seg por 6h 30min e 4)-20seg por 30min. totalizando 42 horas a 180V a 4° C.

Após o término da corrida, o gel foi corado com solução de brometo de etídio 2ug/mL durante 1 hora. A visualização e o registro fotográfico foram realizados em transiluminador de raios UV acoplado a câmara fotográfica digital (*Nikon, digital*).

2.4.3 Análise de polimorfismo

A similaridade genética dos isolados foi avaliada pela análise visual comparativa entre os padrões de bandas obtidos nos diferentes isolados. Uma cepa foi considerada igual a outra quando todas as bandas cromossômicas foram semelhantes em tamanho, número e distanciamento entre elas. Utilizamos como referência da separação das bandas o marcador de peso molecular *Saccharomyces cerevisiae* (*Yeast Chromosome PFG Marker- Uniscience*).

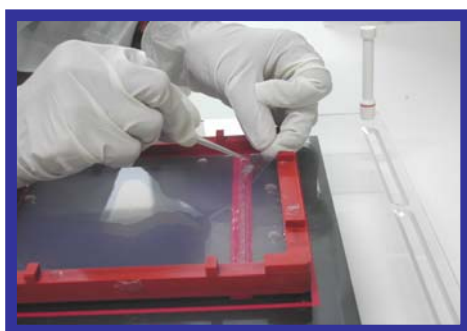


Figura 6 Distribuição dos blocos de agarose 1%



Figura 7. Anarelho *Gene Navigator*.

2.4.4 Extração do DNA genômico para leveduras (RAPD)

Foram avaliadas cepas de *Candida* spp., crescidas em ágar Sabouraud por 48 horas a temperatura ambiente. Para extração do DNA genômico das amostras, foi utilizado o protocolo descrito por HANNULA *et al.*, (1997) com modificações:

- 1) Células mantidas em ágar Sabouraud por 48h a temperatura ambiente foram inoculadas em 7mL de caldo Sabouraud e incubadas por 18 horas sob rotação a 100rpm, 30°C.
- 2) Após esse período, as células foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.
- 3) As células foram lavadas duas vezes com 0,05M EDTA pH 8,0 nas condições de centrifugação supracitadas.
- 4) 250uL da solução foram tratados com 100uL de Lyticase (*Sigma Chemical*) (/mL) contendo 2mg da enzima em 10mM de fosfato de sódio a pH 8,0 e glicerol 50%, incubados a 37°C por 2 horas.
- 5) As células foram incubadas em tampão CTAB (0,7M NaCl, 2% CTAB, 10mM Tris, 10mM EDTA, 1% 20mercaptoethanol) a 60° C por 30-60min.
- 6) Após incubação, adicionou-se volumes de clorofórmio e álcool isoamílico numa proporção de 24:1 e a mistura foi realizada por inversões vagarosas várias vezes, ao que se seguiu centrifugação a 5000 rpm por 20minutos a temperatura ambiente.
- 7) Após esta etapa, a fase superior aquosa contendo DNA foi removida em um tubo devidamente marcado (usando ponteiras de ponta larga; cortadas de forma estéril).
- 8) Ao complexo DNA-CTAB precipitado, foram adicionados 2/3 do volume de isopropanol 100% à fase aquosa e incubados 18 horas a -20°C.
- 9) Após incubação, foi centrifugado a 2000rpm a temperatura ambiente por 15 minutos e descartado o sobrenadante.
- 10) O *pellet* foi re-suspenso em 2mL de 3M NaCl e adicionou-se 3mL de volume de etanol 100% (misturado por inversão) com incubação 18 horas a -20° C; posteriormente centrifugado a 2000 rpm a temperatura ambiente.
- 11) Após essa fase, o *pellet* foi lavado com etanol 70% centrifugado por 15minutos; após a remoção do sobrenadante, o *pellet* foi re-suspenso em água estéril.

12) Após este procedimento, foi estimada a concentração por meio do espectrofotômetro com comprimento de onda de 260/280nm e a análise do DNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1%.

2.4.5 Reações de amplificação do DNA, utilizando seqüências iniciadoras aleatórias (RAPD)

2.4.5.1 Seqüências iniciadoras utilizadas

Foi utilizado o iniciador OPA-03 (5'-AGTCAGCCAC-3') (*Invitrogen Brasil Custom Primers*). A seqüência utilizada foi referida por HANNULA *et al.* (1999).

2.4.5.2 Preparo das reações de amplificação (RAPD)

As condições do PCR para o RAPD foram as mesmas do protocolo de HANNULA *et al.* (1999) com algumas modificações.

Para a reação de RAPD, foram preparados 15ul da mistura da reação contendo os seguintes componentes: tampão da reação (50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 9,0, 0,1% Triton X-100), 2mM de MgCl₂; 0,5mM de cada *dNTP* 0,5mM (*Amersham Biosciences UK*); 10pmol do *primer* OPA-03 (5'-AGTCAGCCAC-3') (*Invitrogen Brasil Custom Primers*); 1U de *Taq* DNA polimerase (*Promega, WI, USA*); e 20ng de DNA genômico.

2.4.5.3 Condições para a reação de RAPD:

As condições de amplificação consistiram de desnaturação inicial de 94° C por 1min seguido-se 45 ciclos constituídos de desnaturação a 94°C por 20seg, anelamento a 35° C por 1 minuto, extensão de 72° C por 1 minuto e uma extensão final de 72° C por 10minutos. O termociclador utilizado foi o *Gene Amp PCR System 9600, Perkin Elmer Corporation, Norwalk, CT, EUA*.

2.4.5.4 Eletroforese do DNA amplificado

Para visualização dos fragmentos amplificados, 3ul de cada amplicon foram submetidos a eletroforeses em gel de poliacrilamida 7% em solução tampão TBE 0,5X e corados pela prata, segundo a metodologia seguida por Sanguinetti *et al.* (1994). A visualização do material separado por eletroforese foi realizada com algumas modificações: 1) solução fixadora (etanol

15%, ácido acético 0,5%), 5min sob agitação; 2) solução oxidante (nitrato de prata 0,2% em solução fixadora), 10min sob agitação; 3) água destilada, 10seg; 4) solução reveladora (NaOH 0,75M, formaldeído 0,1M), até visualização das bandas. A coloração foi interrompida após lavagem dos géis com água destilada e solução fixadora.

2.4.5.5 Análises de polimorfismos

O critério empregado para diferenciar os perfis genéticos das cepas de *Candida* spp., em cada episódio de candidemia foi a diferenciação do padrão de bandas de DNA nas reações do RAPD (Hannula *et al.*, 1999).

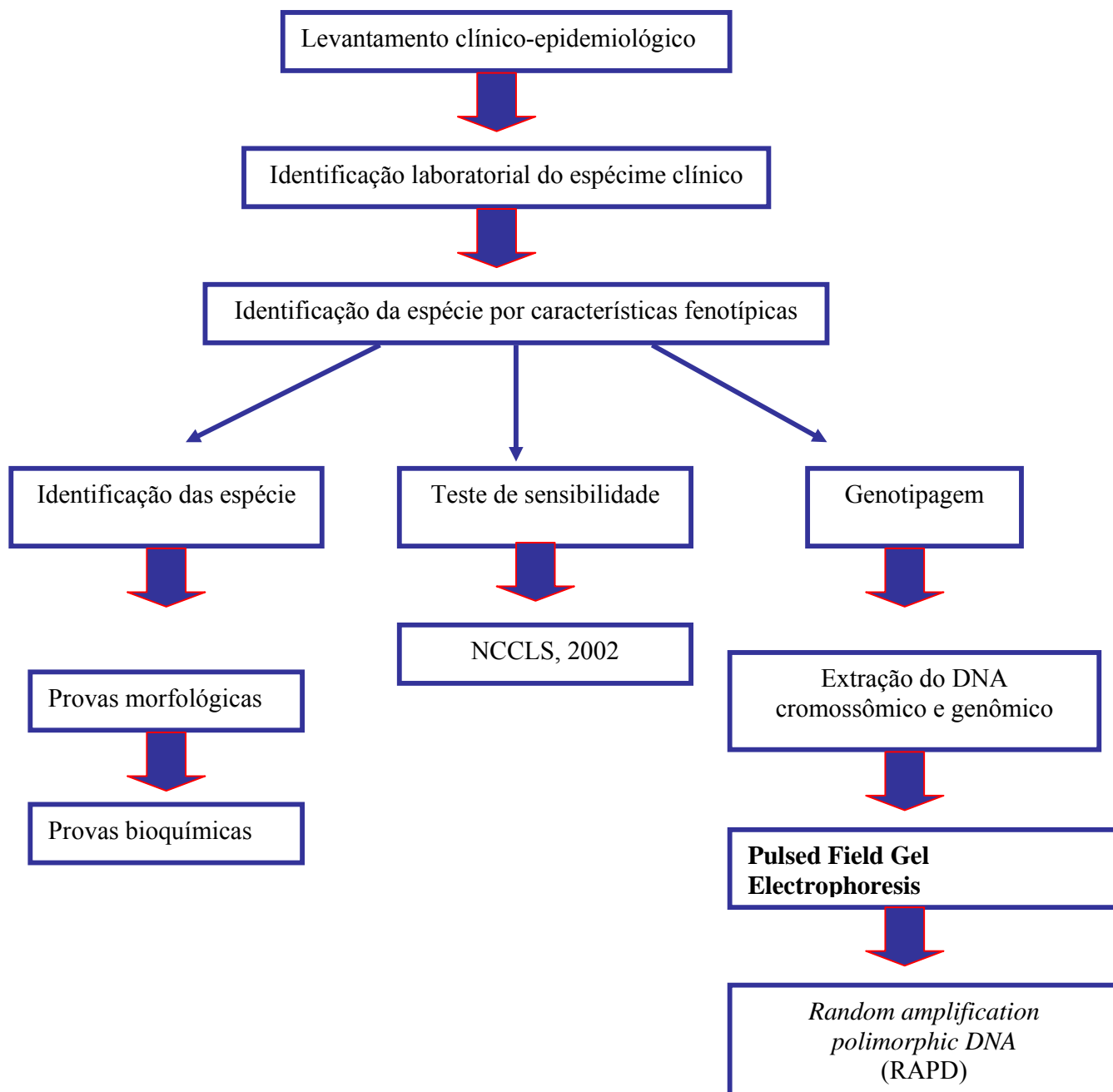
2.5 Análises Estatística

Os dados foram apresentados de forma descritiva.

2.6 Aspectos éticos- deontológicos da pesquisa

O trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará – COMEPE.

2.7 FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL



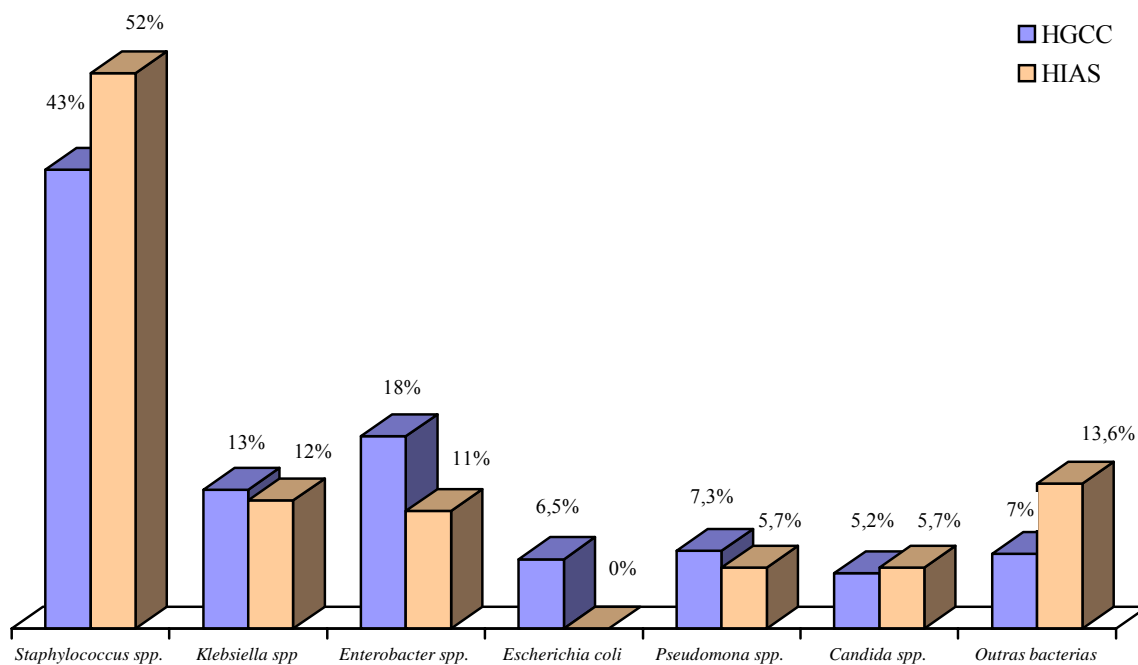
3 RESULTADOS

3.1 Identificação Laboratorial

Entre o período de junho do 2000 a junho do 2002, no Hospital Geral Dr. César Cals (HGCC), foram analisadas 4 627 hemoculturas, sendo positivas 1 051. Destas, 55 (5,2%) foram positivas para leveduras do gênero *Candida*, não tendo sido isolado outro gênero fúngico. Este foi o sexto microrganismo mais freqüente neste hospital (Gráfico 1).

Paradoxalmente, no HIAS, apesar da coleta das hemoculturas ter sido realizada num período menor, compreendido entre junho de 2001 a junho do 2002, foram analisadas 5 316 hemoculturas, sendo positivas 1 520 amostras, das quais 87 (5,7%) foram positivas para leveduras. Destas, 85 (98%) foram positivas ao gênero *Candida* e 2 (2%) ao gênero *Rhodotorula*. O gênero *Candida* foi o quarto microrganismo mais comumente recuperado das hemoculturas positivas, nesse hospital, juntamente com o gênero *Pseudomona* (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Principais microrganismos isolados em hemoculturas positivas no HGCC e no HIAS



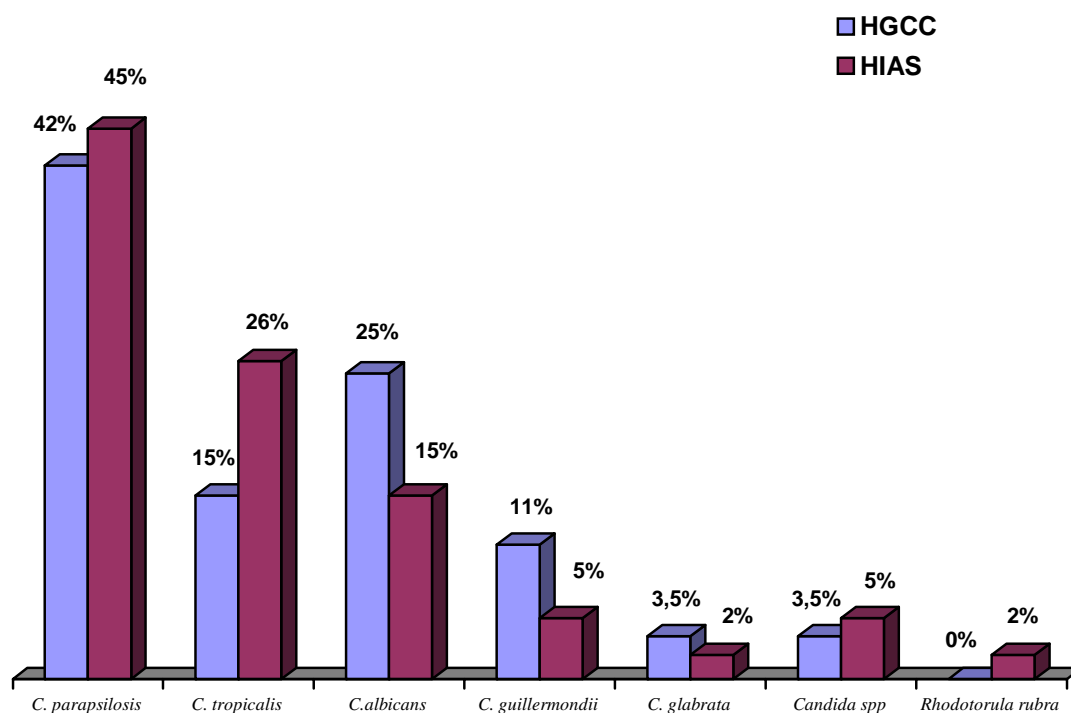
HGCC- Hospital Geral Dr. César Cals

HIAS- Hospital Infantil Albert Sabin

No HGCC, das 55 hemoculturas positivas para leveduras, provenientes de 40 pacientes, as espécies isoladas foram: *C. parapsilosis* (n=23; 42%), seguida pela *C. albicans* (n=14; 25%), *C. tropicalis* (n= 8; 15%), *C. guilliermondii* (n=6; 11%), *C. glabrata* (n=2; 3,5%) e *Candida* spp. (n=2; 3,5%), perfazendo um total de 5 espécies de *Candida* isoladas (Gráfico 2).

No HIAS, das 87 hemoculturas positivas, para leveduras provenientes de 83 pacientes, as espécies mais isoladas foram: *C. parapsilosis* (n=39; 45%), seguida por *C. tropicalis* (n=23; 26%), *C. albicans* (n=13; 15%), *C. guilliermondii* (n=4; 5%), *C. glabrata* (n=2; 2%), *Candida* spp. (n=4; 5%) e *Rhodotorula rubra* (n=2; 2%) perfazendo um total de 5 espécies isoladas de leveduras (Gráfico 2).

Gráfico 2. Distribuição das espécies de leveduras isoladas no HGCC e no HIAS



HGCC- Hospital Geral Dr. César Cals

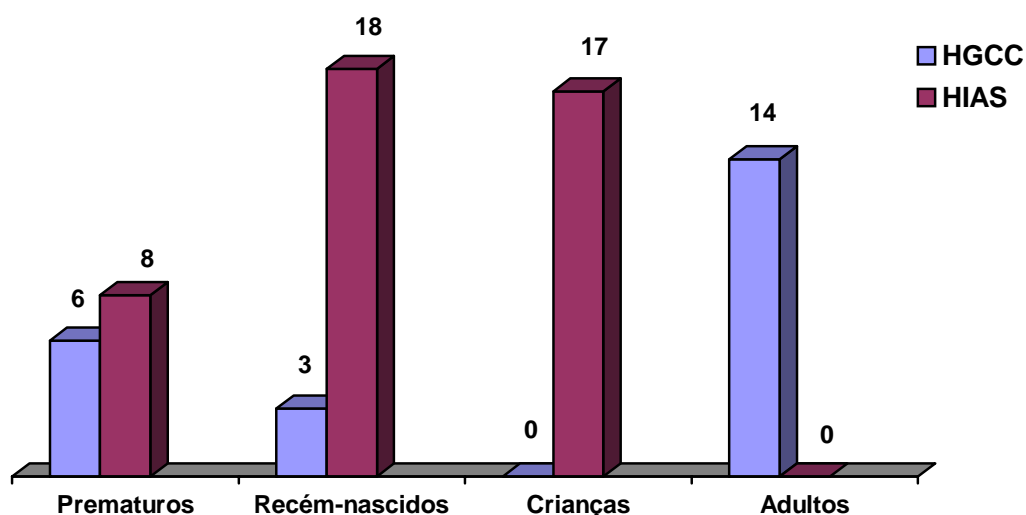
HIAS- Hospital Infantil Albert Sabin

3.2 Pacientes envolvidos

Do total de 40 pacientes com candidemia no HGCC, apenas 23 destes possuíam histórias clínicas, com dados completos, para o preenchimento da fichas epidemiológicas (Anexo I). Oito foram do sexo masculino e 15 foram do sexo feminino. A idade variou de 0 a 76 anos de idade, sendo 6 prematuros, 3 recém-nascidos (<1 mês) e 14 adultos (Gráfico 3). Os episódios de candidemia aconteceram principalmente em pacientes oriundos da unidade de cuidados intensivos (19 casos) (Os dados estão compilados na Tabela 2, no Anexo V).

Do total de 83 pacientes com candidemia no HIAS, apenas 43 possuíam histórias clínicas com informações completas. Vinte e quatro foram do sexo masculino e 19 do sexo feminino. A idade compreendia de 0 a 3 anos, sendo 18 recém-nascidos (< 1mês), 8 prematuros e 17 crianças (>1mês) (Gráfico 3). Apenas 18 pacientes com episódios de fungemia eram provenientes de unidades de cuidados intensivos (Os dados estão compilados na Tabela 3, no Anexo V).

Gráfico 3- Pacientes envolvidos no HGCC e HIAS



HGCC: Hospital Geral Dr. César Cals

HIAS: Hospital Infantil Albert Sabin

3.3 Episódios de candidemia

No HGCC, dos 23 pacientes analisados com culturas de *Candida* positivas, 5 apresentaram mais de um episódio de candidemia. Os episódios foram espaçados por intervalos de pelo menos 1 a 2 semanas (Tabela 4).

No HIAS, dos 43 pacientes analisados com culturas de leveduras positivas, apenas 1 paciente apresentou 2 episódios de candidemia, com intervalo de 12 dias entre um episódio e outro (Tabela 4).

Tabela 4. Episódios de candidemia em 5 pacientes do HGCC e 1 paciente do HIAS

Hospital	Paciente	Data de Coleta	Organismos	Tratamento	Tempo de Tratamento	Evolução
HIAS (1 paciente)	1	08.02	<i>C.parapsilosis</i>	Anfotericina B	12dias	-
		20.02	<i>C.parapsilosis</i>	Anfotericina B	12dias	Alta
HGCC (5 pacientes)	2	13.09	<i>C.parapsilosis</i>	-	-	-
		21.09	<i>C.parapsilosis</i>	Anfotericina B	1dia	Óbito
	3	11.11	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-
		20.11	<i>C.parapsilosis</i>	Fluconazol	1dia	Óbito
	4	22.01	<i>C.parapsilosis</i>	Não	-	-
		30.01	<i>C.parapsilosis</i>	Não	-	-
5	13.02	<i>C.parapsilosis</i>	Não	-	Obito	
	27.04	<i>C.parapsilosis</i>	Não	-	-	
6	6	05.05	<i>C.parapsilosis</i>	Não	-	Óbito
		18.05	<i>C.tropicalis</i>	Não	-	-
		26.06	<i>C.tropicalis</i>	Não	-	Alta

3.4 Fatores de risco

Quanto aos fatores de risco, foram considerados todos os procedimentos hospitalares, bem como as condições patológicas de base do paciente.

No HGCC, das 23 histórias clínicas, os principais procedimentos hospitalares que foram associados ao desenvolvimento da candidemia foram: antibioticoterapia prévia (n=22; 96%), cateter venoso central (n=20; 87%), nutrição parenteral (n=15; 65%), ventilação mecânica (n=19; 83%) e cirurgia (n=20; 87%). Cada paciente analisado foi sujeito a um ou mais fatores de risco (Gráfico 4).

As principais condições patológicas de base foram: doenças gastrointestinais (n=5; 22%), neoplasmas (n=5; 22%) e prematuridade (n=6; 26%). Cada paciente analisado foi sujeito a um ou mais fatores de risco (Os dados completos estão compilados na tabela 2, no anexo V).

No HIAS, da análise das histórias clínicas de 43 pacientes, os principais procedimentos hospitalares associados ao desenvolvimento das candidemias foram: cateter venoso central (n=38; 88%), antibioticoterapia prévia (n=35; 81%) e cirurgia (n=22; 51%). Cada paciente analisado foi sujeito a um ou mais fatores de risco (Gráfico 4). Dentre as condições patológicas de base com maior importância, menciona-se doenças neurológicas (n=11; 26%), doenças gastrointestinais (n=7; 16%), prematuridade (n=8; 19%), doenças respiratórias (n=6; 14%) e tumores embrionários (n=4; 9%). Cada paciente analisado foi sujeito a uma ou mais fatores de risco (para melhores detalhes os dados estão compilados na Tabela 3, no Anexo V).

No HGCC, os fatores de risco como antibioticoterapia, cateter venoso central, nutrição parenteral, ventilação mecânica e cirurgia, foram os fatores mais associados aos quadros de candidemia causada pelas espécies de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. albicans* (Tabela 5) Nos recém-nascidos com prematuridade, a *C. albicans* foi a espécie mais envolvida neste grupo.

No HIAS, os fatores de risco antibioticoterapia e cateter venoso central foram associados às espécies de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, enquanto fatores como nutrição parenteral, ventilação mecânica e cirurgia as espécies envolvidas foram *C. albicans*, *C. guillermondii*, *C. glabrata*, e *Candida* spp (Tabela 5).

Gráfico 4: Distribuição dos principais Fatores de Risco envolvidos no HGCC e HIAS

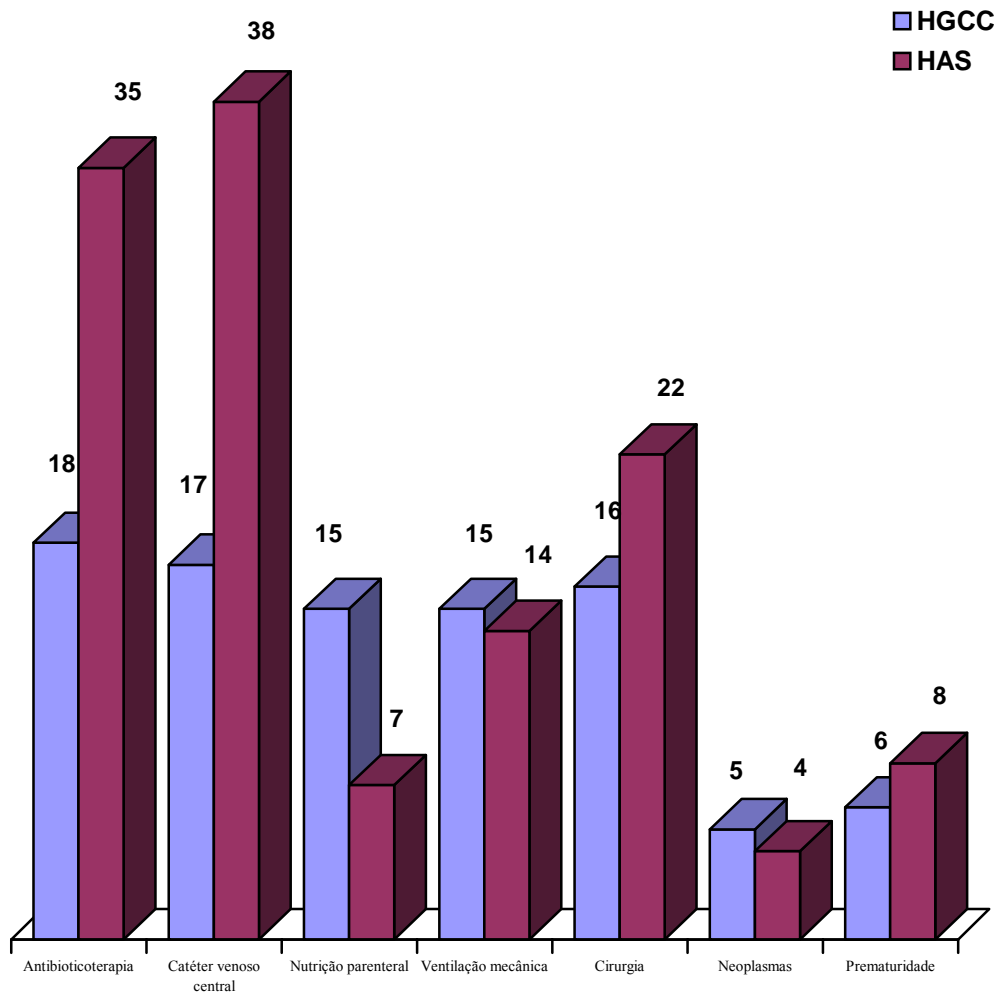


Tabela 5– Principais fatores de risco, em relação as espécies envolvidas em quadros de candidemia em pacientes do HGCC e HIAS

Hospital	<i>Candida</i> spp	Fatores de risco						
		Antibioticoterapia	Catéter venoso central	Nutrição parenteral	Ventilação mecânica	Cirurgia	Câncer	Prematuridade
HGCC	<i>C. parapsilosis</i>	5	4	3	3	4	1	2
	<i>C. tropicalis</i>	4	6	4	4	4	2	-
	<i>C. albicans</i>	6	5	6	6	5	-	4
	<i>C. guilliermondi</i>	2	1	1	1	2	-	-
	<i>C. glabrata</i>	1	1	1	1	1	1	-
	Total	18	17	15	15	16	4	6
HIAS	<i>C. parapsilosis</i>	14	15	5	6	11	3	3
	<i>C. tropicalis</i>	10	12	1	2	5	1	3
	<i>C. albicans</i>	4	3	1	3	1	-	2
	<i>C. guilliermondii</i>	2	3	-	2	1	-	-
	<i>C. glabrata</i>	1	1	-	-	1	-	-
	<i>Candida</i> spp	3	3	-	1	2	-	-
	<i>Rhodotorula rubra</i>	1	1	-	-	1	-	-
	Total	35	38	7	14	22	4	8

3.5 Conduta terapêutica

No HGCC, foram utilizados 2 tipos de condutas terapêuticas: terapia profilática e terapia propriamente dita 1)Terapia profilática. Antes da ocorrência de candidemia, foi observada em apenas um paciente tratado com fluconazol (200mg por dia) por 10 dias; 2) A terapia propriamente dita foi administrada após da confirmação da candidemia a 9 pacientes, dos quais 3 foram tratados com anfotericina B (0,5- 1mg/ kg/ dia) por 13 dias e 6 foram tratados com fluconazol (150- 400 mg por dia) por 12 dias em média. Os 14 pacientes restantes não receberam tratamento antifúngico, 7 deles diagnosticados *post-mortem* e em 7 não constava o registro de tratamento no prontuário (Os dados estão compilados na Tabela 2, no Anexo V).

No HIAS, foi utilizada apenas conduta terapêutica após confirmação da candidemia. 33 pacientes foram tratados com drogas antifúngicas, dos quais 31 foram tratados com anfotericina B (0,5- 1mg/ kg/dia) por 17 dias e 2 foram tratados com fluconazol (6-12mg/kg/dia) por 7 dias. Os 10 pacientes restantes não foram tratados com drogas antifúngicas depois da confirmação da candidemia 4 deles foram diagnosticados *post-mortem* e 4 evoluíram para cura após a retirada das vias de acesso intravenoso (Os dados estão compilados na Tabela 3, no Anexo V)

3.6 Mortalidade

No HGCC, candidemia foi associada a morte em 15 dos 23 pacientes, estando envolvidos 3 recém-nascidos, 5 prematuros e 7 adultos. As espécies de *C. albicans* e *C. parapsilosis* foram as mais implicadas no óbito dos pacientes (Tabela 6). A mortalidade aconteceu em 5 pacientes tratados e 10 não tratados (Tabela 7) (Os dados completos estão compilados na Tabela 2 no Anexo V).

No HIAS, candidemia foi associada à morte de 17 dos 43 pacientes, estando envolvidos 11 recém-nascidos (do total de 18), 4 prematuros (do total de 8) e 3 crianças (do total de 17). As espécies *C. parapsilosis*, seguida da *C. tropicalis*, foram as mais implicadas na morte dos pacientes (Tabela 6). A mortalidade aconteceu em 14 com tratamento e 3 sem tratamento antifúngico (Tabela 7) (Os dados completos estão compilados na Tabela 3 no Anexo V).

Tabela 6.- Distribuição da mortalidade segundo a Faixa etária do paciente no HGCC e HIAS

Hospital	Microrganismo	Nº de óbitos			
		Prematuro	Recém-nascidos (0-29dias)	Crianças (1mês-16anos)	Adultos (>17anos)
HGCC	<i>C. parapsilosis</i>	2	1	NC	4
	<i>C. tropicalis</i>	-	1	NC	-
	<i>C. albicans</i>	3	1	NC	2
	<i>C. guilliermondii</i>		-	NC	1
	Total	5	3	NC	7
HIAS	<i>C. parapsilosis</i>	2	5	1	NC
	<i>C. tropicalis</i>	1	3	1	NC
	<i>C. albicans</i>	1	1	-	NC
	<i>C. glabrata</i>	-	1	-	NC
	<i>Candida spp</i>	-	1	1	NC
	Total	4	11	3	NC

Obs: - não houve mortalidade; NC: não constam nos prontuários

Tabela 7. Distribuição da mortalidade segundo a conduta terapêutica instituída no HGCC e HIAS

Hospital	Microrganismo	Nº de óbitos		
		Conduta terapêutica		
		Anfotericina B	Fluconazol	Sem tratamento
HGCC	<i>C. parapsilosis</i>	1	1	5
	<i>C. tropicalis</i>	-	-	1
	<i>C. albicans</i>	1	2	3
	<i>C. guilliermondii</i>	-	-	1
	Total	2	3	10
HIAS	<i>C. parapsilosis</i>	5	1	2
	<i>C. tropicalis</i>	5	-	-
	<i>C. albicans</i>	2	-	-
	<i>C. glabrata</i>	1	-	-
	<i>Candida spp</i>	-	-	2
	Total	13	1	4

Obs: - não houve mortalidade

3.7 Testes de sensibilidade

Entre maio de 2003 e julho de 2004, no CEMM, foram analisadas 50 cepas de *Candida* spp. de 43 pacientes estando incluídas: *C. parapsilosis* (n=25), *C. tropicalis* (n=13), *C. albicans* (n=19), *C. guilliermondii* (n=2) e *C. glabrata* (n=1). Os critérios para definição de sensibilidade ao fluconazol e itraconazol foram aqueles sugeridos pelo NCCLS (NCCLS, 2002). Em relação ao cetoconazol e anfotericina B em razão da falta de consenso na literatura, foram estabelecidos valores (tabela1) já utilizados por outros trabalhos (REX *et al.*, 1995 a; REX *et al.*, 1997).

Das espécies de *Candida* frente à anfotericina B, 4% apresentaram resistência (CIM > 2ug/mL). Quanto aos azólicos os índices de resistência foram: fluconazol (>64ug/mL) 52%, itraconazol (>1ug/mL) com 50% e cetoconazol (>1ug/mL) com 86% (Gráfico 5).

Gráfico 5- Distribuição dos CIMs das espécies de *Candida* frente aos antifúngicos testados

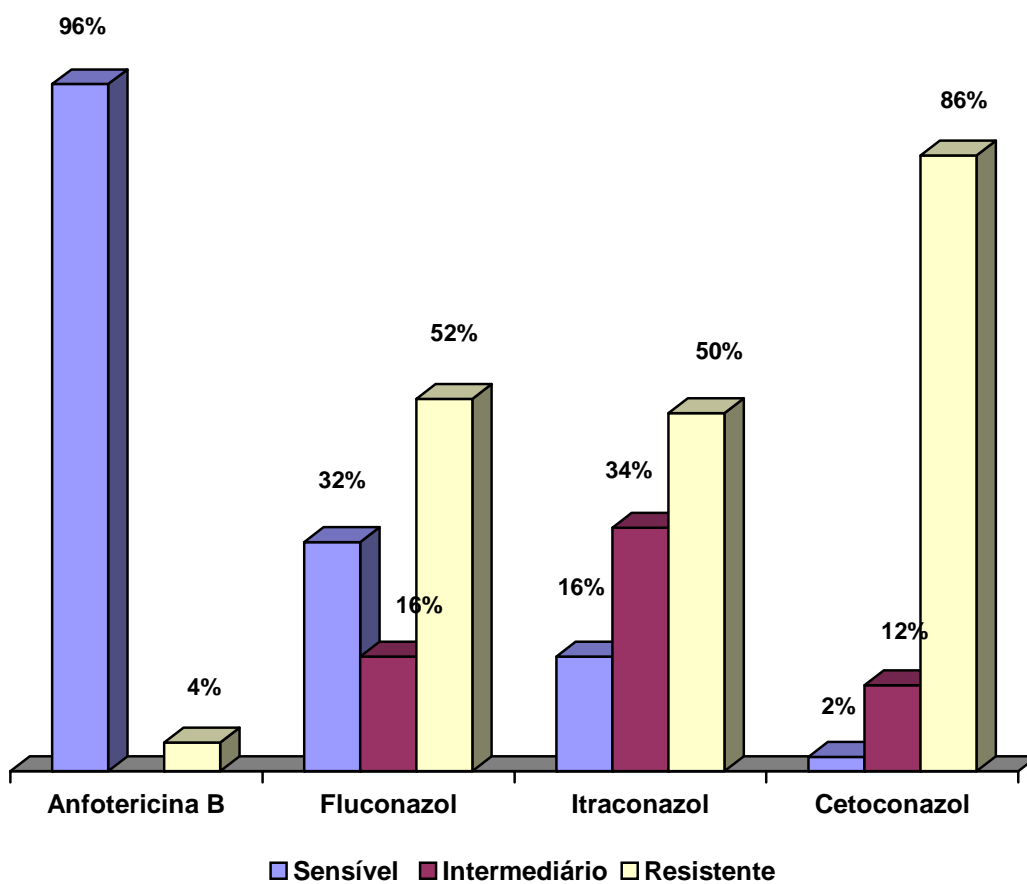


Tabela 10- Distribuição dos CIMs das cepas de *Candida* spp., frente ao itraconazol

Candida spp	Itraconazol CIM (ug/mL)										
	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,01
<i>C. parapsilosis</i>			2	4	3	6	5	1	3		1
<i>C. tropicalis</i>			7	1	1	2		1			
<i>C. albicans</i>			3	1	1	2		2			
<i>C. guilliermondii</i>			1		1						
<i>C. glabrata</i>					1						
<i>Candida spp</i>											
<i>C. krusei</i> ATCC 6628											
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 12028											

Faixa vermelha. CIM de resistência; Faixa amarela: sensibilidade; faixa branca: intermediário

Tabela 11- Distribuição dos CIMs das cepas de *Candida* spp., frente ao cetoconazol

Candida spp	CIM (ug/mL)										
	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,01
<i>C. parapsilosis</i>	18	1			1	5					
<i>C. tropicalis</i>	5	3	2		2	1					
<i>C. albicans</i>	9										
<i>C. guilliermondii</i>	2										
<i>C. glabrata</i>	1										
<i>Candida spp</i>											
<i>C. krusei</i> ATCC 6628											
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 12028											

Faixa vermelha. CIM de resistência; Faixa amarela: sensibilidade; faixa branca: intermediária

Nesta pesquisa, 12 cepas foram resistentes aos 3 azólicos testados (fluconazol, itraconazol e cetoconazol) (Tabela 12 em anexo V).

Para analisar a correlação entre a clínica do paciente frente aos testes de sensibilidade aos antifúngicos *in vitro*, foram analisadas cepas de *Candida* spp. isoladas de 21 pacientes que evoluíram para óbito. Destes 11 foram tratados com anfotericina B e 1 com fluconazol, os quais apresentaram uma CIM baixa frente à anfotericina B e ao fluconazol, respectivamente (os dados completos estão compilados na Tabela 12, no Anexo V). Dos 9 pacientes que não receberam tratamento antifúngico, apenas 1 apresentou CIM alta para anfotericina B e 3 destes apresentaram CIM alta para fluconazol.

Em adição, foram analisadas 24 cepas de *Candida* isoladas de 22 pacientes que evoluíram com alta, 13 dos quais foram tratados com anfotericina B e apresentaram uma CIM baixa com exceção de um paciente (paciente 40) que apresentou uma CIM alta a este antifúngico (CIM >16ug/mL) e 2 pacientes que foram tratados com fluconazol, apresentaram uma CIM alta a este antifúngico (Os dados completos estão compilados na Tabela 12 no Anexo V). Em relação aos pacientes que não receberam tratamento antifúngico, os pacientes de número 1 e 4 (tabela 1 e 3) apresentaram CIM alta para anfotericina B e fluconazol, respectivamente.

3.8 Tipificação genotípica

As cepas isoladas de 6 pacientes portadores de mais de um episódio de candidemia foram analisadas molecularmente pelas técnicas de PFGE e RAPD. Do total de 13 cepas fúngicas isoladas, foram submetidas 11 cepas de *C. parapsilosis* e 2 de *C. tropicalis* às técnicas de PFGE e RAPD.

3.7.1 Cariotipagem eletroforética - PFGE

O cariótipo destas espécies de *Candida* foram primeiramente analisados pela técnica do PFGE, a qual proporcionou reprodutibilidade em diferentes corridas. Foram realizadas duplicatas das 13 amostras em 2 experimentos independentes, obtendo-se o mesmo padrão de bandas.

Um padrão de peso molecular correlacionado à levedura *Saccharomyces cerevisiae*, tem sido colocado em cada cariotipagem eletroforética, e, por ser degradado, não pode servir como referência para o posicionamento das bandas cromossômicas. Apesar disso, a cariotipagem eletroforética evidenciou 3 grandes grupos cromossômicos com base no distanciamento das

bandas. O 1º grupo de migração de maior peso molecular, constava de apenas 1 banda cromossômica, o segundo grupo de 3 bandas e um terceiro de menor peso molecular, de 2 bandas cromossômicas. Com base nestas distribuições, para as *C. parapsilosis*, foram identificadas 2 tipos de cariótipos eletroforéticos. O primeiro tipo foi catalogado como do tipo A, constituído por 6 bandas cromossômicas (Figura 8 e 9; tabela 13), e o padrão de bandas do tipo B, com 4 bandas cromossômicas (Figura 8 e 9; tabela 13).

Nos pacientes 1, 2, 3 e 5, foi observado o padrão de banda do tipo A no paciente 4 (com 3 episódios de candidemia), foi observado o padrão de bandas do tipo A no primeiro e segundo episódios e o padrão do tipo B no terceiro episódio (Figura 8 e 9; tabela 13).

Nas 2 cepas de *C. tropicalis* foram observados padrões diferentes, constando de 4 bandas cromossômicas, pertencentes ao mesmo paciente (paciente 6) (Figura 8 e 9)

3.7.2 Amplificação do DNA ao acaso (RAPD)

Por esta técnica, foi observado 1 perfil genético semelhante (padrão I), baseado no padrão da distribuição das bandas, na maioria das cepas de *C. parapsilosis* (n=8). Adicionalmente a estes padrões, 3 outros perfis genômicos foram observados por esta técnica nesta mesma cepa, denominados padrões II, III e IV. Nos pacientes 1, 2 e 5, foi observado o padrão I. No paciente 3, foram observados o padrão II e o padrão III. No paciente 4, os padrões observados para o primeiro e segundo episódios tiveram o padrão I e o padrão IV para o terceiro episódio (Figura 10 e 11)

O perfil genômico observado na *C. tropicalis* foi diferente nos 2 isolados (Figura 10 e 11; tabela 13).

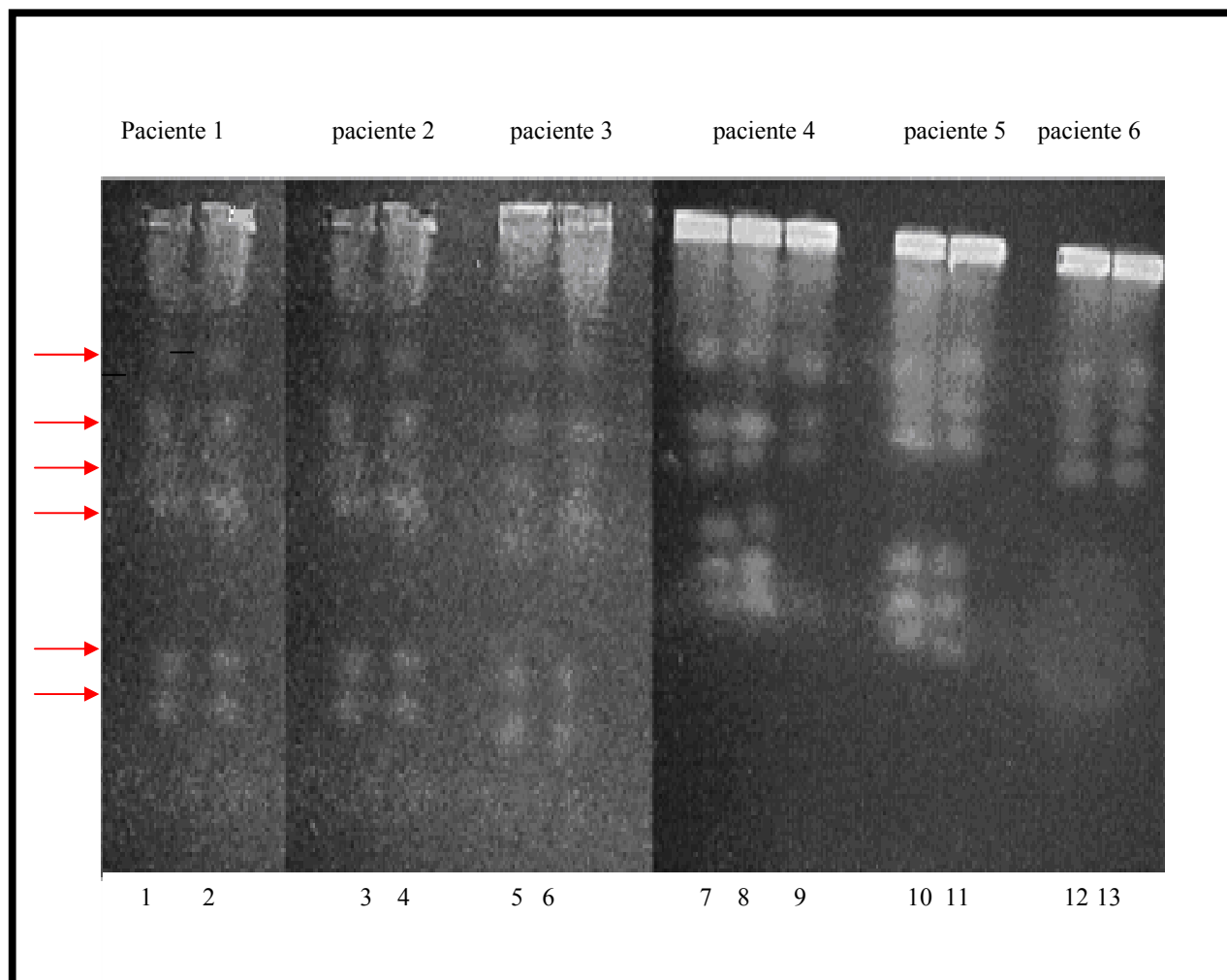
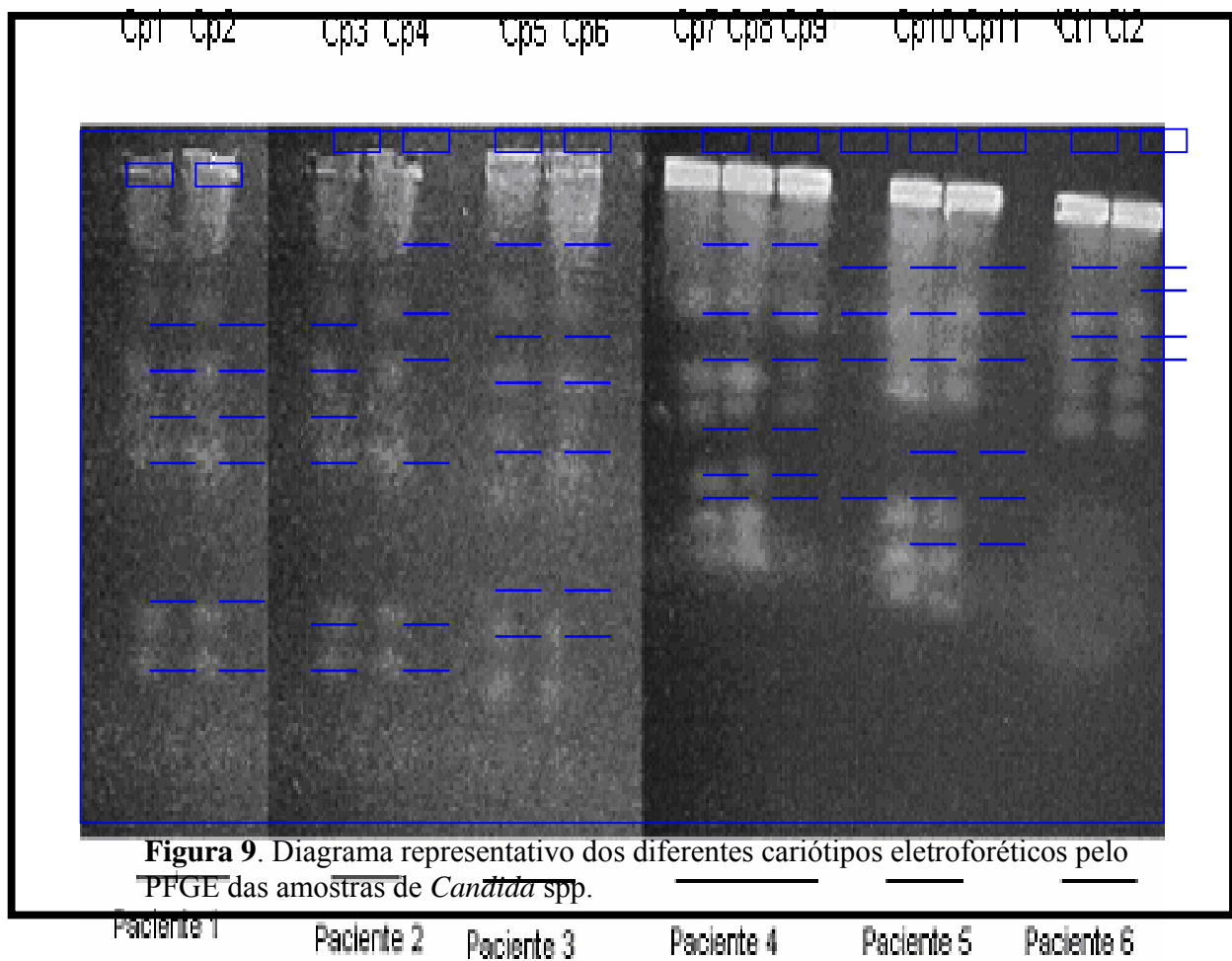


Figura 8. Cariotipagem eletroforética através do PFGE, das *Candida* spp



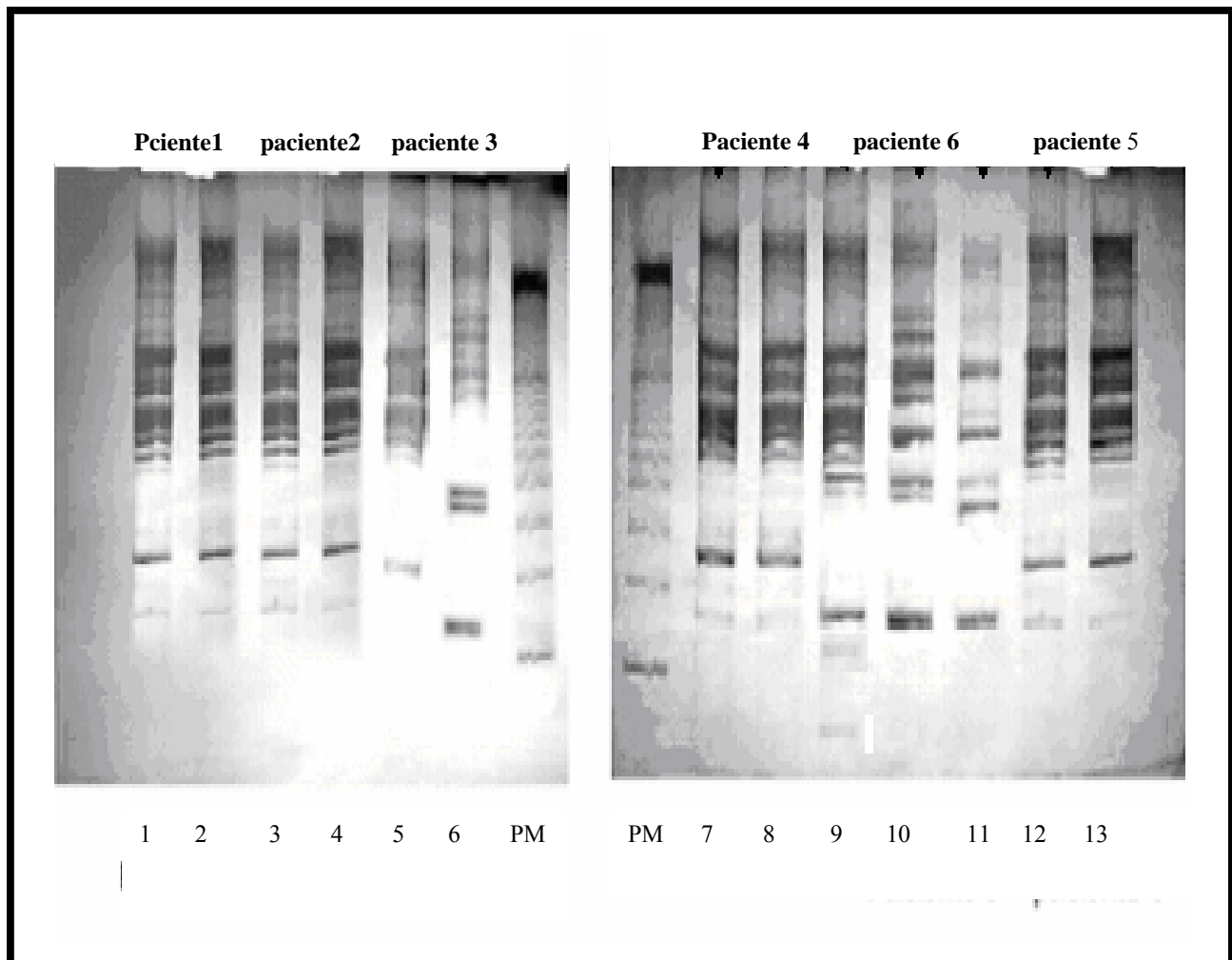


Figura 10. RAPD representativo das amostras de *Candida* spp com a seqüência iniciadora OPA-03 em gel de poliacrilamida 1%

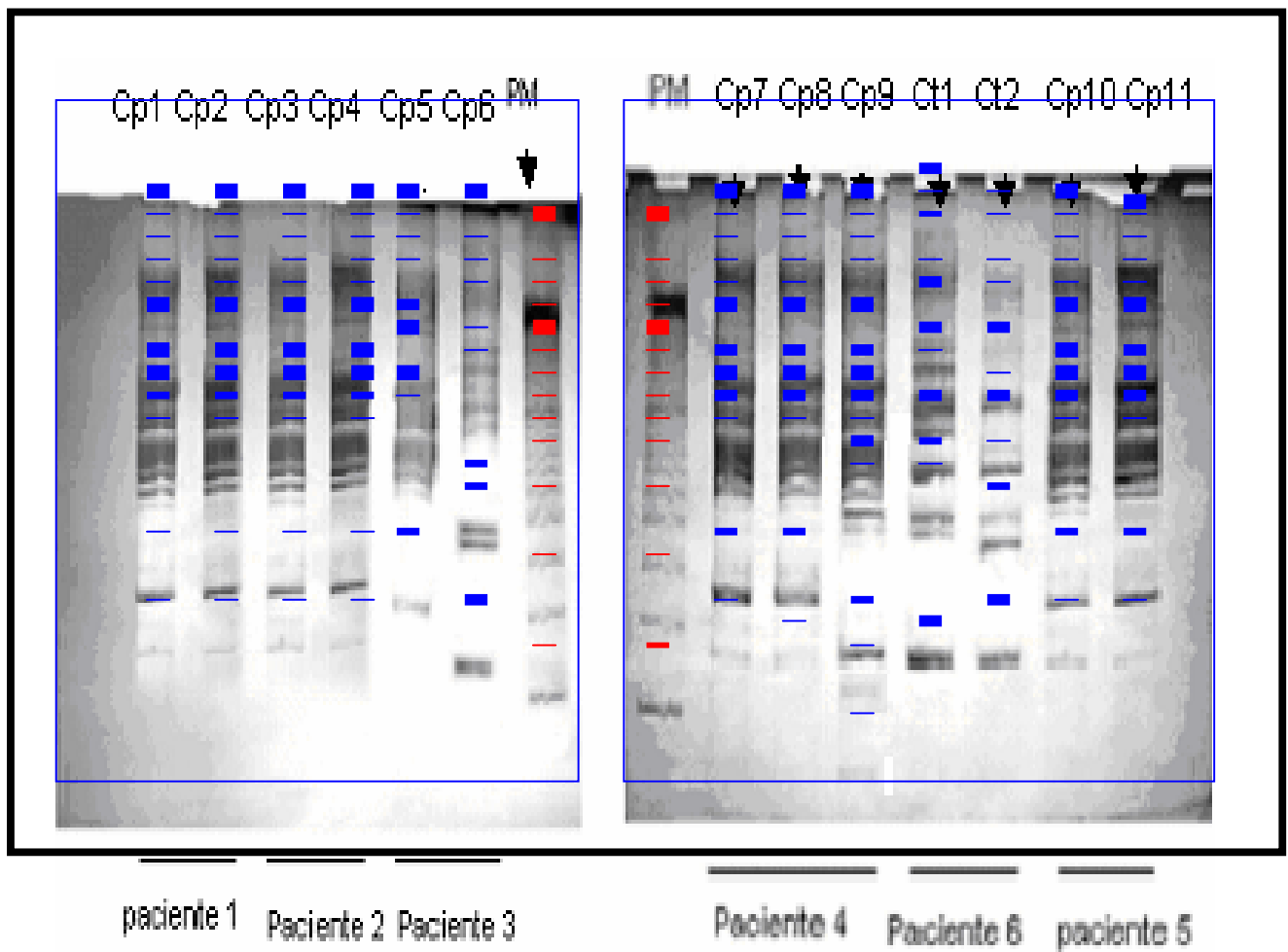


Figura 11. Diagrama representativo dos diferentes perfis obtidos por RAPD das amostras de *Candida* spp com a seqüência indicador OPA-03.

Tabela 13 Distribuição das espécies de *Candida* frente aos azólicos e a perfil genotípicos de cada um delas.

Paciente	Data	Cepa		Tratamento (dias)	Evolução	CIM (µg/ mL)				PFGE	RAPD (D)
		Cepa	<i>Candida spp</i>			Fluconazol	Cetoconazol	Itraconazol	Anfotericina B		
1	08-02	Cp1	Cemm 2-2 240	Anfotericina B						A	I
			<i>C.parapsilosis</i>	(12dias)		8	>16	>4	2		
	20-02	Cp2	Cemm 2-2-243	Anfotericina B						A	I
			<i>C.parapsilosis</i>	(12dias)	Alta	16	0,5	0,5	1		
2	13-09	Cp3	Cemm 2-1-7	<i>C.parapsilosis</i>		16	>16	2	2	A	I
		Cp4	Cemm 2-1-08	Fluconazol						A	I
	21-09		<i>C.parapsilosis</i>	(1dia)	Óbito	8	>16	2	2		
3	11-11	Cp5	Cemm 2-1-09	<i>C.parapsilosis</i>		8	>16	0,5	2	A	II
		Cp6	Cemm 2-1-10	Fluconazol						A	III
	20-11		<i>C.parapsilosis</i>	(1dia)	Óbito	2	>16	0,5	2		
4	22-01	Cp7	Cemm 2-1-68 ^a	<i>C.parapsilosis</i>	Sem tratamento	2	>16	0,25	2	A	I
	30-01	Cp8	Cemm 2-168b	<i>C.parapsilosis</i>	Sem tratamento	>64	>16	0,125	2	A	I
	13-02	Cp9	Cemm 2-168c	<i>C.parapsilosis</i>	Sem tratamento	Óbito	1	>16	>4	4	B
5	27-04	Cp10	Cemm 2-1-110	<i>C.parapsilosis</i>	Sem tratamento	2	>16	0,5	2	A	I
	05-05	Cp11	Cemm 2-1-111	<i>C.parapsilosis</i>	Sem tratamento	Óbito	>64	>16	0,5	2	A
6	18-05	Ct1	Cemm 2-2—145 ^a	<i>C.tropicalis</i>	Sem tratamento	>64	4	>4	0,5	C	V
	26-06	Ct2	Cemm 2-2-145b	<i>C.tropicalis</i>	Sem tratamento	Alta				C	VI

4 DISCUSSÃO

As infecções fúngicas causadas por leveduras do gênero *Candida* aumentaram muito na década de 1990, ocupando o 4º lugar dos agentes etiológicos implicados nas infecções sangüíneas no mundo todo, segundo o centro de referência *National Nosocomial Infectious Surveillance* (NNIS) (ABI-SAID *et al.*, 1997; NUCCI *et al.*, 1998; MOKKADAS *et al.* 2000).

Neste estudo, foram observadas as freqüências das infecções fúngicas sangüíneas causadas pelo gênero *Candida* em 2 hospitais de indicação terciária da cidade de Fortaleza-Ceará, as quais são referências no tratamento de crianças no Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS) e de adultos no Hospital Geral Dr. César Cals (HGCC). Nesses hospitais, o gênero *Candida* foi o sexto (5,23%) e quarto (5,72%) agente etiológico isolado mais freqüente, respectivamente.

Vários autores relatam que a *C. albicans* é a principal espécie implicada nas infecções hospitalares sangüíneas, sendo responsável por mais de 50% das candidemias, seguida por *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, as quais mostram variedades de freqüência em diversas regiões do mundo (NGUYEN *et al.*, 1996; NUCCI *et al.*, 1998; REES *et al.*, 1998). Contrariando os achados destes autores, neste estudo, as espécies de *Candida* não-*albicans* foram predominantes, responsáveis por um total de 75% e 85% dos casos de fungemia no HGCC e HIAS respectivamente.

A *C. parapsilosis* foi a principal espécie envolvida em ambos os hospitais, seguida de *C. tropicalis* e *C. albicans* no HIAS, e de *C. albicans* e *C. tropicalis* no HGCC. Estes dados corroboram os indicadores de vários autores, nos quais a proporção das espécies de *Candida* não-*albicans* isoladas de hemoculturas de pacientes com candidemia, atualmente, se iguala ou se sobrepõe a *C. albicans* (MATSUMOTO *et al.*, 2002; SALDAR *et al.*, 2002; TORTORANO *et al.*, 2004), indicando, portanto, a importância desses levantamentos em diferentes hospitais, para melhor averiguação e conseqüente tratamento nos pacientes envolvidos.

Segundo LUPETTI *et al.* (2002), a espécie de *C. parapsilosis* é um patógeno exógeno produtor de alguns fatores como- aderência aos tecidos e produção de biofilmes (BERNARDIS *et al.*, 1999), que pode ter a capacidade de invadir direta ou indiretamente indivíduos imunossuprimidos. Tal situação pode ser induzida por uma prévia colonização de material sintético, como por exemplo, cateter venoso central. A *C. parapsilosis* pode ainda estar envolvida em quadros clínicos de onicomicose, sendo atualmente um dos agentes etiológicos

mais incidentes em casos de onicopatias da cidade de Fortaleza, e de outras partes do mundo (SEGAL *et al.*, 2000; JAUTOVA *et al.*, 2001; MEIRELES, 2004). Estes dados poderiam nos levar a fazer correlação com a possível fonte de infecção como- o contato das mãos de profissionais de saúde com pacientes em estado crítico submetidos a múltiplos procedimentos invasivos. Esta seria assim uma via de entrada destes patógenos em cateteres vasculares, próteses e soluções para administração parenteral, todos eles utilizados na manutenção de vida do paciente.

Apenas 43 de 83 pacientes no HIAS e 23 de 40 pacientes do HGCC possuíam histórias clínicas, com dados completos para serem analisados neste estudo. Foi observado que a idade dos pacientes com candidemia no HIAS variou de 0 a 3 anos de idade e, no HGCC a idade dos pacientes variou entre 0 e 76 anos. Estes dados foram similares aos estudos realizados por vários pesquisadores, cujas idades das populações estudadas variaram de 0 a 60 (COLOMBO *et al.*, 1999; RESENDE *et al.*, 2002; CHARLES *et al.*, 2003). Concordando com os dados da literatura, em sua maioria, os pacientes envolvidos neste estudo procederam das unidades de cuidados intensivos, sendo 19 de 21 pacientes do HGCC e 18 de 43 pacientes do HIAS oriundos desta mesma unidade (LEVY *et al.*, 1998; HUANG *et al.*, 1999, 2000).

Os fatores de risco analisados em ambos os hospitais de referência terciária foram antibioticoterapia, cateter venoso central, nutrição parenteral, ventilação mecânica, cirurgia, neoplasias e prematuridade, dados que corroboram os dos diversos autores (MATSUMOTO *et al.*, 2002; BENJAMIN *et al.*, 2003; GOLDANI *et al.*, 2003). Apesar de a literatura citar uma associação dos fatores de risco, como cateter venoso central e nutrição parenteral com a espécie de *C. parapsilosis*, não foi possível associar neste estudo esta relação, em virtude do número limitado da amostragem, que não permitiu uma análise estatística (LEVIN *et al.*, 1998; NUCCI *et al.*, 1998, 2000; MACDONALD *et al.*, 1998).

Em relação à conduta terapêutica, implementada nos pacientes internados em ambos os hospitais, foi observado que, no HGCC e no HIAS, a grande maioria dos pacientes não foi submetida a tratamento profilático antes da confirmação da candidemia, pois apenas 1 paciente do HGCC submeteu-se a profilaxia com fluconazol. Estes dados corroboram estudos realizados por NUCCI *et al.* (1998), e COLOMBO *et al.* (1999), os quais afirmam que a alta prevalência das espécies de *Candida* não-*albicans* no Brasil não está correlacionada ao uso profilático de derivados azólicos. REX *et al.* (2001) e MULLEN *et al.* (2003), acentuam, no entanto, que o

emprego profilático e empírico de drogas antifúngicas, especialmente, derivados azólicos, e o uso de procedimentos médicos invasivos têm sido implicados na emergência das espécies de *Candida não-albicans*.

Quanto ao tratamento antifúngico propriamente dito, implementado após a confirmação da candidemia, em ambos os hospitais, as dosagens utilizadas da anfotericina B e fluconazol nos pacientes estavam de acordo com a preconização da Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA) (REX *et al.*, 2000).

Estudos realizados por COLOMBO *et al.* (1999) observaram que cerca de 20% dos pacientes foram curados sem nenhum tratamento antifúngico. Neste estudo, foi observado que 3 pacientes do HIAS que não receberam tratamento antifúngico e evoluíram para alta tiveram a retirada das vias de acesso intravenoso. Com base nestas informações, provavelmente a instalação da *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* nos pacientes analisados poderia estar relacionada à presença de alguma via de acesso, portanto, não sendo necessário o tratamento com antifúngicos, em casos de retirada de tais fatores de risco. A remoção de cateteres intravenosos em pacientes pediátricos, entretanto, principalmente derivados de UTIs, nem sempre é possível, já que estes fatores são fundamentais para manutenção de vida desses pacientes (KARLOWICZ *et al.*, 2000).

Embora a *C. parapsilosis* não seja associada a altos índices de mortalidade, neste estudo, esta espécie de *Candida* foi a principal espécie associada em pacientes que evoluíram a óbito em ambos os hospitais estudados, sendo 2 pacientes com tratamento antifúngico e 5 sem tratamento antifúngico do HGCC e 6 pacientes com tratamento antifúngico e 2 sem tratamento antifúngico do HIAS (SAXEN *et al.*, 1995; WELBEL *et al.*, 1996; HUANG *et al.*, 1999, 2000). Apesar de *C. parapsilosis* ser considerada de baixa virulência quando comparada a outras espécies de *Candida*, mostrando baixa mortalidade em pacientes tratados com drogas antifúngicas (CHARLES *et al.*, 2003; GUDLAUGSSON *et al.*, 2003).

Diante do exposto, ficou claro que o incremento das infecções fúngicas durante as últimas décadas, junto com a aparição de resistência aos diversos antifúngicos disponíveis, fazem necessário o uso de técnicas para determinar a sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos, que permitem a correlação dos dados obtidos no laboratório com a evolução clínica dos pacientes.

Numa segunda fase deste estudo, foi realizado o teste de sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos das cepas de *Candida* spp., isoladas dos pacientes com quadros de candidemia estudados anteriormente. Foi observado que a distribuição da resistência das espécies de *Candida*

frente à anfotericina B foi de 4% e para os derivados azólicos, de 52%, 50% e 86% para fluconazol, itraconazol e cetoconazol, respectivamente. Estes dados corroboram vários estudos, em que os índices de resistência em relação à anfotericina B são baixos, embora existam relatos evidenciando resistência principalmente nas espécies de *Candida não-albicans* (ANDREU *et al.*, 1998; ELLIS *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2002).

Quanto aos derivados azólicos, vários pesquisadores enfatizam o decréscimo na sensibilidade das espécies de *Candida*, no mundo todo (NGUYEN *et al.*, 1996; CUENCA – ESTRELLA *et al.*, 2002). Assim, estudos realizados por Uzun *et al.* (2000) e por Cuenca-ESTRELLA *et al.* (2002) verificaram altos índices de resistência do itraconazol em relação ao fluconazol. Segundo WROBLEWSKA *et al.* (2002), estes índices são relacionados ao uso profilático com derivados azólicos, em que a profilaxia com derivados azólicos por longos períodos estaria associada a uma redução na sensibilidade a este antifúngico.

As espécies de *Candida não-albicans* vêm aumentando em número e resistência para anfotericina B e derivados azólicos, o que pode estar relacionado ao uso profilático com estes antifúngicos em pacientes suspeitos de candidemia (PFALLER *et al.*, 2000, 2002; CANUTO *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2003). Neste estudo, excetuando um paciente do HGCC que recebeu profilaxia com fluconazol, nenhum paciente recebeu tratamento profilático antes da candidemia, no entanto, todas as espécies de *Candida* apresentaram um alto índice de CIM. As principais espécies mais envolvidas nestes quadros de resistência *in vitro* frente a estes azólicos foram a *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Contrariamente, as espécies de *Candida não-albicans* são citadas como sensíveis aos derivados azólicos, principalmente, para o fluconazol, segundo estudos realizados no Brasil, em outros países da América Latina e na Tailândia (COLOMBO *et al.*, 2003; GODOY *et al.*, 2003; FOONGLADDA *et al.*, 2004).

Segundo estudos realizados por PFALLER *et al.* (1998, 1999, 2000) e KREMERY *et al.* (2002), as *Candida não-albicans*, em contraste com as espécies de *Candida albicans*, apresentam alta variabilidade em níveis de resistência aos antifúngicos em diversas regiões do mundo. Neste estudo, foi observada uma variabilidade, principalmente aos derivados azólicos pelas espécies de *Candida spp.*, estudadas.

Nesta pesquisa, foi observado que 12 cepas de *Candida spp.*, entre elas 7 espécies de *Candida não-albicans* e 5 *C. albicans* apresentaram resistência aos 3 derivados azólicos testados (fluconazol, itraconazol e cetoconazol) simultaneamente. Estes dados corroboram os estudos

realizados por WONG-BERINGER *et al.* (2001), CUENCA-ESTRELLA *et al.* (2002), os quais verificaram cepas de *Candida* não-*albicans* resistentes a mais de um derivado azólico. A resistência cruzada entre azólicos é fundamentada no fato, de terem um mecanismo de ação comum, atuando na via do citocromo P-450, enzimas mitocondriais que intervêm na desmetilação do C14 dos precursores do lanosterol (VAZQUEZ *et al.* 1997; MULLER *et al.*, 2000).

A falta de protocolos terapêuticos e dados clínicos dos pacientes, foi um obstáculo para o acompanhamento daqueles com candidemia relativamente à evolução e à conduta terapêutica implantada. Apesar destas limitações, conseguiu-se analisar a correlação entre a clínica do paciente frente aos testes de sensibilidade aos antifúngicos *in vitro* em cepas de *Candida* spp.

A relação entre a clínica e os testes de sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos não proporciona indicação de que as cepas sensíveis nestes testes possam estar associadas a uma evolução clínica favorável dos pacientes candidêmicos. Esta afirmação é baseada no fato de que, nos pacientes que foram a óbito e foram tratados com antifúngicos, os testes de sensibilidade *in vitro* apresentavam um índice de CIM baixo e os pacientes que não tiveram tratamento antifúngico e foram a alta apresentaram um índice de CIM alto. Estes dados confirmam os achados de REX *et al.*, (1995), que não encontraram nos seus estudos correlação entre CIM e evolução clínica dos pacientes com candidemia e, paradoxalmente, observaram mais fracassos terapêuticos em pacientes infectados por cepas com índices de CIM baixos. Contrariamente, estudos realizados por POWDERLY *et al.*, (1988), NGUYEN *et al.* 1998, KOVACICOVA *et al.*, (2001), evidenciaram, em pacientes portadores de câncer, correlação *in vitro* e *in vivo* com a anfotericina B. A discrepância de resultados demonstra a necessidade de mais estudos relacionando os dados *in vitro* com dados *in vivo* de pacientes candidêmicos e não aidéticos.

Outro fator preocupante nas infecções fúngicas é os episódios de recorrência. Existe grande dificuldade para diferenciar recorrência e re-infecção em pacientes cujos isolados foram identificados laboratorialmente como a mesma cepa envolvida. Assim, com o advento da biologia molecular, adquiriu-se capacidade de diferenciar genótipos pela presença de polimorfismos (FERNANDO *et al.*, 1998). Através destas técnicas SHIN *et al.* (2001), conseguiu caracterizar episódios de re-infecção em dos episódios de recorrência com intervalos de 4 dias entre um episódio do outro. Assim, segundo este mesmo autor, os quadros de recorrência e re-infecção não pode, ser diferenciada apenas pelo intervalo de tempo entre dois episódios, sendo fundamental as análises genótípicas para as respectivas diferenciações.

Neste estudo, a cariotipagem eletroforética realizada pela técnica do PFGE, permitiu que se distinguíssem 2 padrões com, respectivamente, 4 e 6 bandas cromossomiais em cepas de *C. parapsilosis* e 1 padrão em cepas de *C. tropicalis*. Estes dados estão de acordo com os estudos de ROY *et al.* (1998), BERNARDIS *et al.* (1999) e PERROTA *et al.* (2002), os quais verificaram que, pela cariotipagem eletroforética, uma variação de 7 a 9 bandas cromossômicas para *C. parapsilosis*.

Apenas um episódio de re-infecção foi detectado no terceiro episódio no paciente 4, causado por uma nova cepa de *C. parapsilosis*. Estes resultados corroboram os achados de DOI *et al.*, (1994), ESPINEL-INGROOF *et al.*, 1999, e SHIN *et al.* (2001), que observaram cariótipos eletroforéticos diferentes em pacientes re-infectados por uma mesma cepa de *C. parapsilosis* isoladas de hemoculturas.

Assim, neste estudo, esta técnica mostrou-se relativamente discriminatória para poder diferenciar cepas recorrentes de cepas com re-infecção. A existência de polimorfismo cromossômico, em cepas de *Candida*, isoladas de um mesmo paciente, já foi demonstrado por vários autores (MERZ *et al.*, 1988; KLEMPP-SELB *et al.*, 2000). A heterogeneidade de tamanho dos cromossomos homólogos é apontado como uma causa de polimorfismo (IWAGUCHI *et al.*, 1990).

Para confirmar o polimorfismo cromossômico, detectado pela cariotipagem eletroforética, encontrado no paciente 4 e detectar diferenças de cepas por meio do polimorfismo genômico, foi empregada a técnica do RAPD nas respectivas amostras. Por esta técnica utilizando a seqüência iniciadora OPA-03 foi possível observar um padrão predominante, denominado tipo I para a maioria das cepas de espécies de *C. parapsilosis*, mostrando ser esta uma técnica discriminatória para a classificação desta espécie.

Este método confirmou o polimorfismo cromossômico encontrado pela técnica do PFGE e além disso, permitiu a discriminação de mais 2 perfis genômicos (tipo II e III) nos pacientes 3 e 4 respectivamente. Adicionalmente, 2 perfis eletroforéticos diferentes não observados no estudo do polimorfismo cromossômico foram observados para a espécie de *C. tropicalis*. Estes dados, confirmam com outros autores quanto a eficácia e poder discriminatório da seqüência iniciadora OPA-03 (HANNULA *et al.*, 1997, 1999; PINTO *et al.*, 2004).

Assim a técnica do RAPD mostrou maior poder discriminatório, em comparação com a do PFGE, para poder diferenciar perfis genéticos de *C. parapsilosis*. A sensibilidade da técnica do

RAPD é confirmado por diversos autores utilizando outros iniciadores denominados OPA-04 e OPA-18 os quais conferem bons resultados discriminatórios. JAIN *et al.* (2001); MUÑOZ *et al.* (2003) e PINTO *et al.* (2004) indicam essa técnica como ideal para tipificação em estudos epidemiológicos de espécies de *Candida*.

A presença de diferentes perfis genômicos num mesmo paciente podem caracterizar quadros de re-infecção causada por novas cepas desta espécie. Os novos perfis genômicos da *C. parapsilosis* observados no último episódio podem indicar cepas mais virulentas desde que os pacientes envolvidos nesta infecção foram a óbito. O mesmo não se diz dos novos perfis genéticos encontrado na *C. tropicalis*, já que o paciente envolvido recebeu alta.

Neste estudo, foi evidenciada a presença do mesmo perfil genético de *C. parapsilosis* oriundo de 2 pacientes com recorrência, provenientes do HGCC, e 1 paciente oriundo do HIAS, caracterizando uma cepa endêmica. Este dado é digno de nota, evidenciando o fato de que tanto os pacientes hospitalizados como os funcionários da saúde podem ser importantes reservatórios de *Candida* spp., levando a correlacionar o foco da infecção com o possível contato das mãos de profissionais de saúde. Essa constante fonte de infecção poderia ser também responsável por episódios de super-infecção. A super-infecção é caracterizada por infecções sucessivas pela mesma espécie, quando ainda persistem os efeitos do primeiro episódio. Infelizmente neste estudo, não foi possível obter dados de evolução da infecção dos pacientes que diferenciem essas duas formas de infecção.

Quanto à resistência antifúngica, embora as cepas de *Candida* tenham apresentado resistência à anfotericina B (4%), fluconazol (50%), itraconazol (52%) e cetoconazol (86%), não se conseguiu fazer uma correlação com perfil cromossômico e genômico por estas serem representadas por apenas 1 cepa de cada perfil genômico. Por conseguintes, os do presente ensaio estão de acordo com a literatura, ao indicarem que a presença de variabilidade genética, relacionada aos rearranjos cromossômicos, não está necessariamente relacionada à resistência desta espécie (RUSTCHENKO-BULGAC *et al.*, 1990; BERENQUER *et al.* 1996; ZHANG *et al.*, 1997). LOTT *et al.* (1993) enfatizam que atualmente não existem relatos que relacionem a resistência aos antifúngicos nem a virulência das espécies de *Candida* spp., ao cariótipo nem ao perfil genético destas espécies. Por tanto, PEREPNIKHATKA *et al.* (1999) expresse que as desordens genéticas, tais como a não-disjunção cromossômica, em espécies de *Candida* spp. estejam relacionadas à resistência aos antifúngicos especialmente ao fluconazol.

Não foi também observada correlação entre a morfologia das cepas de *Candida* estudadas com relação a sua resistência aos antifúngicos e genotipagem. Estes dados corroboram os estudos de BARTON *et al.* (1994), ao assinalarem que as mudanças morfológicas e cariotípicas são processos independentes.

Por fim, os indicadores desta pesquisa corroboram vários estudos como os de VASQUEZ *et al.* (1991), ESPINEL-INGROFF *et al.* (1996) e BARCHIESI *et al.* (2001), indicam que a cariotipagem eletroforética pelas técnicas do PFGE e RAPD são suficientes para tipificar epidemiologicamente as espécies de *Candida*, por serem técnicas discriminatórias.

Espera-se que esta pesquisa, adicionada a outros estudos nesta área, utilizando a mesma metodologia, contribuam para a obtenção de um consenso sobre os perfis genômicos de cepas envolvidas em quadros de fungemia, podendo-se então, estabelecer uma relação dos perfis genômicos com patogenia, virulência e resistência aos antifúngicos.

5 CONCLUSÕES

A presente pesquisa demonstrou que:

- ✓ A emergência de *Candida não-albican*, especialmente a *C. parapsilosis*, como principal agente etiológico responsável pelos casos de candidemias nos 2 hospitais de referência terciária estudados em Fortaleza;
- ✓ Os fatores de risco associados nos casos de candidemia foram: antibioticoterapia prévia, cateter venoso central, nutrição parenteral, sondagem gástrica, ventilação mecânica, cirurgia e prematuridade;
- ✓ As espécies de *Candida* estudadas apresentaram baixo índice de resistência, para anfotericina B (4%) e alto índice de resistência para o fluconazol (52%), itraconazol (50%) e cetoconazol (86%) discordando assim dos dados encontrados em outros estudos brasileiros;
- ✓ Por intermédio das técnicas moleculares, foi evidenciada a presença de padrões endêmicos predominantemente nas duas unidades hospitalares para cepas da *C. parapsilosis*;
- ✓ As técnicas de Biologia Molecular de PFGE e RAPD foram discriminatórias para diferenciar quadros de recorrência de quadros de re-infecção, na tendo sido possível sua discriminação pelas técnicas laboratoriais convencionais.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABI-SAID, D.; ANAÏSSE, E.; UZUN, O.; RAAD, I.; PINZCOWSKI, H.; VARTIVARIAN, S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. **Clinical Infectious Diseases**, v.24, p. 1122-1128, 1997.

AL-JASSER A .M.; ELKHIZZI, N. A. Distribution of *Candida* species among bloodstream isolates. **Saudi Medical Journal**, v. 25, p. 566-569, 2004.

ALVES, S.H.; LOPES, J.O.; CURY, A .E. Teste de susceptibilidade aos antifúngicos: Por que, Quando, e Como Fazer. **NewsLab**, v.25, p. 140-147, 1997.

ANDREU, C.M.F.; MIRANDA, M.G.; ZARAGOZI, M.T.T. Determinación de la Concentración mínima inibitória de anfotericina B en leveduras de interés médico. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 58, p. 48-53, 1998.

BALKIS, M.M.; LEIDICH, S.D.; MUKHERJEE, P.K.; GHANNOUM, M. A . Mechanisms of fungal resistance: na overview. **Drugs**, v. 62, p. 1025-1040, 2002.

BARCHIESI F, D.I.; FRANCESCO, L.F.; ARZENI, D.; CASELLI, F.; SIMONETTI, O.; CELLINI, A.; GIACOMETTI, A.; OFFIDANI, A.M.; SCALISE, G. Electrophoretic karyotyping and antifungal susceptibility patterns of *Candida parapsilosis* clinical isolates causing deep and superficial fungal infections. **Mycopathologia**, v. 149, 117-121, 2001.

BARDAKCI, F. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. **Tukey Journal Biology**, v. 25, p. 185-196, 2001.

BARRY, A L.; PFALLER, M.A.; KNAPP, C.; RENNIE, R.P.; REX, J.H.; RINALDI, M.G. Quality Control Limits for Broth Microdilution Susceptibility Tests of Ten Antifungal Agents. **Journal of Clinical Microbiology**, v. p. 3457-3359, 2000.

BARRY, A L.; PFALLER, M.A.; KNAPP, C.; RENNIE, R.P.; Fuchs, P.C., Brown, S.D. Precision and Accuracy of Fluconazole Susceptibility Testing by Broth Microdilution, Etest , and

Disk Diffusion Methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 1781-1784, 2002.

BARTON, R.C.; SCHERER, S. Induced Chromosome Rearrangements and Morphologic Variation in *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, v.176, p. 756-763, 1994.

BEIJAN, C.; CLANCY, C.J.; HUYEN, M.H. Antifungal resistance in non-albicans *Candida* species. **Drug Resistance Updates**, v. 2, p. 9-14, 1999.

BENJAMIN, D.K.; GARGES, H.; STEINBACH, W.J. *Candida* bloodstream infection neonates. **Semin Perinatol**, v. 27, p. 375-383, 2003.

BERENGER, J.; DIAZ-GUERRA, T.M.; RUIZ-DIEZ, B.; BERNALDO DE QUIROZ, J.C.L.; RODRIGUEZ DE TUDELA, J.L.; MARTINEZ-SUAREZ, J.V. Genetic Dissimilarity of Two Fluconazole –Resistant *Candida albicans* Strains causing meningitis and oral candidiasis in the same AIDS Patient. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 1542-1545, 1996.

BERNARDIS, F.; MONDELLO, F.; SAN MILLÁN, R.; PONTÓN, J.; CASSONE, A . Biotyping and Virulence properties of Skin Isolates of *Candida parapsilosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 3481-3486, 1999.

BILLE, J. Mechanisms and clinical significance of antifungal resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.16, p. 331-333, 2000.

BLUMBERG, H.M.; JARVIS, W.R.; SOUCIE, J.M.; EDWARDS, J.E.; PATTERSON, J.E.; PFALLER, M.A .; RANGEL-FRAUSTO, M.S.; RINALDI, M.G.; SAIMAN, L.; WIBLIN, R.T.; WENZEL, R.P.; NEMIS Study Group. Risk Factors for Candidal Bloodstream Infections in Surgical Intensive care Unit patients: The NEMIS Prospective Multicenter Study. **Clinical Infectious Diseases**, v.33: p.177-186, 2001.

BODEY, G.P.; MARDANI, M.; HANNA, H.A.; BOKTOUR, M.; ABBAS, J.; GIRGAWY, E.; HACHEM, R.Y.; KONTOYIANNIS, .D.P.; RAAD, I.I. The epidemiology of *Candida glabrata*

and *Candida albicans* fungemia immunocompromised patients with cancer. **The American Journal of Medicine**, v. 112, p. 380-385, 2002.

BORDERON, J.C.; THERIZOL-FERLY, M.; SALIBE, E.; LAUGIER, J.; QUENTIN, R. Prevention of candida colonization prevents infections in a neonatal unit. **Biol Neonate**, v.84, p. 37-40, 2003.

BRION, J.P.; EGGIMANN, P.; GRILLOT, R.; HERBRECHT, R.; LORTHOLARY, O.; PITTET, D.; POULAIN, D.; SOLLET, J.P.; VOSS, A.; VERWEIJ, P.; WOLFF, M. Les candidoses systémiques. **1ère Journée InterDisciplinaire sur les Infections Fongiques (JIDIF)** Optimed Editions, Paris. 2001.

CANUTO, M.M.; & RODERO, G.F. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. **The Lancet Infectious Diseases**, v.2, p. 550-563, 2002.

CHARLES, P.E.; DOISE, J.M.; QUENOT, J.P.; AUBE, H.; DALLE, F.; CHAVANET, P.; MILESI, N.; AHO, L.S.; PORTIER, H.; BLETTERY, B. Candidemia in critically ill patients: difference of outcome between medical and surgical patients. **Intensive Care Medical**, v.29, n.12, p. 2162-2169, 2003.

CHEN, Y.; CHANG, S.C.; HSIEH, W.C.; LUH, K.T. In vitro antifungal susceptibilities of *Candida* species isolated from the blood. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 7, p. 217-222, 1996.

CHEN, Y.C.; CHANG, S.C.; LUH, K.T.; HSIEH, W.C. Stable susceptibility of *Candida* blood isolates to fluconazole despite increasing use during the past 10 years. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**; v.52, p.71-77, 2003.

COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; SALOMÃO, R.; BRANCHINI, M.L.M.; RICHTMANN, R.; DEROSI, A.; WEY, S.B. High rate of non-*albicans* in Brazilian tertiary care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 34, p. 281- 286, 1999.

COLOMBO, A .L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das \infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de medicina Tropical**, v. 36, p. 599- 607, 2003.

COLOMBO, A .L.; HAKAGAWA, Z.; VALDERATO, F.; BRANCHINI, M.L.; KUSSANO, E.J.; NUCCI, M. susceptibility profile of 200 bloodstream isolates of *Candida* spp. Collected from Brazilian teartinary care hospitals. **Medical Mycology**, v.41, p. 235-239, 2003.

COLOMBO A L. & ALVES S.H. Testes de sensibilidades aos antifúngicos. In: SIDRIM, J.J.C. & ROCHA M.F.G. **Micologia Médica à luz de autores contempor6aneos** 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 102- 111.

CUENCA –ESTRELLA, M.; RODERO, L.; GARCÍA-EFFRÓN, G.; ROGRIGUEZ-TUDELA, J.L. Antifungal susceptibilities of *Candida* spp. Isolated from blood in Spain and Argentina, 1996-1999. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.49, p.981-987, 2002.

DA SILVA, C.L.P.; SANTOS, R.M.R.; COLOMBO, A.L. Cluster of *Candida parapsilosis* primary bloodstream infection in a neonatal intensive care unit. **The Brazilian Journal Infectious Diseases**, v. 5, p. 32-36, 2001.

DASSANAYAKE, R.S.; SAMARANAYAKE, Y.H.; SAMARANAYAKE, L.P. Genomic diversity of oral *candida krusei* isolates as revealed by DNA fingerprinting and electrophoretic karyotyping. **APMIS**, v. 108, p. 697-704, 2000.

DATRY, A.; THELLIER, M.; TRAORÉ, B.; CISSÉ, O .A .; DANIS, M. Utilization des antifongiques dans le Traitement des Candidoses systémiques: antifongigramme, point sur les résistances, données pharmacologiques. **Ann Fr Anesth Réanim**, v. 20, p. 389-393, 2001.

DE BAULE, K. Itraconazole: pharmacology, clinical experience and future development. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 6, p.175-181, 1996.

DE PAUW, B.E. New antifungal agents and preparations. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.16, p. 147-150, 2000.

DIB, J.C.; DUBE, M.; KELLY C.; RINALDI, M.G.; PATTERSON, J.E. Evaluation of Pulsed Field Gel Electrophoresis as a Typing System for *Candida rugosa*: Comparison of karyotype and restriction fragment Length Polymorphisms. **Journal Clinical of Microbiology**, v.3, p. 1494-1496, 1996.

DOI, M.; HOMMA, M.; CHINDAMPORN, A .; TANAKA, K. Estimation of chromosome number and size by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) in medically important *Candida* species. **Journal General Microbiology**, v.138, p. 2243-2251, 1992.

DOI, M.; MIZUGUCHI, J.; HOMMA, M.; TANAKA, K. electrophoretic karyotypes of *Candida* yeasts recurrently isolated from single patients. **Microbiology Immunology**, v.38, p. 19-23, 1994.

ELLIS, D. Amphotericin B: spectrum and resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy Suppl. S1, 7-10, 2002.

ELLIS, M. Invasive Fungal Infections: evolving challenges for diagnosis and therapeutics. **Molecular Immunology**, v. 38, p. 947-957, 2002.

ELLIS, M.; HEDSTROM, U.; JUMAA, P.; BENER, A . Epidemiology, presentation, management and outcome of candidemia in a tertiary care teaching hospital in the United Arab Emirates. **Medical Mycology**, v.41, p. 521-528, 2003.

ESPINEL INGROFF, A .; QUART, A.; STECLE-MOORE, L.; METCHEVA, J.; BUCK, G. A .; BRUZZESE, V.L.; REICH, D. Molecular karyotyping of multiple yeast species isolated from nine patients with AIDS during prolonged fluconazole therapy. Journal of Medical & veterinary Mycology, v.34, p.111-116, 1996.

ESPINEL-INGROFF, A .; VAZQUEZ, J. A .; BOIKOV, D.; PFALLER, M. A . *Evaluation of DNA-based typing procedures for strain categorisation of Candida spp.* **Diagnostic Microbiology Infectious Diseases**, v. 33, p. 231- 239, 1999.

ESPINEL-INGROFF, A. Clinical Relevance of Fungal Suceptibility Testing and Antifungal Resistance. **Clinical microbiology Newsletter**, v. 22, p. 137-140, 2000.

FAIX RG, CHAPMAN RL. *Central nervous system candidiasis in the high-risk neonate.* **Semin Perinatol**, v.27, n. ,p. 384-392, 2003.

FARAH, S.B. **DNA Seqüências & Mistérios**. 1 ed. São-Paulo, Sarvier, 1999, p. 276.

FERNANDES, A .T.; OLIVIA, M.; FERNÁNDEZ, V.; RIBEIRO, N. F. **Infecção Hospitalar e sua interfaces na área de saúde**. São Paulo: Atheneu. 2000, v.1.

FERNANDO PH, SAMARANAYAKE LP. Chromosome length polymorphism in clinical isolates of *Candida parapsilosis*. **APMIS**, v. 106, p. 941-946, 1998.

FERREIRA, M.E & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genética**. 3 a edição. EMBRAPA. Edit. Applied Biosystems, p.220, Brasília, DF 1998.

FIERRO, F.; MARTÍN, J.F. molecular mechanisms of Chromosomal rearrangement in Fungi. **Critical reviews in Microbiology**, v.25, p.1-17, 1999.

FOONGLADDA S, SAKULMAIWATANA P, PETLUM P, VANPRAPAR N. *Candida species, genotypes and antifungal susceptibility of Candida isolates from blood samples of patients at the largest tertiary care hospital in Thailand during 1999-2002.* **Journal Medical Association Thailandia**,v. 87, p. 92-99, 2004.

FRASER, V.J.; DUNKEL, J.M.; JONES, M.; STORFER, S.; MEDOFF, G.; DUNAGAN, W.C. Candidemia in a Tertiary care hospital epidemiology, risk factors and predictors of mortality. **Clinical Infectious Diseases**, v.15, p. 414-421, 1995.

FRIDKIN, S. K.; JARVIS, W. R. Epidemiology of nosocomial fungal infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, p. 499-511, 1996.

GODOY, P.; TIRABOSCHI, I.N.; SEVERO, L.C.; BUSTAMENTE, B.; CALVO, B.; ALMEIDA, L.P.; DA MATTA, D.A.; COLOMBO, A. L. Species Distribution and Antifungal Susceptibility Profil of Candida spp. Bloodstream Isolates from Latin American Hospitals. **Memória do Instituto Oswaldo cruz**, v. 98, p.401-405, 2003.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L.B. Antifungal Agents: Mode of action, mechanisms of resistance and correaltion of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, p. 501-517, 1999.

GOLDANI, L.Z.; MARIO, P.S. Candida tropicalis fungemia in a tertiary care hospital. **Journal Infections**, v.46, p. 155-160, 2003.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A.M. Developments in Fungal taxonomy **Clinical Microbiology reviews** v.12, p. 454-500, 1999.

*GUDLAUGSSON , O.; GILLESPIE, S.; LEE, K.; VANDE BERG, J.; HU, J.; MESSER, S.; HERWALD, L.; PFALLER, M.; DIEKEMA, D. Attributable mortality of nosocomial candidemia revisited. **Clinical Infectious Diseases**, v.37, p. 1172-1177, 2003.*

*GUPTA N, MITTAL N, SOOD P. Candidemia in neonatal intensive care unit. **Indian Journal Pathology Microbiology**, v.44, n. 1, p. 45-48, 2001.*

*HAMAL, P.; KAPPE, R.; RIMEK, D. Rate of transmission and endogenous origin of Candida albicans and Candida glabrata on adult intensive care units studied by pulsed field gel electrophoresis. **Journal Hospital Infectious**. v. 49, n.1, p.37-42, 2001.*

HANNULA, J.; SAARELA, M.; ALALUUSUA, S.; SLOTS, J.; ASIKAINEN, S. Phenotypic and genotypic characterization of oral yeasts from Finland and the United States. *Oral Microbiology Immunology*, v. 12, p. 358-365, 1997.

HANNULA, M.S.; JOUSIMIES-SOMER, H.; TAKALA, A .; SYRJÄNEN, R.; KÖNÖNEN, E.; ASIKAINEN, S. Age-related acquisition of oral and nasopharyngeal yeast species and stability of colonization in young children. *Oral Microbial Immunology*, v.14, p. 176-182, 1999.

HOOG, G.S & GUARRO, J. **Atlas of Clinical Fungi**. Centra al bureau voor Schimmelcultures/ Universitat Rovira i virgili. 2001, p. 125-237.

HUANG, Y.C.; LIN, T.Y.; LEU, H.S.; PENG, H.L.; WU, J.H.; CHANG, H.Y. Outbreak of *Candida parapsilosis* fungemia in neonatal intensive care units: clinical implications and genotyping analysis. *Infection*, v. 27, p. 71-102, 1999.

HUANG, Y. C.; LIN, T. Y.; LIEN, R. I.; ET AL. Candidemia in special care nurseries: comparison of albicans and parapsilosis infection. *Journal Infections*, v. 40, p. 171-175, 2000.

IWAGUCHI, S .H.; HOMMA, H.; TANAKA, K. Variation in the electrophoretic Karuotype analysed by the assignment of DNA probes in *C. albicans*. *Journal Genetica Microbiology*, v.136, p.2433-2442, 1990.

JAUTOVA, J.; VIRAGOVA, S.; ONDRASOVIC, M.; HOLODA, E. Incidence of *Candida* species isolated from human skin and nails: a survey. *Folia microbiol (Praha)*, v. 46, n.4, p.333-337, 2001.

JAIN, P.; KHAN, Z.K.; BHATTACHARYA, E.; RANADE, S. A. Vriation in random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles specific to fluconazole-resistant and sensitive strains of *candida albicans*. *Diagnostic Microbiology Infectious Diseaes*, v. 41, p.113-119, 2001.

KARLOWICZ, M.G.; HASHIMOTO, L.N.; ROBERT, E.; ET AL. Should central venous catheters be removed as soon as candidemias is detected in neonates?. **Pediatrics**, v.106, p. 1-5, 2000.

KLEMPP-SELB, B.; RIMEK,D.; KAPPE, P. Karyotypin of *Candida albicans* and *Candida glabrata* from patients with *Candia* sepsis. **Mycoses**, v.43, p.159-163, 2000.

KOVACICOVA, G.; HANZEN, J.; PISERCIKOVA, M.; SEJNOVA, D.; HORN, J.; BABELA, R.; SVETLANSKY, D.; LOVASZOVA, H.; GOJOVA, M.; KREMEY, V. Nosocomial funemia pediatric patients after previous neurosurgery for brain tumors. **Journal Infectious Chemoterapy**, v. 7, p. 45-48, 2001.

KREMEY, V. Is there in vivo- in vitro correlation between antifungal susceptibility, species of Candida spp. And clinical outcome? International Journal of Antimicrobial Agents, v. 16, p. 537-539, 2000.

KREMEY, V. & BARNES, A . Non albicans *Candida* spp. Causing fungemia: pathogenicity and antifungal resistance. **Journal of Hospital Infection**, v. 50, p. 243-260, 2002.

LEBEAU, B & GRILLOT, R. **Antifongiques Systémiques**. In: BRYSKIER, A. Antibiotiques Agents Antibactéries et Antifongiques. Paris, 1999, p. 1105-1130.

LEONARD, S. J. Agentes Antimicrobianos. In: LEONARD, S.J. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara : Guanabara Koogan, 1999, p. 330-338.

LEVIN, A. S.; COSTA, S.F.; MUSSI, N.S.; BASSO, M.; SINTO, S.I.; MACHADO, C.; GEIGER, D.C.; VILLARES, M.C.B.; SCHREIBER, A .Z.; BARONE, A .A . BRANCHINI, M.L.M. C parapsilosis fungemia associated with implanatble and semi-implantable central venous catheters and the hands of health care workers. **Diagnostic Microbiology Infectious Diseases**, v. 30, p. 243-249, 1998.

LEVY I, RUBIN LG, VASISHTHA, S.; TUCCI, V.; SOOD, S.K. Emergence of *Candida parapsilosis* as the predominant species causing candidemia in children. **Clinical Infectious Diseases**, v. 26, p.1086-1088, 1998

LOPEZ SATRE, J.B.; COTO COTALLO, G.D.; FERNANDEZ COLOMER, B.; GRUPO DE HOSPITALES CASTILLO. Neonatal invasive candidiasis: a prospective multicenter study of 118 cases. **American journal Perinatol**, v.20, n.3, p. 153-163, 2003.

LOTT, T.J.; KUYKENDALL, R.J.; WELBEL, S.F.; PRAMANIK, A .; LASKER, B.A . Genomic heterogeneity in the yeast *Candida parapsilosis*. **Current Genetic**, v.23, p. 463-467, 1993.

LUPETTI A , TAVANTI A , DAVINI P, GUELARDI P.; GUELARDI, E.; CORSINE, V.; BOLDRENE, A .; CAMPO, M.; SINEAL, S. Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* Candidemia in a neonatal intensive care unit. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p.2363-2369, 2002.

MACDONALD, L.; BAKER, C.; CHENOWETH, C. Risk Factors for Candidemia in a Children`s Hospital. **Clinical Infectious Diseases**, v.26, p.642-645, 1998.

MAGADIA, R.R.; WEINSTEIN, M.P. Laboratory Diagnosis of Bacteriemia and Fungemia. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.15, p. 1-13, 2001.

MARCHETTI, O.; BILLE, J.; FLUCKIGER, U.; EGGIMANN, P.; RUEF, C.; GARBINO, J.; CALANDRA, T.; GLAUSER, M.P.; TAUBER, M.G.; PITTET. Fungal Infection Network of Switzerland Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. **Clinical Infectious Diseases**, v.38, n.3, p. 311-320, 2004.

MARTIN, M.V. The use of fluconazole and itraconazole in the treatment of *Candida albicans* infections: a review. **Journal of Antomicrobial Chemotherapy**, v. 44, p. 429-437,1999.

MATSUKO, D.; MIZUGICHI, I.; HOMMA, TANAKA K. Electrophoretic Karyotypes of Candida yeasts . Recurrently Isolated from Single patients. **Microbiolgy Immunology**, 38: 19-23, 1994.

MATSUMOTO, F.E.; GANDRA, R.F.; RUIZ, L.S.; AULER, M.E.; MARQUES, S. A .; PIRES, M.F.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R. Yeasts isolated from blood and catheter in children from a public hospital of São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v. 154, n.2, p. 63-69, 2002.

MCEWEN , J.G.; TAYLOR,, J.W.; CARTER, D.; FELIPES, M.S.S.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T.G.; KASUGA, T.; WHITE, T.; SOARES, M. A . Molecular Typing of pathogenic fungi. **Medical Mycology**, v.38, p. 189-197, 2000.

MEIRELES, T.E. **Aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais das onicomicoses em Fortaleza- Ceará**. Dissertação, 2004, p. 100

MERZ, W.G.; CONNELLY, C.; HIETER, P. Variation of electrophoretic karyotypes among clinica; isolates of C. albicans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, p. 842-845, 1988.

MILAN, E.P. & ZAROR, L. *Leveduras: Identificação laboratorial*. In: SIDRIM, J. J.C. & ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 89- 101

MOKADDAS, E.M.; RAMADAN, A.S.; ABO EL MAATY, S.H.; SANYAL, S.C. Candidemia in Pediatric surgery patients. **Journal of Chemotherapic**, v.12, n. 4, p. 332-338, 2000.

MONOD, M.; PORCHET, S.; BAUDRAZ-ROSSELET, F.; FRENK, E. The identification of pathogenic yeast strains by electrophoretic analysis of their chromosomes. **Jornal medical Microiology**, v.32, p. 123-129, 1990.

MUÑOZ, C.B.C.; BOLDO, X. M.; VILLA-TANACA, L.; RODRIGUEZ, H.C. Identification of *Candida* spp. By Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis and Differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by Direct PCR Methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 414-420, 2003.

MULLEN, C.A .; ABD EL-BAKI, H.; SAMIR, H.; TARRAND, J.J.; ROLSTON, K.V. Non – *albicans candida* is the most common cause of candidemia in pediatric cancer patients. **Support Care Cancer**, v.11, p. 321-325, 2003.

MULLER, F.C.; WEIG, J.P.; WALSH, T.J. Azole cross-resistance to ketoconazole, fluconazole, itraconazole and voriconazole in clinical *Candida albicans* isolates from HIV-infected children with oropharyngeal candidosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.46, p. 323-342, 2000.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved standards. Villanova, NCCLS, 2002. M27-A2.

NGUYEN, M.H.; PEACOCK, J.E., MORRIS, A. J.; TANNER, D.C., SNYDMAN, D.R.; WAGENER, M.M., RINALDI, M.G., YU, V.I. The changing face of Candidemia: Emergence of Non-*Candida albicans* Species and Antifungal Resistance. **The American Journal of Medicine** , v. 100, p. 617-623, 1996.

NGUYEN, M.H.; CLANCY, C.J.; YU, L.; YUE, C.; MORRIS, A. J.; SNYDMAN, D.R.; SUTTON, D. A.; RINALDI, M.G. Do In Vitro Susceptibility Data Predict the Microbiologic Response to Amphotericin B? Results of a Prospective Study of Patients with *Candida* Fungemia. **The Journal of Infectious Disease**, v.177, p.425-430, 1998.

NUCCI, M.; SILVEIRA, M. I.; SPECTOR, N.; SILVEIRA, F.; VELASCO, E.; AKITI, T.; BARREIROS, G.; DERUSSI, A.L.; PULCHERI, W. Risk factors for death among cancer patients with fungemia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, p. 107-11, 1998.

*NUCCI, M.; COLOMBO, A .L. Risk factors for breakthrough candidemia. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v.21, p.209-211, 2002.*

ODDS, F.C. Resistance of clinically important yeast to antifungal agents. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 6, p.145-147, 1996.

ODDS, F.C. Reflections on the question: What does molecular mycology have to do with the clinician treating the patient?. **Medical mycology**, v.41, p. 1-6, 2003.

*PAIXÃO, G.C; SIDRIM, J.J & BRILHANTE, R.S.N. Elaboração de Meios de Cultura em Micologia. In: SIDRIM, J.J.C. & ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos.1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 335-348.***

PEREPNIKHATKA, V.; FISCHER, F.J.; NIIMI, M.; BAKER, A .; CANNON, R.D.; WANG, Y.; SHERMAN, F.; RUSTCHENKO, E. Specific Chromosome Alterations in Fluconazole-resistant Mutants of *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, v.181, p. 4041-4049, 1999.

PERROTTA D, RODERO L, DEMKURA H, CANTEROS C, DAVEL G. Electrophoretic karyotypes and genomic DNA restriction fragment analysis: their usefulness as tools in the epidemiological study of *Candida parapsilosis*. **Revista Argentina de Microbiologia**, v.34 p.29-38, 2002

PFALLER, M. A .; BALE, M.; BUSCHELMAN, B.; LANCASTER, M. Quality Control Guidelines for National Committee for Clinical Laboratory standards recommended Broth Microdilution testing of Amphotericin B, Fluconazole, and Flucytosine. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 1104-1107, 1995.

PFALLER, M.A.; LOCKHART, S.R.; PUJOL, C.; SWAILS-WENGER, J.A.; MESSER, S.A.; EDMOND, M. B.; JONES, R. N.; WENZEL, R.P.; SOLL, D. R. Hospital Specificity , Region Specificity , and Fluconazole Resistance of *Candida albicans* Bloodstream Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 1518-1529, 1998.

PFALLER, M.A.; MESSER, S. A.; HOLLIS, R. J.; JONES, R. N.; DOERN, G. V.; BRANDT, M. E.; HAJJEH, R. A. Trends in species distribution and susceptibility to fluconazole among blood stream isolates of *Candida* species in the United States. **Diagnostic Microbiology Infectious Diseases**, v. 33, p. 217-222, 1999.

PFALLER, M.A.; MESSER, S. A.; HOLLIS, R. J.; JONES, R. N.; DOERN, G. V.; SADER, H. S.; HOUSTON, A .; COFFMAN, S.; AND THE SENTRY Participant Group. Bloodstream Infections Due to *Candida* Species: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in North America and Latin America, 1997-1998. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, p.747-751, 2000.

PFALLER MA, DIEKEMA DJ, JONES RN, MESSER SA, HOLLIS RJ; SENTRY PARTICIPANTS GROUP. Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 to 2000 **Journal Clinical Microbiology**, v.40, p. 852-856, 2002.

PINTO, P. M.; RESENDE, M. A .; KOGA-ITO, C.Y.; TENDLER, M. Genetic Variability among Clinical *Candida* spp. Isolates using Random Amplified polymorphic DNA. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, p. 147-152, 2004.

PITTEP, D.; LI, N.; WOOLSON, R.F.; WENZEL, R.P. Microbiological Factors Influencing the Outcome of Nosocomial Bloodstream Infections: A 6-Year Validated, Population-Based Model. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, p. 1068-1078, 1997.

POSTERANO, B.; ROMANO, L.; SANGUINETTI, M.; MASUCCI, L.; MORACE, G.; FADDA, G. Commercial systems for fluconazole susceptibility testing of yeasts. Comparison

with the broth microdilution method. **Diagnost Microbiology and Infectious Disease**, v. 38, p. 29-36, 2000.

POWDERLY, W.G.; KOBAYASHI, G.S.; HERZIG, G.P.; MEDOFF, G. Amphotericin B-Resistant Yeast Infection in severely Immunocompromised Patients. **The American Journal of medicine**, v. 84, p. 826-831, 1988.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janiero: Guanabara Koogan, 2001. p. 607-663.

REES, J.R.; PINNER, R.W.; HAJJCH, R.A.; BRANDT, M.E.; REINGGOLD, A.L. The Epidemiological Features of Invasive Mycotic Infections in the San Francisco Bay Area, 1992-1993: Results of Population-Based Laboratory Active Surveillance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, p. 1138-1147, 1998.

RENTZ, A. M.; HALPERN, M. T.; BOWDEN, R. The impact of candidemia on lenght of hospital stay, outcome, and overall cost of illness. **Clinical Infectious Diseases**, v.27, p. 781-788, 1998.

RESENDE, JC.; DE RESENDE M A.; SALIBA, J.L. Prevalence of Candida spp. In hospitalized patients and their risk factors. **Mycoses**, v.45, p. 306-312, 2002.

REX, J.H.; COOPER, C.R. JR.; MERZ, W.G.; GALGIANI, J.N.; ANAISSIE, E.J. Detection of amphotericin B-resistant Candida isolates in a broth-based system. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 39, p. 906-909, 1995.

REX, J.H.; PFALLER, M.A.; GALGIANI, J.N.; ET AL. Development of Interpretive Breakpoints for Antifungal Susceptibility Testing: Conceptual Framework and Analysis of In vitro – In vivo Correlation Data for Fluconazole, Itraconazole, and *Candida* Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v.24, p. 235-247, 1997.

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

REX, J.H.; SOBEL, J.D. Prophylactic Antifungal Therapy in the Intensive Care Unit. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 1191-1200, 2001.

REYES G.; GHANNOUM M.A. . Antifungal susceptibility testing of yeast: uses and limitations. **Drug Resistance Update**, v. 3, p.14-19, 2000.

ROCHA & SIDRIM. Drogas antifúngicas utilizadas na terapêutica contemporânea.. In: SIDRIM, J.J.C. & ROCHA, M.F.G. Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos.1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 50-61.

RODRIGUEZ, J.L.N. & MOREIRA, J.L.B. Infecções Fúngicas Nosocomiais. In: SIDRIM, J.J.C. & MOREIRA, J.L.B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 212-214.

RUSTCHENKO-BULGAC, E.P.; SHERMAN, F.; HICKS, J.M. Chromosomal Rearrangements Associated with Morphological mutants provide a Means for Genetic variation of *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, v.172, p. 1276-1283, 1990.

ROY, B.; MEYER, S.A. . Confirmation of the Distinct Genotype Groups within the Form Species *Candida parapsilosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.36, p. 216-218, 1998.

SALDAR, A.; PERLIN, D.S.; ARMSTRONG, D. Hematogenous infections due to *Candida parapsilosis*: changing trends in fungemic patients at a comprehensive cancer center during the last four decades. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 44, p. 11-16, 2002.

SANDVEN, P.; BEVANGER, L.; DIGRAES, A.; GAUSTAD, P.; AUCKLAND, H. H.; STEINBAKK, M.; THE NORWEGIAN YEAST STUDY GROUP. Constant low rate of fungemia in Norway, 1991 to 1996. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p. 3455-3459, 1998.

SANDVEN, Epidemiology of Candidemia. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.17, p.73-81, 2000.

SANGLARD, D. & ODSS, F.C. Resistance of Candida species to antifungal agents: Molecular mechanisms and clinical consequences. **The Lancet Infectious Diseases**, v.2, p. 73-85, 2002.

SAXEN, H.; VIRTANEN, M.; CARLSON, P.; HOPPU, K.; POHJAVUORI, M.; VAARA, M.; VUOPIO-VARKILA, J.; PELTOLA, H. Neonatal Candida parapsilosis outbreak with a high case fatality rate. **Pediatric Infectious Diseases Journal**, v. 14, n.9, p. 776-781, 1995.

SCHWARTZ, D.C. & CANTOR, C.R. Separation of yeast chromosome –sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, v.37, p. 65-67, 1984.

SEGAL, R.; KINCHI, A .; KRITZMAN, A .; INBAR, R.; SEGAL, Z. The frequency of candida parapsilosis in onychomycosis. An epidemiological survey in Israel. **Mycoses**, v.43, p. 349-353, 2000.

SHIN, J.H.; SHIN, D.H.; SONG, J.W.; KEE, S.J.; SUH, S.P.; RYANG, D.W. Electrophoretic karyotype analysis of sequential Candida parapsilosis isolates from patients with persistent or peccurrent fungemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 1258-1263, 2001.

SILVA, V.V.; DIAZ, M.C.; FEBRE, N.; E RED DE DIAGNÓSTICO EM MICOLOGIA MÉDICA. Vigilância de la resistência de leveduras a antifúngicos. **Revista Chilena de Infectologia** v.19 (supl) p.149-156, 2002.

SIDRIM, J.J.C. & ROCHA, M.F.G. *Candidíase*. In: SIDRIM, J.J.C. & ROCHA, M.F.G. *Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos.1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 265-274.*

TAYLOR, J.W.; GEISER, D.M.; BURT, A . KOFOPOUNOU, V. The evolutionay biology and population genetics underlying fungal strain typing. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, p. 126-146, 1999,

TORTORANO, A.M.; PAMAN, J.; BERNHARDT, H.; KLINGSPOR, L.; KIBBLER, C.C.; FAURE, O.; BIRAGHI, E.; CANTON, E.; ZIMMERMANN, K.; SEATON, S.; GRILLOT, R.; ECMM WORKING GROUP ON CANDIDAEMIA. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v.23, p. 317-322, 2004.

TRUBENOVA, D.; VIRAGOVA, S.; PILIPCINEC, E.; DANKO, J.; SVICKY, E.; TKACOKOVA, L. *Candidemia in cancer patients and in children in a neonatal intensive care unit.* **Folia Microbiol (Praha)**, v.46, p. 161-164, 2001.

UZUN, O. ; ARIKAN, S.; KOCAGEZ, S.; SANCAK, B.; UNAL, S. *Susceptibility testing of voriconazole, fluconazole, itraconazole and amphotericin B against yeast isolates in a Turkish University Hospital and effect of time of reading.* **Diagnostic Microbiology Infectious Diseases**, v.8, p. 101-107, 2000.

VAZQUEZ, J. A .; BECKLEY, A .; SOBEL, J. D.; ZERVOS, M.J. *Comparison of Restriction Enzyme Analysis and Puylsed –Field Gradient Gel Electrophoresis as Typing Systems for Candida albicans.* **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, p. 962-967, 1991.

VAZQUEZ JA, BOIKOV D, BOIKOV SG, DAJANI AS. *Use of electrophoretic karyotyping in the evaluation of Candida infections in a neonatal intensive-care unit.* **Infect ious Control Hospital Epidemiology**, v.18, p.32-37, 1997.

VIUDES, A .; CANTÓN, E.; PEMÁN, J.; LÓPEZ-RIBOT, J.L.; GOBERNADO, M. *Correlación entre las pruebas de sensibilidad in vitro a los antifúngicos y la evolución clínica de los pacientes con candidiasis y cryptococosis.* **Revista española deQuimioterapia**, v.15, p.1-13, 2002.

VOSS, A .; NOBLE, J. L.; VERDUYN LUNEL, F.M.; FOUORAINE, N.A .; MEIS, J.F. *Candidemia in intensive care unit patients: risk factors for mortality. Infection* v.25, p. 8-11, 1997.

WELBEL, S.F.; MCNEIL, M.M.; KUYKENDALL, R.J.; LOTT, T.J.; PRAMANIK, A .; SILBERMAN, R.; OBERLE, A .D.; BLAND, L.A .; AGUERO, S.; ARDUINO, M.; CROW, S.; JARVIS, W.R. *Candida parapsilosis bloodstream infections in neonatal intensive care unit patients: epidemiologic and laboratory confirmation of a common source outbreak. Pediatric Infectious Diseases Journal*, v.15, p. 998-1002, 1996.

WONG BERINGER, A.; HINDLER, J.; BRANKOVIC, L.; MUCHBAHUER, L.; STEDE-MOORE, L. *Clinical applicability of antifungal susceptibility testing on non-Candida albicans species in hospitalized patients. Diagnostic Microbiology Infectious Diseases*, v.39, p. 25-31, 2001.

WROBLEWSKA, M.M.; SWOBODA-KOPEC, E.; ROKOSA, A .; KRAWCZYK, E.; MARCHEL, H.; LUCZACK, M. *Epidemiology of clinical isolates of Candida albicans and their susceptibility to Triazoles. International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 20, p. 472-475, 2002.

ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M.; JAMES, M.J.; DEROSI, A .P.; SAMPAIO, J.L.M.; MUNIZ, M.M.; LI, R.K.; NASCIMENTO, A .S.A . PERALTA, J.M. REISS, E. *Strain characterization of Cândida parapsilosis. Fungemia by Molecular Typing Methods. European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases*, v.19, p. 514-5290, 2000.

ZHANG, J.; HOLLIS, R.J.; PFALLER, M.A . *Variations in DNA Sybtyping and Antifungal Susceptibility Among Clinical Isolates of Candida tropicalis. Diagnostic Microbiology Infectious Diseases*, v.27, p. 63-67, 1997.

ZOLAN, M.E. *Chromossome-Length Polymorphism in Fungi. Americam Society for Microbiology*, v. 59, p. 686-698, 1995.

7. ANEXO

7.1 ANEXO I
FICHA DE CADASTRAMENTO DO PACIENTE

Ficha de Cadastro do Paciente

Dados pessoais

Nome..... No de prontuário.....

Idade.....Sexo.....Data de internação.....

Data de saída.....Procedência.....

Motivo de Internação

.....

Fatores predisponentes

.....

.....

.....

Diagnóstico Laboratorial

.....

.....

Diagnóstico Final

.....

Conduta Terapêutica

.....

Evolução do paciente

.....

7.2 ANEXO II
FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS

AÇÚCAR	Pos 24 horas	Pos 48 horas	Negativo
Dextrose			
Sacarose			
Lactose			
Galactose			
Trealose			
Maltose			
Xilose			
Celobiose			
Rafinose			
Dulcitol			
Inositol			
Melibiose			
Inulina			
Ramnose			
L-arabinose			

Zimograma

AÇÚCAR	24 h	48 h	5 dias	10 dias	14 dias	Neg
Dextrose						
Maltose						
Lactose						
Galactose						
Trealose						
Sacarose						

Assimilação de Nitrato: () Pos () Neg

Produção de Ascospores

- Morfologia dos Ascospores e ascospores: () Elipsóides a reniformes
 () Subglobosos ou em chapéu
 () Globosos

Estoque

Laudo final: _____ Data do término da identificação: _____

Nº de coleção: _____ Data de estoque: _____

Estocado por: _____

Formas de estoque: () Ágar batata a - 20° C com glicerol
 () Solução salina com óleo mineral em ambiente
 () Outra: _____

**7.3 ANEXO III
MEIOS DE CULTURA**

MEIOS DE CULTURA USADOS EM MICOLOGIA (PAIXÃO *et al.*, 2004)

ÁGAR BATATA

OBJETIVO

Usado para realização de microcultivo de fungos filamentosos e estoque de cepas fúngicas.

COMPOSIÇÃO

Infusão de batatas	500 ml
Dextrose	10 g
Ágar bacteriológico	15 g
Água destilada q. s. p	1000 ml

PREPARO

Cozinhar 250 g de batata-inglesa (*Solanum tuberosum*) descascadas em 500 ml de água, por 1 h. Filtrar a infusão de batatas através de gaze. Restituir o volume inicial de água (500 ml) e acrescentar 500 ml de água destilada. Adicionar o ágar e a dextrose, dissolvendo-os completamente. Autoclavar o meio por 15 minutos à 121°C e distribuir, alíquotas de 4 ml, em tubos de vidro. Deixar solidificar, na posição inclinada, de modo a obter uma superfície de aproximadamente 6 cm.

Obs: Esse meio pode ser adquirido comercialmente, na forma desidratada, sob as denominações: Ágar batata (DIFCO), *Potato dextrose agar* (OXOID) e *Ágar Pomme-de-Terre* (Sanofi-Institut Pasteur).

CHROMAGAR CANDIDA[®]

OBJETIVO

Diferenciar espécies de *Candida*, baseando-se nas diferentes colorações adquiridas pelas colônias. Assim, por exemplo, colônias de *Candida albicans* são verde e *Candida tropicalis*, azul. Esse meio torna-se particularmente útil nos casos de infecção mista, facilitando a diferenciação das espécies envolvidas.

COMPOSIÇÃO

CHROMagar <i>Candida</i> [®] desidratado	47,7 g
Água destilada	1000 ml

Dissolver o CHROMagar *Candida*[®] em água destilada esterilizada, aquecendo em banho-maria, por 2 minutos. Distribuir em placas de Petri médias.

OBS: Esse meio não deve ser autoclavado.

** Esse meio é adquirido comercialmente, na forma desidratada, sob o nome de CHROMagar *Candida*[®] (CHROMagar[®] - PROBA

ÁGAR FUBÁ (CORN-MEAL) COM TWEEN 80

OBJETIVO

Utilizado para realização de microcultivo de leveduras, pois estimula a formação de pseudo-hifas das diferentes espécies de *Candida*, além de estimular a produção de clamidoconídios característicos de *C. albicans*.

COMPOSIÇÃO

Fubá de milho	40g
Ágar bacteriológico	20 g
Tween 80	12 ml
Água destilada q.s.p	1000 ml

PREPARO

Dissolver o fubá de milho em 500 ml de água, fervendo em banho-maria por 40 minutos; restituir o volume de água inicial. Deixar esfriar e filtrar através de gaze e algodão. Em um recipiente separado, dissolver o ágar nos 500 ml de água destilada restantes. Juntar o ágar dissolvido com o fubá e acrescentar o Tween 80. Homogeneizar. Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Distribuir em placas de Petri.

**Esse meio pode ser adquirido comercialmente, na forma desidratada, sob a denominação de *Agar Cornmeal* (DIFCO).

MEIO PARA ASSIMILAÇÃO DE CARBOIDRATOS (MEIO C)

OBJETIVO

Analisar a capacidade das leveduras em assimilar diferentes carboidratos.

COMPOSIÇÃO

Meio basal

Ágar bacteriológico	20 g
Água destilada q.s.p	1000 ml

Solução Estoque de Yeast Nitrogen base

Yeast nitrogen base (Difco)	6.7 g
Água destilada q.s.p	100 ml

PREPARO**Meio Basal**

Dissolver o ágar em água destilada, aquecendo-o em banho-maria. Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Distribuir alíquotas de 40 ml.

Solução Estoque de Yeast Nitrogen Base

Dissolver o Yeast nitrogen base em 100 ml de água destilada e deionizada; esterilizar por filtração. Distribuir alíquotas de 10 ml e estocar em frasco de cor âmbar na geladeira.

Preparo final do meio

Para cada alíquota de 40 ml do meio basal acrescentar 0.4 ml da solução estoque de Yeast Nitrogen Base. Atenção: só acrescentar a solução de Yeast nitrogen base quando o meio basal estiver com a temperatura aproximada de 48 °C.

MEIO PARA ASSIMILAÇÃO DE NITRATO**(Meio N)****OBJETIVO**

Testar a capacidade das leveduras em assimilar fontes inorgânicas de nitrogênio.

COMPOSIÇÃO

Yeast Carbon Base (DIFCO)	12 g
Ágar bacteriológico	20 g
Água destilada q.s.p	1000 ml

PREPARO

Dissolver por aquecimento o ágar e o Yeast carbon base em água destilada. Distribuir em frascos com alíquotas de 20 ml. Autoclavar a 121°C, por 15 minutos. Conservar a 4°C.

MEIO PARA FERMENTAÇÃO DE CARBOIDRATOS

OBJETIVO

Analisar a capacidade das leveduras em fermentar os diversos carboidratos.

COMPOSIÇÃO

Azul de bromotimol	0.03 g
Extrato de levedura	2.7 g
Peptona	4.5 g
Água destilada	600 ml
Etanol à 95%	1.8 ml

PREPARO

Dissolver o extrato de levedura e a peptona em água destilada. Separadamente, dissolver completamente o azul de bromotimol em etanol. Adicionar a solução de azul à mistura inicial e homogeneizar. Distribuir, 3 ml do meio, em tubos de ensaio contendo um tubo de Durhan na posição invertida. Autoclavar a 121°C, por 15 minutos. Deixar resfriar. Adicionar a cada tubo de ensaio, com o meio para fermentação, 1.5 ml de uma das soluções de açúcares utilizando pipetas estéreis. Homogeneizar. Conservar a 4°C por até um mês.

OBS: São os seguintes os carboidratos utilizados no teste de fermentação: maltose, dextrose, lactose, galactose, sacarose e trealose.

MEIO RPMI –MOPS**OBJETIVO**

Meio de cultura padronizado pelo NCCLS, para execução de testes de susceptibilidade a antifúngicos, através da técnica da microdiluição em caldo (documento M-27A aprovado em 1997).

COMPOSIÇÃO

RPMI 1640 (com glutamina e sem bicarbonato de sódio) *	10.5 g
MOPS	34.5 g
Cloranfenicol	0.5 g
Água destilada q.s.p	1000 ml

PREPARO

Dissolver os componentes em água destilada. Ajustar o pH final para 7.0 (com solução de hidróxido de sódio 10 N). Homogeneizar e esterilizar o meio por filtração. Manter, sob refrigeração, até o momento do uso.

* O meio RPMI 1640 é uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos e vitaminas, sendo quimicamente definido e livre de macromoléculas. Este meio é fornecido comercialmente, na forma desidratada, em pó ou líquido. Na forma de pó, tem a vantagem de se manter estável por mais de 24 meses, se conservado bem fechado e sob refrigeração. Por ser um pó extremamente higroscópico, deve ser bem protegido do meio ambiente, especialmente de lugares úmidos. Não são recomendadas preparações com concentrações maiores dos que as preconizadas pelo fabricante, devido a grande possibilidade de formação de precipitados.

**7.4 ANEXO IV
PROVBAS VIOQUÍMICAS**

Quadro 9.1 Identificação das principais leveduras de interesse clínico

LEVEDURAS	Assimilação															Fermentação						Cap	Tg	U	KNO ₃
	Inu	Ram	Ara	Gli	Sac	Lac	Gal	Raf	Ino	Xil	Cel	Tre	Dul	Mal	Mel	Gli	Sac	Lac	Gal	Tre	Mal				
<i>Candida albicans</i>	NT	NT	NT	+	V	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	G	-	-	V	G	G	-	+	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	-	NT	NT	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	V	G	G	-	V	G	G	-	-	-	-
<i>C. krusei</i>	NT	NT	NT	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	V	-	V
<i>C. parapsilosis</i>	-	NT	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	V	-	-	V	V	-	-	-	-	-
<i>C. pseudotropicalis</i>	+	NT	NT	+	+	+	V	+	-	V	V	V	-	V	-	G	G	G	G	-	-	-	-	-	-
<i>C. stellatoidea</i>	NT	NT	NT	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	G	-	-	-	-	G	-	+	-	-
<i>C. tropicalis</i>	NT	-	-	+	+	-	+	-	-	+	V	+	-	+	-	V	V	-	G	G	G	-	-	-	-
<i>C. zeylanoides</i>	NT	NT	NT	+	-	-	V	-	-	-	V	+	-	-	-	V	-	-	-	V	-	-	-	-	-
<i>C. lambica</i>	NT	NT	NT	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	V	-	-
<i>C. lipolytica</i>	NT	NT	NT	+	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	+
<i>C. lusitanae</i>	NT	+	NT	+	+	-	V	-	-	+	+	+	-	+	-	G	V	-	V	V	-	-	-	-	-
<i>C. rugosa</i>	NT	NT	NT	+	-	-	+	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. famata</i>	NT	NT	NT	+	V	V	+	+	-	+	V	V	+	+	V	V	V	-	-	G	V	-	-	-	-
<i>C. glabrata</i>	NT	NT	NT	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	G	-	-	-	G	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	NT	NT	NT	+	+	-	+	V	+	+	V	V	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	V
<i>C. albidus</i>	NT	NT	NT	+	+	V	V	V	V	+	+	V	V	+	V	-	-	-	-	-	-	V	-	+	+
<i>C. gastricus</i>	NT	NT	NT	+	V	V	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>C. laurentii</i>	NT	NT	NT	+	+	+	+	V	+	+	+	+	+	+	V	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>C. terreus</i>	NT	NT	NT	+	-	V	V	-	+	+	+	V	V	V	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
<i>C. luteolus</i>	NT	NT	NT	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>C. uniguttulatus</i>	NT	NT	NT	+	+	-	V	V	+	+	V	V	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Rhodotorula rubra</i>	NT	NT	NT	+	+	-	V	+	-	+	V	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	V	-	+	-
<i>R. glutinis</i>	NT	NT	NT	+	+	-	V	V	-	+	V	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	V	-	+	+
<i>Trichosporon inkii</i>	-	-	V	+	+	+	V	-	+	+	+	+	NT	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>T. ovoides</i>	-	+	V	+	+	+	+	V	+	+	+	V	NT	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NT	NT	NT	+	+	-	+	V	-	-	-	V	-	V	-	G	G	-	G	V	G	-	-	-	-
<i>Geotrichum candidum</i>	NT	NT	NT	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>G. capitatum</i>	NT	NT	NT	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hansenula anomala</i>	NT	-	NT	+	+	-	V	V	-	V	+	+	-	+	-	G	G	-	V	V	V	-	-	-	+

NT = não testado; G = produção de gás; + = positivo; - = negativo; V = variável; Inu = inulina; Ram = L-ramnose; Ara = L-arabinose; Gli = glicose; Sac = sacarose; Lac = lactose; Gal = D-galactose; Raf = rafinose; Ino = inositol; Xil = D-xilose; Cel = celobiose; Tre = trealose; Dul = dulcitol; Mal = maltose; Mel = melibiose; Cap = cápsula; Tg = tubo germinativo; U = urease; KNO₃ = nitrato de potássio.

**7.5 ANEXO V
BANCO DE DADOS**

Tabela 2 – Fatores Clínicos, epidemiológicos e laboratoriais de 23 pacientes com candidemia internados no HGCC.

Paciente	Idade (anos) /Sexo	Doenças de base	Procedimentos hospitalares	Cepa	Candida spp	Terapia antifúngica	Tempo de Tratamento	Doses	Evolução
^R 1	RN/ F	Prematuridade	B, E,G,K, N, O	CEMM 2-1-07	<i>C.parapsilosis</i>	-	-	-	-
				CEMM 2-1-08	<i>C.parapsilosis</i>	Anfotericina B	1dia	0,5mg/kg/dia	Óbito durante o tratamento
^R 2	56 /F	Doenças circulatórias	D,E,G,K,N	CEMM 2-1-09	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	-
				CEMM 2-1-10	<i>C. parapsilosis</i>	Fluconazol	1dia	400mg/dia	Óbito durante o tratamento
3	RN/ F	prematuridade	A, B, E, G, K, N, O	CEMM 2-1-11	<i>C.albicans</i> *	Não	-	-	Óbito
4	36/ F	complicações pós-parto	D, E, G, L, N, O	CEMM 2-1-12	<i>C. tropicalis</i>	Não	-	-	Alta
5	63/ F	doenças gastrointestinal	A, B, C, D, E, F, G, I, O	N,CEMM 2-1-15	<i>C.albicans</i>	Fluconazol	16dias	200mg/dia	Óbito durante o tratamento
6	28/ F	miscellaneous conditions	A, B, D, E, I, K, L, M, O	N,CEMM 2-1-32	<i>C.guilliermondii</i>	Não	-	-	Alta
7	RN/ M	prematuridade	A, B, D, E, G, K, N, O	CEMM 2-1-63	<i>C.albicans</i>	Anfotericina B	14dias	0,5mg/kg/dia	Óbito durante o tratamento
8	RN/ F	doenças respiratórias	D, E, G, N, O	CEMM 2-1-65	<i>C.albicans</i> *	Não	-	-	Óbito
9	62/ F	Doenças circulatórias	B, D, G, K,N, O	CEMM 2-1-66	<i>C.guilliermondii</i> *	Não	-	-	Óbito
^R 10	50/ F	doenças circulatórias	D,E,G,K,N,	CEMM 2-1-68 ^a	<i>C. parapsilosis</i>	Não	-	-	-
			D,E,,G, N	CEMM 2-1-68b	<i>C. parapsilosis</i>	Não	-	-	-
			D,G,K,N	CEMM 2-1-68c	<i>C. parapsilosis</i>	Não	-	-	Óbito
11	24/ F	complicações após cirurgia	A, B, E, G, K, L, N, O	CEMM 2-1-70	<i>C.tropicalisi</i>	Fluconazol	9dias	200mg/dia	Alta
12	RN/ F	doença gastrointestinal	A, B, D, E, G, F, I, K, N,	OCEMM 2-1-73	<i>C.tropicalis</i> *	Não	-	-	Óbito
13	RN/ F	prematuridade	A, B, E, K, O	CEMM 2-1-93	<i>C.albicans</i> *	Não	-	-	Óbito
14	49/ M	neoplasmas	A, B, C, D, E, F, G, N, O	CEMM 2-1-107	<i>C.glabrata</i>	Não	-	-	Alta
15	25/ M	doença gastrointestinal	A, B, C, D, E, G, H, N, O	CEMM 2-1-108	<i>C.parapsilosis</i>	Não	-	-	Óbito
16	RN/ F	Doenças infecciosas	D, E, N, O	CEMM 2-1-109	<i>C.parapsilosis</i> *	Não	-	-	Óbito
^R 17	RN/ F	prematuridade	A, B, C, D, N, O	CEMM 2-1-110	<i>C.parapsilosis</i>	Não	-	-	-
				CEMM 2-1-111	<i>C.parapsilosis</i>	Não	-	-	Óbito
18	76/ M	neoplasmas	B, C, D, E, G, J, K, N, O	CEMM 2-1-144	<i>C.tropicalis</i>	Fluconazol	12dias	200mg/dia	Alta
^R 19	52/M	neoplasmas	A, D, E, I, K	CEMM 2-2-145 ^a	<i>C.tropicalis</i>	Não	-	-	-
				CEMM 2-2-145b	<i>C.tropicalis</i>	Não	-	-	Alta
20	57/ M	doença gastrointestinal	A, B, C, E, K, L	CEMM 2-2-169	<i>C.tropicalis</i>	Fluconazol	9dias	200mg/dia	Alta
21	RN/ M	prematuridade	A, B, G, D, N, O	CEMM171	<i>C.albicans</i>	Anfotericina B	25dias	0,5mg/kg/dia	Alta
22	75/ F	neoplasmas	A, B, C, D, E, F, G, J, N, O	L,CEMM180	<i>C.parapsilosis</i> *	Não	-	-	Óbito
23	44/ M	doença gastrointestinal	A, B, D, G, L, N, O	CEMM 280	<i>C.albicans</i>	Fluconazol	13dias	200mg/dia	Óbito durante o tratamento

^R: pacientes com mais de um episódio de candidemia; * *post- mortem* ; RN: recém-nascido; A- nutrição parenteral; B- sondagem gastrica; C- colostomia; D- cirurgia; E- acesso venoso central; F-drenagem toraxica; G- ventilação mecânica; H- drenagem peritoneal; I- gastrostomia; J- hemodialises; K- hemotransfusão; L- sondagem vesical; M- drenagem abdominal; N- antibioticoterapia O- Unidade de Tratamento Intensivo (UTI).

Tabela 3 – Fatores Clínicos, epidemiológicos e laboratoriais de 43 pacientes com candidemia internados no HIAS.

Paciente	Idade (anos/sexo)	Doenças de base	Exposições hospitalares	Cepa	Candida spp	Terapia antifungal	Tempo de tratamento	Doses	Evolução
1	RN /F	Prematuridade	A, B, C, D,M	CEMM 2-1-69	<i>C. tropicalis</i>	Anfotericina B	12dias	0,5-1	Alta
2	RN /F	Mielomengocele rota	A, B, C, E	CEMM 2-1-35	<i>C. parapsilosis</i>	Não			Alta
3	RN /F	Prematuridade	A,B, C	CEMM 2-1-48	<i>C. tropicalis</i>	Anfotericina B	13dias	0,5	Alta
4	RN /M	Desconforto respiratório	A, B, C, D ,M	CEMM 2-1-73	<i>C. albicans</i>	Anfotericina B	2dias	0,5	Óbito
5	RN/ M	Ventriculites	A, B, C, D, E	CEMM 2-2-201	<i>C. parapsilosis</i>	Não			Alta
6	RN /F	Sepses	A, C, E, F,M	CEMM 2-2-205	<i>C. tropicalis</i>	Anfotericina B	3dias	0,5	Óbito
7	RN /M	Pós-operatóio	A, B, G, F, E,M	CEMM 2-2-207	<i>C. parapsilosis</i>	Fluconazol	1dia	6. 12	Óbito
8	RN/ F	Mielomengocele rota	A, B, E	CEMM 2-2-221	<i>C. parapsilosis</i>	Anfotericina B	13dias	0,5	Alta
9	RN /F	Mielomengocele rota	A,B,C,D,E,G,H	CEMM 2-2-222	<i>C. tropicalis</i>	Anfotericina B	6dias	0,5-1'	Óbito
10	RN /M	Mielomengocele rota	A,B,E	CEMM 2-2-239	<i>C. tropicalis</i>	Não			Alta
R ¹¹	RN /F	Desconforto respiratório	C, D,M	CEMM 2-2-240	<i>C. parapsilosis</i>	Anfotericina B	24dias	0,5	Alta
				CEMM 2-2-243	<i>C. parapsilosis</i>	Anfotericina B			Alta
12	RN /F	Prematuridade	B, C	CEMM	<i>C. tropicalis</i>	Anfotericina B	9dias	0,5	Óbito
13	RN /M	Mielomengocele rota	C, D, E, G	CEMM 2-2-262	<i>C. parapsilosis</i>	Anfotericina B	9dias	0,5	Óbito
			A, B, C,	CEMM 2-2-274					
14	RN /F	Prematuridade	D,G,F,M		<i>C. albicans</i>	Anfotericina B	21dias	0,5	Alta
15	C /M	Pneumoinia	A, B, C, D	CEMM-2-2-275	<i>C. parapsilosis</i>	Não	-		Alta
16	RN /M	Cardiopatia	A, C, D,M	CEMM 2-2-FIR	<i>C. parapsilosis</i>	Anfotericina B	7dias	0,5	Alta
17	RN /F	Prematuridade	A, B, C	CEM 2-2-KA	<i>C. parapsilosis</i>	Anfotericina B	6dias	0,5	Óbito
18	RN /F	Mielomengocele rota	B, E, F,M	CEMM 2—2	<i>C. parapsilosis</i>	Não	-		Óbito
19	RN /F	Atresia ileal	A, B, C, E, F, G	CEMM 2-2-VSS	<i>C. parapsilosis</i>	Anfotericina B	3dias	0,5	Óbito
20	RN /M	Desconforto respiratório	A, B, C, E, F	CEMM 2-2-ABS	<i>C. glabrata</i>	Anfotericina B	1dia	0,5	Óbito
21	RN/ F	Prematuridade	B, C, E,G	CEMM 2-2-MM	<i>C. parapsilosis</i>	Anfotericina B			Alta
22	RN /M	Diarréia	A, B, C, H	CEMM 2-2-IPS	<i>C. tropicalis</i>	Anfotericina B	11dias	0,5	Óbito
23	RN /M	Desconforto respiratório	A, B, C	CEMM 2-2-AGS	<i>C. parapsilosis</i>	Não			Óbito
24	RN /M	Prematuridade	A, B, D,M	CEMM 2-2-VCT	<i>C. albicans</i>	Anfotericina B	13dias	0,5	Óbito
25	RN /M	Infecção	A, B, C,D	CEMM 2-2LLS	<i>C. tropicalis</i>	Anfotericina B	23dias	1	Alta
26	RN /M	Prematuridade	A, C, D, E,F,M	CEMM 2-2-RRS	<i>C. parapsilosis</i>	Anfotericina B	3dias	0,5	Óbito
27	RN /M	Mielomengocele rota	A, B, E	CEMM 2-2-MHS	<i>Candida spp</i>	Não	-		Óbito
28	6m/ M	Diarréia	A, B, C, F	CEMM 2-2-33	<i>C. guilliermondii</i>	Anfotericina B	9dias	0,5	Alta
29	3m/ M	Tumor duodenal	A, B,E	CEMM 2--244	<i>C. tropicalis</i>	Anfotericina B	26dias	0,5-2	Alta
30	6m /F	Hipertensão	A,B,M	CEMM 2-1-90	<i>C. tropicalis</i>	Anfotericina B	60dias	0,5	Alta
31	3a/ M	Pós-operatório	C,B,D,E	CEMM 2-2-153	<i>C. albicans</i>	Anfotericina B		0,5-1	Alta
32	2m /F	Mielomengocele rota	A, B, D, E, H	CEMM 2-2-158	<i>C. guilliermondii</i>	Não	-		Alta
33	3m/ F	Desconforto respiratório	A, B, C	CEMM 2-2-159	<i>C. tropicalis</i>	Anfotericina B	20dias	0,5-1	Alta
34	1a8m/~M	Atresia ileal	A, B, E	CEMM 2-2-178	<i>C. tropicalis</i>	Fluconazol	13dias	200	Alta
35	1a6m /M	Tumor faringe	A, B, C, E, G	CEMM 2-2-202	<i>C. parapsilosis</i>	Anfotericina B	20dias	0,5	Óbito
36	1m ?M	Obstrução intstinal	L	CEMM 2-2-223	<i>C. parapsilosis</i>	Anfotericina B	25dias	0,5	Alta
				CEMM 2-2-235	<i>Rhodotorula rubra</i>	Anfotericina B	14dias	0,5	Alta
37	5m /F	Hidrocefalia	A, B, E		<i>C. parapsilosis</i>	Anfotericina B	12dias	0,5	Alta
38	1m /F	Retinoblastoma	A, B, C M	CEMM 2-2-242	<i>C. parapsilosis</i>	Anfotericina B	12dias	0,5	Alta
39	1a/ M	Neuroblastoma	A,B ,E, F	CEMM 2-2-251	<i>C. parapsilosis</i>	Anfotericina B	17dias	0,5	Alta
40	1m/ M	Hidrocefalia	A, B, C	CEMM 2-2-265	<i>C. tropicalis</i>	Anfotericina B	18dias	0,5	Óbito
41	5m /M	Hidrocefalia	A, B, C	CEMM 2-2-Mvn	<i>C. parapsilosis</i>	Não			Alta
42	3m/ F	Diarréia	A, B ,C, D	CEMM 2-2-FRF	<i>Candida spp</i>	Não			Óbito
43	6m/ M	Diarréia	A, B, C	CEMM 2-1-43	<i>C.tropicalis</i>	Anfotericina B	15dias	0,75-1	Alta

A- acesso venoso central; B- antibioticoterapia; C- sondagem gástrica; D- ventilação mecânica; E- cirurgia; F- hemotransfusão; G- nutrição parenteral; H- sondagem vesical; I- gastrostomia; J- esofagostomia; K- colostomia; L- gstroduodenoanastomose, M- UTI; R- paciente com vários episódios de candidemia; RN: recém-nascido, F: feminino, M: masculino

Tabela 12 Distribuição dos CIMs das *Candida* spp. oriundas de pacientes que evoluíram a óbito e cura frente aos antifúngicos testados.

Paciente	Cepa	Organismos	Tratamento	Evolução	Teste de sensibilidade <i>in vitro</i>			
					Fluconazol	Itraconazol	Cetoconazol	Anfotericina B

					CIM (ug/mL)	CIM (ug/mL)	CIM (ug/mL)	CIM (ug/mL)
1	CEMM 2-1-07	<i>C. parapsilosis</i>	Fluconazol	Óbito	>16	2	>16	1
	CEMM 2-108	<i>C. parapsilosis</i>	Fluconazol	Óbito	>16	2	>16	1
2	CEMM 2-1-8	<i>C. parapsilosis</i>	Fluconazol	Óbito	8	0,5	>16	1
	CEMM 2-1-9	<i>C. parapsilosis</i>	Fluconazol	Óbito	8	0,5	>16	1
3	CEMM 2-1-10	<i>C. albicans</i>	Não	Óbito	>64	2	>16	1
	CEMM 2-111	<i>C. albicans</i>	Fluconazol	Óbito	>64	0,5	>16	0,5
4	CEMM 2-115	<i>C. albicans</i>	Anfotericina B	Óbito	>64	>4	>16	1
5	CEMM 2-1-63	<i>C. albicans</i>	Não	Óbito	>64	0,5	>16	0,5
6	CEMM 2-165	<i>C. guilliermondii</i>	Não	Óbito	1	0,25	>16	1
7	CEMM 2-166	<i>C. parapsilosis</i>	Não	Óbito	2	0,25	>16	1
8	CEMM 2-168a	<i>C. parapsilosis</i>	Não	Óbito	2	0,125	>16	1
	CEMM 2-1-68b	<i>C. parapsilosis</i>	Não	Óbito	>64	>4	>16	4
	CEMM 2-1-68c	<i>C. parapsilosis</i>	Não	Óbito	8	2	>16	1
9	CEMM 2-1-108	<i>C. parapsilosis</i>	Não	Óbito	2	0,5	>16	1
10	CEMM 2-1-109	<i>C. parapsilosis</i>	Não	Óbito	1	0,5	>16	1
	CEMM 2-1-110	<i>C. parapsilosis</i>	Não	Óbito	2	0,5	>16	1
11	CEMM 2-1-111	<i>C. albicans</i>	Anfotericina B	Óbito	>64	4	>16	0,5
12	CEMM 2-1-173	<i>C. parapsilosis</i>	Não	Óbito	4	1	8	1
13	CEMM 2-1-180	<i>C. parapsilosis</i>	Anfotericina B	Óbito	2	1	>16	1
14	CEMM 2-1-202	<i>C. tropicalis</i>	Anfotericina B	Óbito	>64	0,5	>16	1
15	CEMM 2-1-205	<i>C. parapsilosis</i>	Anfotericina B	Óbito	2	0,01	>16	1
16	CEMM 2-2-207	<i>C. tropicalis</i>	Anfotericina B	Óbito	>64	>4	>16	1
17	CEMM 2-2-222	<i>C. guilliermondii</i>	Anfotericina B	Óbito	>64	1	>16	0,5
18	CEMM 2-2-236	<i>C. parapsilosis</i>	Anfotericina B	Óbito	16	0,5	0,5	1
19	CEMM 2-2-241	<i>C. tropicalis</i>	Anfotericina B	Óbito	>64	>4	8	1
20	CEMM 2-2-244	<i>C. tropicalis</i>	Anfotericina B	Óbito	>64	0,5	8	1
21	CEMM 2-2-265	<i>C. tropicalis</i>	Anfotericina B	Alta	>64	>4	8	1
22	CEMM 2-1-43	<i>C. albicans</i>	Anfotericina B	Alta	>64	>4	>16	1
23	CEMM 2-1-093	<i>C. albicans</i>	Anfotericina B	Alta	>64	>16	>4	1
24	CEMM 2-107	<i>C. glabrata</i>	Não	Alta	>64	>4	>16	1
25	CEMM 2-1-135	<i>C. parapsilosis</i>	Não	Alta	8	0,25	>16	1
26	CEMM 2-1-144	<i>C. tropicalis</i>	Fluconazol	Alta	>64	>4	1	1
27	CEMM 2-1-145a	<i>C. tropicalis</i>	Não	Alta	>64	>4	4	0,5
	CEMM 2-2-145B	<i>C. tropicalis</i>	Não	Alta	>64	>4	4	0,5
28	CEMM 2-2-1448	<i>C. tropicalis</i>	Anfotericina B	Alta	>64	>4	>16	1
29	CEMM 2-2-153	<i>C. albicans</i>	Anfotericina B	Alta	>64	0,125	>16	1
30	CEMM 2-2--154	<i>C. parapsilosis</i>	Não	Alta	8	0,25	>16	1
31	CEMM 2-2-1589	<i>C. tropicalis</i>	Anfotericina B	Alta	>64	>4	>16	1
32	CEMM 2-2-171	<i>C. albicans</i>	Anfotericina B	Alta	>64	1	>16	0,5
33	CEMM 2-2-178	<i>C. tropicalis</i>	Fluconazol	Alta	>64	2	1	0,5
34	CEMM 2-2-201	<i>C. parapsilosis</i>	Não	Alta	>64	0,06	0,5	1
35	CEMM 2-2-220	<i>C. parapsilosis</i>	Não	Alta	16	0,25	0,5	1
36	CEMM 2-2-221	<i>C. parapsilosis</i>	Anfotericina B	Alta	32	1	1	1
37	CEMM 2-2-223	<i>C. parapsilosis</i>	Anfotericina B	Alta	8	2	0,5	1
38	fev/39	<i>C. tropicalis</i>	Não	Alta	8	0,125	>16	0,5
39	CEMM 2-2-240	<i>C. parapsilosis</i>	Anfotericina B	Alta	16	>4	>16	1
	CEM 2-2-243	<i>C. parapsilosis</i>	Anfotericina B	Alta	8	0,5	0,5	1
40	CEMM 2-2-251	<i>C. parapsilosis</i>	Anfotericina B	Alta	>64	0,25	>16	>16
41	CEMM 2-2-262	<i>C. parapsilosis</i>	Anfotericina B	Alta	>64	0,06	0,5	1
42	CEMM 2-2-274	<i>C. albicans</i>	Anfotericina B	Alta	>64	0,125	>16	1
43	CEMM 2-2-275	<i>C. parapsilosis</i>	Não	Alta	8	0,06	>16	1

**CANDIDEMIA IN A BRAZILIAN HOSPITAL: THE IMPORTANCE OF *CANDIDA*
*PARAPSILOSIS***

DELIA JESSICA ASTETE MEDRANO^{1*}; RAIMUNDA SÂMIA NOGUEIRA BRILHANTE¹;
ROSSANA DE AGUIAR CORDEIRO¹; GERMANA ALVES CORSINO¹; MARCOS FÁBIO
GADELHA ROCHA²; SILVIA HELENA BAREM RABENHORST³; JOSÉ JÚLIO COSTA
SIDRIM¹.

¹ Department of Pathology and Legal Medicine, Faculty of Medicine, Medical Mycology Specialized Center, Federal University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil.

²Faculty of Veterinary, Post-Graduate Program in Veterinary Science, State University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil.

³ Department of Pathology and Legal Medicine, Faculty of Medicine, Genetic Laboratory, Federal University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil.

Author for correspondence: Rua Monsenhor Furtado s/n CEP 60 861- 200; Fortaleza- Ceará;
Brazil. Centro Especializado em Micologia Médica- DPML- Faculdade de medicina/
Universidade Federal do Ceará; **Fax:** (55) (85) 2142853, **Phone:** (55) (85) 2142853. E-mail:
deliaastete@yahoo.es ou sidrim@ufc.br

ABSTRACT

The aim of the present study was to perform a retrospective analysis of cases of candidemia in a Brazilian hospital in the city of Fortaleza, Ceará. A total of 50 blood cultures were analyzed from 40 candidemic patients. The mycological diagnosis was based on the phenotypical analysis and the patients' data were recorded in appropriate files. The most frequent species were *Candida parapsilosis* (n=18), followed by *C. albicans* (n=14), *C. tropicalis* (n=8), *C. guilliermondii* (n=6), *C. glabrata* (n=2), and *Candida* spp. (n=2). A detailed descriptive study was undertaken with 21 patients whose medical records were complete. The candidemia episodes occurred in 8 male patients and 13 female patients. The most representative risk factors implicated in candidemia were prior antibiotic therapy, central venous catheters, parenteral nutrition, gastric probes and mechanical ventilation. Death occurred in 13 of the 21-candidemic patients. This study demonstrated the emergence of candidemia caused by *C. parapsilosis* in a Brazilian hospital in the city of Fortaleza, Ceará.

Key words: Candidemia, *Candida* species, Epidemiology and *C. parapsilosis*.

INTRODUCTION

Candidemia is defined as a clinical illness associated with the presence of *Candida* in patients' bloodstream (1). In recent years, a progressive increase in the frequency of fungemia has been observed, particularly among patients receiving antibiotics, immunosuppressive therapy or parenteral nutrition, as well as among patients exposed to invasive medical procedures (2). *Candida* is the most important genus of yeast implicated in human infections, and is associated with almost 80% of all nosocomial fungal infections, representing the major cause of candidemia (3).

Candidemia is the fourth most common cause of hospital blood infection worldwide (4), being associated with extended hospital stays (5) and with high mortality rates among critically ill patients (6). The worldwide Candidemia rate has increased in many tertiary hospitals during recent decades (7).

Candida albicans is the main pathogen implicated in candidemia, being responsible for more than 50% of all *Candida* bloodstream infections in the USA, Canada and Europe (8, 9, 10). *C. glabrata* is the most important non-*albicans* species causative of human blood fungal infections in the USA (11, 12).

Brazilian reports have revealed that *C. albicans* is the main species implicated in candidemia (13, 14), and among the non-*albicans* species *C. parapsilosis* (15) and *C. tropicalis* (16, 17) are considered the most important pathogens. The emergence of non-*albicans* species as important agents of candidemia has been linked to a prophylactic or an empiric use of antifungal drugs (5).

The aim of this investigation was to perform a retrospective study of 21 candidemia cases in a reference hospital in Fortaleza, Ceará (Northeast Brazil), emphasizing the mycological and epidemiological aspects.

MATERIAL AND METHODS

This study was performed at a tertiary hospital in the city of Fortaleza-Ceará, Brazil. The study began by surveying all hemocultures processed by the hospital's microbiology laboratory from June 2000 to June 2002. During this period, 4.376 hemocultures were processed by the Bactec system (Becton Dickinson, Diagnostic Instrument Systems, Sparks, MD, USA).

From a total of 4.376 hemocultures examined, 50 yeast-positive materials were sent to the Medical Mycology Specialized Center at Federal University of Ceará, Brazil. For the yeast identification, the following tests were conducted: germinative tube test, microculture in *Cornmeal* com Tween 80 agar (DIFCO, Detroit), CHROMagar-Candida® (Company, Paris, France) growth, auxonogram, zimogram subcultures and nitrogen assimilation tests (18).

After laboratorial confirmation of *Candida* species involvement, an active search of medical records of each patient was performed. Information was collected about patients' age and gender, underlying disease, prior antimicrobial treatment and other possible predisposing factors. This study was conducted with qualitative analysis of mycologic and patient data.

RESULTS

From June 2000 to June 2002, 50 hemocultures from 40 candidemic patients were analyzed. *Candida* species were detected in all 50 yeast-positive hemocultures. As to the frequencies of these agents, *C. parapsilosis* (n=18) was the most prominent followed by *C. albicans* (n=14), *C. tropicalis* (n=8), *C. guilliermondii* (n=6), *C. glabrata* (n=2) and *Candida* spp. (n=2).

A total of 40 patients were evaluated for candidemia. Nevertheless, only 21 patients with available and complete medical records were enrolled in our research. The analysis of medical records from these patients revealed that 8 were male and 13 were female, that age ranged from 0 to 76 years old, with 9 newborn children and 12 adults. Candidemia episodes occurred mainly

in patients from intensive care units (19 cases). Two patients were referred from other Medical Care Centers (Table 1).

Of the 21 patients analyzed with positive *Candida* cultures, 10 presented only candidemia episodes, of which 3 suffered 2 recurrences (Table 1), 11 showed additional bacteremia episodes. Of these, 4 cases of candidemia were prior to bacteria isolation, while in 7 patients, bacteremia episodes preceded *Candida* isolation.

From analysis of 21 patients' records, it was considered that the most important coexisting exposures in candidemia development were prior antibiotic therapy (n= 18), central venous catheters (n= 17), parenteral nutrition (n= 15), gastric probes (n= 17), mechanical ventilation (n= 15) and surgery (n= 16). Each patient analyzed was subject to at least one risk factor.

The most important underlying diseases were Gastrointestinal disease (n=5), neoplasm (n=5) and prematurity (n=6). There were no differences in risk factors or underlying diseases in candidemia caused by *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*, and *C.albicans*. Therefore, *C. tropicalis* was infrequent among premature newborn children and *C. albicans* was the most frequent species among this patient group (Table 1).

Systemic antifungal drugs were used as prophylactic therapy before the occurrence of candidemia in only one patient (patient 20), with fluconazole (200mg per day) for 10 days. Even after confirmed candidemia, only 8 patients received antifungal treatment. Three candidemic patients (patient 1, 6, 19) were treated with amphotericin B (0,5- 1mg/ kg/ day) for 13 days and the remaining five patients (patients 4, 9, 16, 18, 21) were treated with fluconazol (150- 400 mg per day) for 12 days on average. The remaining 13 patients were not treated with antifungal drugs (Table 1).

Candidemia was responsible for the death of 13 out of the 21 patients. *C. albicans* was implicated in the death of 6 patients; *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* were responsible for the death of 5, 1 and 1 patients, respectively. Death occurred among 4 treated patients and 9 untreated ones (table 1).

DISCUSSION

It was found that all the fungal blood infections at the reference tertiary hospital were caused by yeast of the *Candida* genus. These data corroborate some studies in which species of *Candida* were the most involved in fungemia cases (3, 16).

Non-*albicans* species of *Candida*, upon analysis, would be responsible for a total of 72% of fungemia cases. Such data agree with the reports of some authors, who emphasize the importance of these species in recent years (3, 11, 16).

The growth of invasive medical procedures as well as prophylactic and empirical use of anti-fungal drugs, especially those of azolic derivation has been blamed for the emergence of non-*albicans* species of *Candida* (11, 19, 20). In the present study, there was a large increase in these species, coming from patients subjected to multiple invasive procedures in Intensive Care, who were not submitted to any azolic derivative as prophylaxis, with the exception of one patient subjected to prophylactic treatment with Fluconazole. According to studies performed by Colombo et al. (13) and Nucci et al. (16), the non-*albican* species of *Candida* are the most prevalent in Brazil, this fact not being correlated with the use of azolic prophylactic derivatives.

It was noted that the main species involved was *C. parapsilosis*, followed by *C. albicans*. This is a noteworthy fact, given that some authors such as, Rees et al. (21) consider *C. albicans* the predominant species, responsible for around 50% of candidemias. Our data match that of several authors (15), according to whom the proportion of isolated non-*albicans* species of *Candida* in hemocultures is currently equal or superior to *C. albicans*.

C. parapsilosis is an exogenous pathogen, which prefers to colonize synthetic surfaces, glucosilated solutions and skin (22). According to studies, this species of *Candida* is identified in most cases of Onychomycosis in fingernails (23, 24). Thus, it is probable that infections by *C. parapsilosis* in our study arose as a result of direct contact between healthy professionals and patients in a critical state, subjected to multiple invasive procedures. This would be one access route for these pathogens in vascular catheters; prosthetics and solutions for parenteral administration, all used for patient life support.

A large incidence of candidemia (n=19) was found in patients from Intensive Care Units (ICU). Such high rates of fungal infection in ICUs corroborate the findings of several authors (6,

14), where there are high incidences of patients from these units. These data may be explained by the fact that these patients usually are considered high risk, depending on life support, thus subject to multiple invasive procedures which make them more susceptible to a rapid microbial invasion.

It was observed during this study that the presence of candidemia cases associated with episodes of bacteremia was considerable (n=11), especially when the bacteremia preceded candidemia. These data may be considered a new risk factor, according to Ellis et al. (25), due to indiscriminate use of antibiotics in high-risk patients.

The risk factors assessed in our study are also quoted by several authors, (2, 17, 26). It was seen that prior antibiotic treatment, central venal access, parenteral nutrition, surgery, mechanical ventilation and gastric catheterization were all associated with candidemias.

From the therapeutic point of view, it was observed that, of the 21 patients, 13 were not treated with any antifungal agent. Of these 13, 7 patients died before the mycological diagnosis.

In this study, 13 patients died from the total of 21 analyzed. These data corroborate those found in several studies in which cases of nosocomial candidemia is associated with high mortality (6, 27).

Species which showed highest mortality rates were *C. albicans* (n=6) and *C. parapsilosis* (n=5). However, Huang et al. (22) report that *C. parapsilosis* shows high involvement in cases of mortality and morbidity, especially in neonates. In our study, cases of mortality as a result of this agent were observed in untreated patients, who were diagnosed at a late stage. *C. parapsilosis* is considered to have low virulence when compared with other species of *Candida*, showing low mortality in patients treated, involving removal of specific risk factors, such as removal of catheter – main path of contamination of this species.

This study shows that among all the found yeast, *C. parapsilosis* was the main isolated agent. Thus, this research evidences the importance of *C. parapsilosis* in candidemia episodes in Brazilian tertiary care hospital from Northeast Brazil.

Acknowledgements

This study was supported by grants from FUNCAP (Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior). We thank Ms. G.C. Paixão for technical support (Department of Pathology and Legal Medicine, Faculty of Medicine, Medical Mycology Specialized Center, Federal University of Ceará, Brazil).

REFERENCES

1. Safdar A , Perlin DS, Armstrong D (2002) Hematogeneous infections due to *C. parapsilosis*: changing trends in fungemic patients at a comprehensive cancer center during the last four decades. *Diagn Microbiol Infect Dis* 44: 11-16.
2. Voss A, Noble JL, Verduyn Lunel FM, Foudraire NA, Meis JF (1997) Candidemia in intensive care unit patients: risk factors for mortality. *Infection* 25: 8-11.
3. 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.
4. Sandven P, Bevanger L, Asbjorn D, Gaustad P, Haukland H H, Steinbakk M and The Norwegian Yeast (1998). Constant low rate of fungemia in Norway, 1991 to 1996. *J Clin Microbiol* 36:3455-3459.

5. Sidrim JJC and Rocha MFG. Candidíase. In: Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos. Eds, JJC Sidrim and MFG Rocha. 2004, pp: 265-74. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
6. Charles PE, Doise JM, Quenot JP, Aube H, Dalle F, Chavanet P, Milesi N, Aho LS, Portier H, Blettery B (2003). Candidemia in critically ill patients: difference of outcome between medical and surgical patients. *Intensive Care Med* 29: 2162- 2169.
7. Sandven P (2000). Epidemiology of Candidemia. *Rev Iberoam Micol* 17: 73-81.
8. Rentz AM, Halpern MT, Bowden R (1998) The impact of candidemia on length of hospital stay, outcome, and overall cost of illness. *Clin Infect Dis* 27: 781-788.
9. Rodriguez JLN and Moreira JLB. Infecções Fúngicas Nosocomiais. In: Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica. Eds JJC Sidrim and JLB Moreira, 2004, pp: 212-4. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan.
10. Marchetti O, Bille J, Fluckiger U, Eggimann P, Rued C, Garbino J, Calandra T, Glauser MP, Tauber MG, Pittet D; Fungal Infection Network of Switzerland (2004) Fungal Infection Network of Switzerland Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. *Clin Infect Dis* 38: 311-320.
11. Nguyen MH, Peacock JE Jr, Morris AJ, Tanner DC, Nguyen ML, Snyderman DR, Wagener MM, Rinaldi MG, Yu VL (1996) The changing face of candidemia: emergence of *non-Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am J Med* 100: 617- 623.

12. Bodey GP, Mardani M, Hanna HA, Boktour M, Abbas J, Girgawy E, Hachem RY, Kontoyiannis DP, Raad II (2002) The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* fungemia immunocompromised patients with cancer. *Am J Med* 112:380-385.
13. Colombo AL, Nucci M, Salomao R, Branchini ML, Richtmann R, Derossi A, Wey SB (1999) High rate of non-albicans in Brazilian tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 34:281- 286.
14. Resende JC, de Resende MA, Saliba JL (2002) Prevalence of *Candida* spp. in hospitalized patients and their risk factors. *Mycoses* 45: 306-312.
15. Matsumoto FE, Gandra RF, Ruiz LS, Auler ME, Marques AS, Pires MF, Gambale W, Paula CR (2002) Yeasts isolated from blood and catheter in children from a public hospital of São Paulo, Brazil. *Mycopathologia* 154: 63-69.
16. 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 câncer patients with fungemia. *Clin Infect Dis* 27:107-111.
17. Goldani LZ, Mario PS (2003) *Candida tropicalis* fungemia in a tertiary care hospital. *J Infect* 46:155-160.
18. Milan EP, and Zaror L. Leveduras: identificação laboratorial. In: *Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos*. Eds, JJC Sidrim and MFG Rocha, 2004 pp: 89-101. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

19. Mullen CA, Abd El-Baki H, Samir H, Tarrand JJ, Rolston KV (2003) Non-*albicans* *Candida* is the most common cause of candidemia in pediatric cancer patients. Support Care Cancer 11: 321-325.
20. Rex JH, Sobel JD (2001) Prophylactic antifungal therapy in the intensive care unit. Clin Infect Dis 32:1191-1200.
21. Rees JR, Pinner RW, Hajjeh RA, Brandt ME, Reingold AL (1998) The epidemiological features of invasive mycotic infections in the San Francisco Bay Area, 1992-1993: Results of Population-Based Laboratory Active Surveillance. Clin Infect Dis 27: 1138-1147.
22. Huang Y C, Lin T Y, Lien R I, Chou Y H, Kuo C Y, Yang P H (2000) Candidemia in special care nurseries: comparison of *albicans* and *parapsilosis* infection. J Infect 40: 171-175.
23. Gautret P, Rodier MH, Kauffmann-Lacroix C, Jacquemin JL (2000) Case report and review. Onychomycosis due to *Candida parapsilosis*. Mycoses 43: 433- 435.
24. Segal R, Kimchi A, Kritzman A, Inbar R, Segal Z (2000) The frequency of *Candida parapsilosis* in onychomycosis. An epidemiological survey in Israel. Mycoses 43:349-353.
25. Ellis M, Hedstrom U, Jumaa P, Bener A (2003) Epidemiology, presentation, management and outcome of candidemia in a tertiary care teaching hospital in the United Arab Emirates, 1995-2001 Med Mycol 41: 521-528.

26. Nucci M, Colombo AL (2002) Risk factors for breakthrough candidemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 21: 209-211.

27. Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S, Herwaldt L, Pfaller M, Diekema D (2003) Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis* 37:1172-1177.

The emergence of *Candida parapsilosis* in a Brazilian Children's Hospital

DELIA J. ASTETE MEDRANO¹; RAIMUNDA S. NOGUEIRA BRILHANTE¹; ROSSANA A. CORDEIRO^{1,5} MARCOS F. GADELHA ROCHA²; VAULICE SALES CAFÉ⁴; SILVIA H. BAREM RABENHORST³; JOSÉ J.COSTA SIDRIM¹.

¹Department of Pathology and Legal Medicine, Faculty of Medicine, Medical Mycology Specialized Center, Federal University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil.

² Faculty of Veterinary, Post-Graduate Program in Veterinary Science, State University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil.

³Department of Pathology and Legal Medicine, Faculty of Medicine, Genetic Laboratory, Federal University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil.

⁴ Department of Pathology and Legal Medicine, Faculty of Medicine, Microbiology Laboratory, Federal University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil.

⁵ Curso de Ciencias Biologicas, Centro de Ciencias da Saude, Universidade Estadual do Ceara.

Author for correspondence: Delia Jéssica Astete Medrano, Rua Dr. Jose Lino, 673; Varjota; Fortaleza- Ceará; Brazil. CEP: 60165-270; Fax: (55)(85)214 - 2853, Phone: (55)(85) 8801-3734

E-mail: deliaastete@yahoo.es or sidrim@ufc.br

ABSTRACT

Background. Nosocomial fungal infections, especially caused by *Candida* spp. has increased in many children's hospitals during the last decades worldwide. The aim of the present study was to do a retrospective analysis of cases of fungemia in a Brazilian reference children's hospital in the city of Fortaleza, Ceará, Brazil.

Methods. The mycological diagnosis was based on the biochemical analysis and the patients' data were recorded in appropriate files.

Results. A total of 87 blood cultures were analyzed from 83 children's patients. The most frequent species were *Candida parapsilosis* (n=39), followed by *C. tropicalis* (n=23), *C. albicans* (n=13), *C. guilliermondii* (n=4), *C. glabrata* (n=2), *Candida* spp. (n=4) and *Rhodotorula rubra* (n=2). A detailed descriptive study was accomplished with 43 patients whose medical records were available. The most representative risk factors implicated in candidemia were: prior antibiotic therapy, central venous catheters, gastric probes and ventilation mechanics, prematurity. Death occurred in 17 of the 43 children's patients, being the most implicated species *C. parapsilosis* (n=8) and *C. tropicalis* (n=5).

Conclusion. This study shows that among all the found yeast, *C. parapsilosis* was the main isolated agent. Thus, this research evidences the importance of *C. parapsilosis* in candidemia episodes in Brazilian tertiary care infant hospital from Northeast Brazil.

Key-words: Candidemia, *Candida* species, Epidemiology and *C. parapsilosis*

INTRODUCTION

Nosocomial fungal infections, especially caused by *Candida* spp. has increased in many children's hospitals during the last decades worldwide (Mokaddas et al. 2000; Chapman et al 2003). A progressive increase in the frequency of fungemia has been observed as an important cause of morbidity and mortality in critically ill patients and neonate exposed to invasive medical procedures (Benjamin et al. 2003; Faix et al. 2003).

Newborns may acquire *Candida* species secondary to either vertical or horizontal transmission (Chapman et al. 2003), the latter is the main cause of hospital blood infection worldwide in children (Lupetti et al. 2000), being associated with extended hospital permanence (Sidrim & Rocha, 2004) and high mortality and morbidity rates (Saxen et al. 1995).

Candida albicans is still considered the most frequently isolated species from candidemic patients (Rodriguez and Moreira 1999; Lopez et al. 2003; Marchetti et al. 2004). However, many reports have documented the emergence of *C. parapsilosis* (Levy et al. 1998), *C. tropicalis*, *C. glabrata* (Gupta et al 2001) and *C. krusei* (Truvenova et al. 2001) as important causes of blood fungal infections in pediatric patients worldwide.

Brazilian reports revealed that *C. parapsilosis* is the main species implicated in candidemia in children patients in the south of the country (Da Silva et al. 2001; Matsumoto et al. 2002), followed by *C. albicans*.

The aim of our work was to perform a retrospective study of 43 candidemia cases in a reference children's hospital in Fortaleza, Ceará (Northeast, Brazil), analyzing the causative etiological agents and the patient population involved.

MATERIAL AND METHODS

From a total of 8500 patients were identified 83 patients with fungemia from June 2001 to June 2002 at a tertiary children's Hospital in the city of Fortaleza-Ceará, Brazil.

All fungal blood culture isolates were identified by routine methods at Medical Mycology Specialized Center (Federal University of Ceará, Brazil): germinative tube test, microculture in *Corn-meal*-Tween 80 agar (Difco, Detroit), CHROMagar-Candida® (Company, Paris, France) growth auxonogram, zimogram subcultures and nitrogen assimilation tests (Milan and Zaror 2004).

Cases of fungemia were studied about patients' age and gender, underlying disease, prior antimicrobial treatment and other possible predisposing factors. This study was conducted with qualitative analysis of mycologic and patient data of 43 patients.

RESULTS

From June 2001 to June 2002, 87 hemocultures from 83 patients were analysed. *C. parapsilosis* (n=39) was the most prominent species, followed by *C. tropicalis* (n=23), *C. albicans* (n=13), *C. guillermondii* (n=4), *C. glabrata* (n=2), *Candida* spp.(n=4) and *Rhodotorula rubra* (n=2).

Only 43 of 83 patients with available and complete medical records were enrolled in our research. Took part in this study, 23 male and 20 female, among them 18 newborns (< 1 month), 8 were premature and 17 children (>1 month).

Fungemia episodes occurred mainly in patients submitted to intensive care units (n=18) from which, 2 were newborns, 8 premature and 8 children. The present species in this unit were *C. parapsilosis* (n=9), *C. tropicalis* (n=5), *C. albicans* (n=3) and *Candida* spp (n=1). The remaining patients (n=25) came from other medical areas.

From analysis of 43 patient's records (table 1), it was considered that the most important coexisting exposures in candidemia development were: central venous catheters (n=38), prior antibiotic therapy (n=35), gastric probes (n=29), surgery (n=22), mechanic ventilation (n=14),

and parenteral nutrition (n=7). Each patient analysed could have one or more coexisting exposures. Among the most important underlying disease were: neurological disease (n=11), gastrointestinal disease (n=7), prematurity (n=8), respiratory disease (n=6) and embryonic tumor (n=4). There were differences in risk factors in candidemia caused by *C. parapsilosis*, which showed more incidence compared with *C. tropicalis*, and *C. albicans* (Table 1).

Antifungal drugs were not used as prophylactic therapy before the occurrence of candidemia. Even after confirmed candidemia, only 33 of the 43 patients were treated with antifungal drugs. From these, 31 patients were treated with amphotericin B (0,5- 1mg/ kg/day) for 17 days and two were treated with fluconazole (6-12mg/kg/day) for 7 days as a rule respectively. The remaining 10 patients were not treated with antifungals after confirmed candidemia (Table 1)

Candidemia was responsible for the death of 17 of the 43 patients, being involved 10 newborns (from the total of 26), 4 premature (from the total of 8) and 3 children (from the total of 17). Among the most frequent species causing candidemia, the death rate was higher with *C. parapsilosis* (n=8), following *C. tropicalis* (n=5), *C. albicans* (n=2), *C. glabrata* (n=1) and *Candida spp* (n=1). (Table 1). 9 out of 17 patients were derived from Intensive Treatment Units (UTI) involving 3 newborns, 3 premature and 3 children with isolation from *C. parapsilosis* (n=4); *C. albicans* (n=2), *C. tropicalis* (n=2), *Candida spp.* (n=1).

Candidemia was responsible for the death of 17 out of the 43 patients, being involved 10 newborns (from the total of 26), 4 premature (from the total of 8) and 3 children (from the total of 17). Among the most frequent species causing candidemia, the death rate was higher with *C. parapsilosis* (n=8), following *C. tropicalis* (n=5), *C. albicans* (n=2), *C. glabrata* (n=1) and *Candida spp* (n=1). (Table 1). 9 out of 17 patients were derived from the Intensive Treatment Units (UTI) involving 3 newborns, 3 premature and 3 children with isolation from *C. parapsilosis* (n=4), *C. albicans* (n=2), *C. tropicalis* (n=2) and *Candida spp.* (n=1).

Correlating with the treatment, 14 out of the 33 patients treated with antifungal drugs died and 4 out of the 10 patients without antifungal treatment, died before the mycological exam result (Table 1).

DISCUSSION

According to Huang et al. (2000) and Levy et al (1998) the amount of the fungemia rates caused by *C. parapsilosis* and *Candida albicans* on childish population overlaps the adult population in more than 50% of the cases, mainly when these patients are derived from the Intensive Treatment Unit. Such reports can be explained by the evidentiatio of the larger number of the invasive medical procedures, in pediatrics and the deficient functional immunity of the neonates.

Among these species, the most incident was *C. parapsilosis* (n=39), followed by *C. Tropicalis* (n=23) and in the third rank *C. albicans* (n=15). This is a noteworthy fact, pointing out more and more, that the position of the non-*albicans* species isolated from hemocultures in pediatric patients, nowadays, overlaps the isolation of *C. albicans* in our region. Reasserting yet data from the literature (Huang et al, 2000 and Levy et al (1998), in our study, *C. parapsilosis* (n=9) and *C. tropicalis* (n=5) were the main fungal species isolated from patients derived from the Intensive Treatment Unit.

In conformity with Lupetti et al. (2002), *C. parapsilosis* is an exogen pathogen that can have the capacity of invade directly or indirectly an immunosuppressed individual. Such situation can be induced by a previous colonization of synthetical material, for example, central venous catheter. *C. parapsilosis* can be yet involved in clinical frames of onychomycosis, being nowadays, one of the most incident ethiological agents in such onychopathies of our region (SIDRIM, 2004; BRILHANTE et al., 2004). These data could drive us to correlate the focus of the infection with the possible contact of the health professionals hands, as well as, the mothers at the suckle time.

About the risk-factors analyzed in our study, are also mentioned by several authors (MacDonald et al 1998, Matsumoto et al, 2002 and Benjamin et al. 2003). We observed that mainly, the venous central access, previous antibiotic therapy, surgery, gastric probe, and

mechanical ventilation, were associated principally with the colonization of *C. parapsilosis* in our childish population.

According to the Infectious Disease Society of America (IDSA), the dosages of Amphotericin B and Fluconazole used in our patients, were according to the commendation of the Institution (Rex et al. 2000). Only 10 patients with antifungal treatment died, 9 of them derived from the Intensive Treatment Unit. Moreover, studies accomplished by Fraser et al. (1992) and Colombo et al. (1999), observed that about 20% of the patients were healed with no antifungal treatment. Interestingly, associated with such data, in our evaluation was observed that 10 (23%) of the patients had no antifungal treatment. Such cases can be justified by the *port-morten* diagnosis, of 4 patients, as well as, the extraction of the intravenous access path of 6 patients that evolved to the healing.

Based on these informations, probably the installation of *C. parapsilosis* in the analyzed patients, could be related to the presence of some access path, thus, not being necessary the antifungal treatment, in case of withdrawing of such risk factors. On the contrary, the withdrawing of the intravenous catheters from pediatric patients mainly derived from Intensive Treatment Unit could increase the mortality chance, since such access path would be fundamental to the maintenance of these patients lives (Karlowicz et al. 2000).

In our study, the fungal infections were responsible for 17 obits, reaching mainly newborns and prematures, the main implicated was *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*. In conformity with Saxen et al. (1995) and Huang et al (1999) they agree that the nosocomial candidemia cases in the childish population are associated with a high morbidity and mortality principally in newborns submitted to multiple invasive medical procedures.

The analysis can point out the emergence of *C. parapsiosis* in the cases of morbidity and mortality in the analysed cases of fungemia in the pediatric population analyzed. The colonization of this species can be directly related to the permanence of the risk factors. At last,

our study, has unquestionable importance, as, it contains noteworthy informations, since it is possible that the found results reflect the regional reality and *C. parapsilosis* be the main yeast involved in the fungemia cases in the other tertiary hospitals in Northeast Brazil.

Acknowledgements

This work was supported by grants from FUNCAP Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico and CAPES Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior. We thank to Hospital Infantil Albert Sabin for colaboration and Ms. G.C. Paixão for technical support.

REFERENCES

- Chapman RL. Candida Infections in the neonate. *Curr Opin Pediatric* 2003; 15: 97-102.
- Mokaddas EM, Ramadan AS, Abo el Maaty SH et al. Candidemia in Pediatric surgery patients. *J Chemother* 2000; 12: 332-8.
- Faix RG, Chapman RL. Central nervous system candidiasis in the high-risk neonate. *Semin Perinatol* 2003; 27: 384-92.
- Benjamin DK, Garges H, Steinbach WJ. Candida bloodstream infection neonates. *Semin Perinatol* 2003; 27: 375-83.
- Lupetti A , Tavanti A , Davini P, et al. Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* Candidemia in a neonatal intensive care unit. *J C Microbiol* 2002; 40: 2363-9
- Sidrim JJC and Rocha MFG (2004) *Candidíase*. In *Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos*. Eds, JJC Sidrim and MFG Rocha. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp: 265-274.
- Saxen H, Virtanen M, Carlson P, et al. Neonatal *Candida parapsilosis* outbreak with a high case fatality rate. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14: 776-81.
- Lopez SJB, Coto CGD, Fernandez CB et al. Neonatal invasive candidiasis: a prospective multicenter study of 118 cases. *Am J perinatol* 2003; 20: 153-63.
- Trubenova D, Viragova S, Pilipcinec E, et al. Candidemia in cancer patients and in children in a neonatal intensive care unit. *Folia Microbiol (Praha)* 2001; 46: 161-4.

Levy I, Rubin LG, Vasishtha S, et al. Emergence of *Candida parapsilosis* as the predominant species causing candidemia in children. *Clin Infect Dis*. 1998; 26:1086-8

Da Silva CLP, Santos RMR, Colombo AL. Cluster of *Candida parapsilosis* primary bloodstream infection in a neonatal intensive care unit. *The Brazilian J Infect Dis* 2001; 5: 32-36.

Matsumoto FE, Gandra RF, Ruiz LS, et al. Yeasts isolated from blood and catheter in children from a public hospital of São Paulo, Brazil. *Mycopathologia* 2002; 154: 63-9.

Gupta N, Mittal N, Sood P, et al. Candidemia in neonatal intensive care unit. *Indian Journal Pathology Microbiol*. 2001;44:45-8.

HuangYC, Lin TY, Leu HS, et al. Outbreak of *Candida parapsilosis* fungemia in neonatal intensive care units: clinical implications and genotyping analysis. *Infection* 1999; 27: 71-102.

MacDonald L, Baker C, Chenoweth C. Risk Factors for Candidemia in a Children`s Hospital. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 642-5.

Huang Y C, Lin T Y, Lien R I, et al. Candidemia in special care nurseries: comparison of *albicans* and *parapsilosis* infection. *J. Infect* 2000; 40: 171-5.

Rodriguez JLN and Moreira JLB (1999) Infecções Fúngicas Nosocomiais. In *Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica*. Eds JJC Sidrim and JLB Moreira. Ed. Guanabara Koogan, pp 212-214.

Milan EP, and Zaror L (2004) Leveduras: identificação laboratorial. In *Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos*. Eds, JJC Sidrim and MFG Rocha. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp: 89- 101.

Karlowicz MG, Hashimoto LN, Robert E, et al. Should central venous catheters be removed as soon as candidemias is detected in neonates?. *Pediatrics* 2000; 106; 1-5.

Marchetti O, Bille J, Fluckiger U, Eggimann P, Ruef C, Garbino J, Calandra T, Glauser MP, Tauber MG, Pittet Fungal Infection Network of Switzerland Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 311-320.

Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD, Filler SG, Pappas PG, Dismukes WE, Edwards JE. Practice Guidelines for the Treatment of candidiasis. *Clin Infec Dis* 2000; 30: 662-678.

Table 1 – Clinical, epidemiological and laboratorial features of 43 candidemic patients in tertiary care children's hospital from Northeast Brazil.

Isolates yeasts	Age (No Patients)	Underlying disease (N° of Patients)	Exposures Coexisting (N° of Patients)	Treatment (N° of Patients)	Mortality (N° of patients)
<i>C.parapsilosis</i> (n=19)	Newborns =(10) Prematures=(3) Children=(6)	neurological disease (5) prematurity (3) Infetious disease (1) gastrointestinal disease (2) respiratory disease (3) tumor (3) circulatory disease (1) surgery complications (1)	A=(15); B=(14); C=(12); D=(6) E=(11); F=(5) G=(5); K=(1); L=(1); M=(9)	Amphotericin B (n=12)	newborns= (2) 1* premature=(2) 1* children= 1
				Fluconazole (n=1)	newborns=1*
				No treatment (n=6)	Newborn= (2) 1*
<i>C.tropicalis</i> (n=15)	Newborns= (6) Prematures=(3) Children=(6)	gastrointestinal disease (3) prematurity (3) tumor (1) infetious disease (2) respiratory disease (1) neurological disease (3) circulatory disease (1)	A=(12); B=(10) C=(9); D=(2) E=(5); F=(1); G=(1); M=(5)	Amphotericin B (n=12)	Newborns= (2) 1* premature= (1) children= (2) 1*
				Fluconazole (n=1) No treatment (n=1)	-
<i>C.albicans</i> (n=4)	Newborns=(1) Prematures=(2) Children=(1)	prematurity (2) respiratory disease (1) surgery complications (1)	A=(3);B=(4) C=(2); D=(3) E=(1) G=(1); M= (3)	Amphotericin B (n=4)	newborn= 1* premature=1*
<i>C.guilliermondii</i> (n=2)	Children= (2)	neurological disease (1) gastrointestinal disease (1)	A=(3); B=(2); C=(2) D=(2); E=(1);F=(1);H=(1)	Amphotericin B (n=1) No treatment (n=1)	-
<i>C.glabrata</i> (n=1)	Newborn=(1)	respiratory disease (1)	A=(1);B=(1);C=(1); E=(1);F=(1)	Amphotericin B (n=1)	newborn= (1)
<i>Rhodotorula rubra</i> (n=1)	Children=(1)	neurological disease (1)	A=(1);B=(1);E=(1)	Amphotericin B (n=1)	-
<i>Candida spp</i> (n=2)	Children=(1) Newborns=(1)	neurological disease (1) gastrointestinal disease (1)	A=(3); B=(3); C=(3); D=(1); E=(2); M=(1)	No treatment (n=2)	children= 1* newborn= (1)

*- patients from intensive care units (ICU); A-access venous central; B-antibiotic therapy; C-gastric probe; D-mechanic ventilation; E-surgery; F-hemotranfution; G-parenteral nutrition; H-vesical probe; I-gastrostomy; J-esofagostomy K-colostomy; L-gastroduodenoanastomose, M-intensive care unit (ICU).

:

Table 1 – Clinical, epidemiological and laboratorial features of candidemic patients in tertiary care hospital from Northeast Brazil.

Patient	Age (years) /Sex	Underlying Illness	Associated Factors	Profilaxis Therapy (Days)	Cepas	Candida species	Ant
^R 1	NB/ F	prematurity	B, E,G,K, N, O	No	Cemm 2-1-007	<i>C.parapsilosis</i>	A
2	NB/ F	prematurity	A, B, E, G, K, N, O	No	Cemm 2-1-08	<i>C.parapsilosis</i>	
3	36/ F	complications of childbirth	D, E, G, L, N, O	No	Cemm2-1-011	<i>C.albicans</i> *	
4	63/ F	gastrointestinal disease	A, B, C, D, E, F, G, I, N, O	No	Cemm 2-1-12	<i>C. tropicalis</i>	
5	28/ F	miscellaneous conditions	A, B, D, E, I, K, L, M, N, O	No	Cemm 2-1-015	<i>C.albicans</i>	
6	NB/ M	prematurity	A, B, D, E, G, K, N, O	No	Cemm 2-1-032	<i>C.guillermundii</i>	
7	NB/ F	respiratory disease	D, E, G, N, O	No	Cemm 2-1-063	<i>C.albicans</i>	A
8	62/ F	circulatory disease	B, D, G, K,N, O	No	Cemm 2-1-065	<i>C.albicans</i> *	
9	24/ F	surgery complications	A, B, E, G, K, L, N, O	No	Cemm 2-1-066	<i>C.guillermundii</i> *	
10	NB/ F	gastrointestinal disease	A, B, D, E, G, F, I, K, N, O	No	Cemm 2-1-070	<i>C.tropicalisi</i>	
11	NB/ F	prematurity	A, B, E, K, O	No	Cemm 2-1-073	<i>C.tropicalis</i> *	
12	49/ M	neoplasms	A, B, C, D, E, F, G, N, O	No	Cemm 2-1-093	<i>C.albicans</i> *	
13	25/ M	gastrointestinal disease	A, B, C, D, E, G, H, N, O	No	Cemm 2-1-107	<i>C.glabrata</i>	
14	NB/ F	infectious disease	D, E, N, O	No	Cemm 2-1-108	<i>C.parapsilosis</i>	
^R 15	NB/ F	prematurity	A, B, C, D, N, O	No	Cemm 2-1-109	<i>C.parapsilosis</i> *	
16	76/ M	neoplasms	B, C, D, E, G, J, K, N, O	No	Cemm 2-1-110	<i>C.parapsilosis</i>	
^R 17	52/ M	neoplasms	A, D, E, I, K	No	Cemm 2-1-111	<i>C.parapsilosis</i>	
18	57/ M	gastrointestinal disease	A, B, C, E, K, L	No	Cemm 2-1-144	<i>C.tropicalis</i>	
19	NB/ M	prematurity	A, B, G, D, N, O	No	Cemm 2-2-145	<i>C.tropicalis</i>	
20	75/ F	neoplasms	A, B, C, D, E, F, G, J, L, N, O	Fluconazole (9)	Cemm 2-2-281	<i>C.tropicalis</i>	
21	44/ M	gastrointestinal disease	A, B, D, G, L, N, O	No	Cemm 2-2-169	<i>C.tropicalis</i>	
					Cemm 2-2-171	<i>C.albicans</i>	A
					Cemm 2-2-180	<i>C.parapsilosis</i> *	
					Cemm 2-2-280	<i>C.albicans</i>	

^R: Recurrence; * post- mortem ; NB: newborn, A- parenteral nutrition; B- gastric catheter; C- colostomy; D- surgery; E- central venal access; F- thoracic drain; G- mechanical ventilation; H- peritoneal drain; I- gastrostomy; J- hemodialysis; K- hemotransfusion; L- vesical probe; M- abdominal drain; N- antibiotic treatment, O- intensive care unit (ICU)

