

SONIA KHOURI

**LEVEDURAS ISOLADAS DE PACIENTES INTERNADOS EM
HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO DA CIDADE DE TAUBATÉ - SP**

**Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para a obtenção do
título de Doutor em Ciências.**

São Paulo - SP

2010

SONIA KHOURI

**LEVEDURAS ISOLADAS DE PACIENTES INTERNADOS EM
HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO DA CIDADE DE TAUBATÉ - SP**

**Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para a obtenção do
título de Doutor em Ciências.**

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Claudete Rodrigues Paula

**São Paulo - SP
2010**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Khouri, Sonia.

Leveduras isoladas de pacientes internados em Hospital
Universitário da cidade de Taubaté - SP / Sonia Khouri. -- São Paulo,
2010.

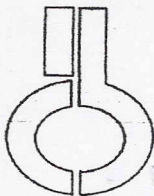
Orientador: Claudete Rodrigues de Paula.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração:
Microbiologia. Linha de pesquisa: Leveduras patogênicas.

Versão do título para o inglês: Yeasts isolated from patients in
University hospital city of Taubate - SP.

Descritores: 1. *Candida* spp. 2. Caracterização de fungos 3.
Epidemiologia 4. Infecção hospitalar I. Paula, Claudete Rodrigues de
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB080/2010



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 11 de abril de 2006.

PARECER 702/CEP

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em 64ª Reunião, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Infeção nosocomial por leveduras do gênero candida: Caracterização fenotípica e genotípica*".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão**.

Esclareço a V.Sa. que dentro de 12 meses, relatório do referido projeto deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilma. Sra.
SONIA KHOURI CROSARIOL
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas -USP

ACE

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Sonia Khouri.

Título da Tese: Leveduras isoladas de pacientes internados em Hospital
Universitário da cidade de Taubaté-SP .

Orientador(a): Claudete Rodrigues de Paula.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

DEDICATÓRIA A DEUS

Religião-É o amor que busca Deus.
Verdade-É o Amor que se eterniza.
Ideal-É o Amor que se eleva.
Fé-É o Amor que se transcende.
Esperança-É o Amor que sonha.

Caridade-É o Amor que auxilia.
Fraternidade-É o Amor que se expande.
Sacrifício-É o Amor que se esforça.
Renúncia-É o Amor que se depura.
Simpatia-É o Amor que sorri.

Vida-É o Amor existencial.
Filosofia-É o Amor que pensa
Razão-É o Amor que pondera.
Estudo-É o Amor que analisa.
Ciência-É o Amor que investiga.
DEUS- É o AMOR

DE UM SERVO DE DEUS

AOS MEUS AMADOS E QUERIDOS PAIS.....

ETERNA SAUDADE E GRATIDÃO!
GRANDE PARTE DO QUE SOU DEVO À VOCÊS

AOS QUERIDOS IRMÃOS, CUNHADOS E SOBRINHOS

MEUS PORTOS SEGUROS E MINHAS ALEGRIAS DE VIVER

AOS MEUS QUERIDOS AMIGOS.....

*ANJOS QUE ME ESTIMLAM E ENSINAM COM SUA
GENEROSIDADE E AMIZADE*

MUITO OBRIGADA À TODOS, AMO MUITO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

AOS PACIENTES DO HUT:

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS PELA CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO,
TENHAM CERTEZA QUE NÃO SERÁ EM VÃO

“Não devemos permitir que alguém saia da nossa presença, sem se sentir melhor e mais feliz”.

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Minha querida orientadora:

Claudete Rodrigues Paula

Sua força, sabedoria, competência, bondade, amabilidade e confiança me fez resistir a tudo que me impedia de concluir essa minha longa e difícil jornada.

À senhora minha eterna gratidão, carinho e profunda admiração !

Muito obrigada, por não ter desistido de mim e ser minha grande incentivadora.

*Muito obrigada pelos ensinamentos técnicos, científicos, éticos e humanos,
vou guardar para o resto de minha jornada!*

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo e especialmente ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas II pela oportunidade de realização do trabalho.

Ao Serviço de Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (SCCIH) do Hospital Universitário de Taubaté (HUT) pelo fundamental apoio e colaboração no levantamento de dados dos prontuários dos pacientes.

À Dra Marina Moreira , médica infectologista e responsável pelo SCCIH do hospital Universitário pela sua valiosa e imprescindível participação.

À enfermeira responsável do SCCIH, Teresinha Ribeiro Ferreira e colaboradora da pesquisa, sempre atenciosa, paciente e dedicada ao trabalho prestado.

Às enfermeiras dos diferentes setores analisados, sempre atenciosas e prestativas na coleta dos materiais (espécimes clínicos) obrigada pelo carinho.

À biomédica Dra. Margareth Neyla do Laboratório de Microbiologia, pela colaboração e participação fundamental no registro, semeadura e isolamento das 954 amostras investigadas.

Aos professores do ICB pelo convívio e ensinamentos prestados , especialmente aos Professores Francisco Gorgônio Nóbrega, Valderéz Gambale e Benedito Corrêa, minha gratidão.

A querida amiga e bióloga Aguida Maria do Instituto Adolfo Lutz de Taubaté- Regional 01, pelo auxílio na caracterização das amostras, à querida bióloga Maria, à direção da Instituição e toda equipe técnica, principalmente os técnicos Vladimir e Carminha, pela imensa ajuda na confecção dos meios de cultura e pelo apoio técnico. À equipe administrativa que sempre auxiliou e colaborou com o projeto, confiando e permitindo seu desenvolvimento nos finais de semana, feriados e fora do expediente.

Às secretárias Naide, Aninha do ICB pelos serviços prestados e todo o carinho.

À secretária Alice pela imensa atenção com os assuntos da pós- graduação, sempre com muita disposição e paciência.

Ao pessoal da biblioteca pela atenção e esclarecimentos para elaboração da tese.

Ao Celso pelos serviços prestados, sempre atencioso e solícito nos assuntos acadêmicos.

À Maria do Carmo da Comissão de ética sempre paciente e atenciosa.

Ao Flávio Viani pela paciência e colaboração com a análise estatística.

Ao Ériques, especialmente, pela preocupação, ajuda e disposição em colaborar com o projeto, muito obrigada pelos toques e ajuda na elaboração e finalização dos resultados finais.

À querida amiga Satiko por toda a atenção e carinho, sempre me ajudando nos assuntos da pós, com carinho e preocupação, sempre pronta a ajudar em tudo que era necessário, meu eterno agradecimento a você.

Ao querido amigo Guilherme, que em muito me ajudou, em todo o desenvolvimento do projeto, com sua dedicação, disposição e participação direta no estudo da caracterização fenotípica das amostras, meu eterno carinho e agradecimento a você.

Ao querido Mota, meus agradecimentos à sua colaboração no estudo e sua efetiva participação na caracterização genotípica das amostras, nos toques técnicos e na tradução do resumo. Muito obrigada por sempre estar pronto e disposto a ajudar.

*Aos colegas do laboratório de Micologia- USP,
Flavinha, Luciana, Marcão, Elza, Ériques, Georgea, Débora, Maurinho, Mel, Flávio e Satiko, muito
obrigada pela ajuda de sempre, e troca de experiências muito valiosas de cada um de vocês, sem as quais
não seria possível a conclusão de meu trabalho. Tenham certeza disso!*

*Aos queridos responsáveis técnicos do NUFABI, parceiros e amigos, Carol e Ricardinho, em especial, que
seguraram as pontas na minha ausência com carinho e comprometimento ímpares. A colaboração de vocês,
foi imprescindível, para a conclusão do projeto. Aos queridos estagiários, em especial à Ana Carla e
Fabiana, e aos demais que diretamente ou indiretamente contribuíram na parte experimental do projeto,
meus sinceros e carinhosos agradecimentos.*

*À Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), à Direção da Faculdade de Ciências da Saúde pelo apoio e
permissão para me ausentar de minhas atribuições didáticas e administrativas, minha eterna gratidão. Em
especial, aos professores amigos, ao Laboratório de Genomas do IP&D e ao laboratório de Microbiologia
da Instituição, pelo fornecimento das condições em desenvolver parte do projeto em suas dependências,
disponibilizando toda a estrutura necessária bem como os materiais, de consumo e permanente,
necessários.*

Ao CNPQ e a FAPESP pelo apoio financeiro concedido para a realização da pesquisa.

“Nós não somos nada, sozinhos, mas somos muito, unidos!”

RESUMO

KHOURI, S. LEVEDURAS ISOLADAS DE PACIENTES INTERNADOS EM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA CIDADE DE TAUBATÉ - SP . 2010. 90f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Nos últimos anos, têm ocorrido um aumento considerável das infecções fúngicas em ambiente hospitalar. As estimativas da incidência das infecções causadas por fungos não correspondem à realidade, devido às dificuldades diagnósticas destes microrganismos. Embora as infecções fúngicas, principalmente leveduras do gênero *Candida*, estejam ganhando importância nos pacientes hospitalizados, a grande maioria das instituições ainda não está preparada para o diagnóstico destes episódios. O presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo epidemiológico, determinando a ocorrência leveduras isoladas de diversos materiais, de diferentes setores em pacientes internados de um Hospital Universitário da região do Vale do Paraíba-SP. Neste estudo foram isoladas 55 cepas de leveduras das 558 amostras analisadas, no período de fevereiro a agosto de 2002. O gênero *Candida* ocupou a 2ª posição (9,85%) em relação aos 10 microrganismos mais isolados em amostras positivas com suspeita clínica de infecção hospitalar. Das amostras positivas para leveduras, a espécie mais frequente foi *C.albicans* com 40,0 %, seguida de *C. tropicalis* com 25,5%, *C.parapsilosis* com 23,6%, *C.glabrata* com 9,1% e *C. norvegensis* com 1,8%. A clínica médica foi o setor que apresentou maior número de amostras positivas para leveduras (63,6%), seguido por UTI neonatal (20,0%) e UTI adulto (16,4%).Dentre os espécimes clínicos analisados, as secreções (47,3%), de um modo geral, foram os que apresentaram maior número de amostras positivas para leveduras, em 2º lugar ponta de sonda (29,1%) e em 3º lugar sangue(12,7%), com predomínio de *C. albicans*. Dos 38 pacientes que apresentaram cultura positiva para leveduras do gênero *Candida*, 26 casos de colonização foram identificados (68,4%) e 22 casos foram classificados como casos de infecção hospitalar (57,8%), onde 50% destes casos de pacientes foram a óbito . Os resultados obtidos demonstram a importância da identificação correta dos episódios de infecção, na caracterização do perfil epidemiológico, auxiliando assim, no diagnóstico e terapêutica destes agentes emergentes.

Palavras chave: *Candida* sp. Caracterização. Epidemiologia. Infecção Nosocomial

ABSTRACT

KHOURI,S. Yeasts isolated from patients in HOSPITAL CITY UNIVERSITY OF Taubaté - SP. 2010. 100f. Thesis (Doctor of Sciences) - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2010.

In recent years, there have been a considerable increase of fungal infections in hospitals. Estimates of the incidence of fungal infections do not correspond to reality, due to diagnostic difficulties of these microorganisms. Although fungal infections, especially *Candida* species, are gaining importance in hospitalized patients, the vast majority of institutions are not yet prepared for the diagnosis of these episodes. The present work aims to perform an epidemiological study, determining the prevalence of these strains isolated from different materials, different sectors in inpatients of a university hospital in the region of Vale do Paraíba-SP. In this study we isolated 55 yeast strains from 558 samples in the period from February to August 2002. The genus *Candida* occupied the 2nd position (9.85%) for the 10 microorganisms isolated from positive samples with clinical suspicion of nosocomial infection. Samples were positive for yeasts, the most frequent species was *C. albicans* with 40.0%, followed by *C. tropicalis* 25.5% *C. parapsilosis* with 23.6% and 9.1% with *C. glabrata* and *C. norvagensis* 1.8%. The medical clinic was the sector that had the greatest number of samples positive for yeast (63.6%), followed by neonatal ICU (20.0%) and adult ICU (16.4%). Among the clinical specimens examined, the secretions (47.3%), in general, presented the largest number of samples positive for yeast, in 2nd place probe tip (29.1%) and blood in 3rd place (12.7%), predominantly *C. albicans*. Of the 38 patients who presented positive culture for *Candida* species, 26 cases of colonization were identified (68.4%) and 22 cases were classified as cases of nosocomial infection (57.8%), where 50% of these cases were patients died. The results demonstrate the importance of correct identification of episodes of infection, to characterize the epidemiological profile, thereby aiding in the diagnosis and treatment of these emerging agents.

Keywords: *Candida* sp., Characterization, Epidemiology, Nosocomial infection

Figura - 9 - PFGE tipo I das amostras de Candida albicans isoladas de um único neonato – P17. Linha 1: Padrão de peso molecular de Saccharomyces cerevisiae (Bio Rad); Linhas 2 a 7: correspondem aos perfis genotípicos – PFGE tipo I das amostras isoladas da cavidade oral ; Linha 8: corresponde ao perfil genotípico da amostra isolada do sangue 61

Figura 10 - PFGE tipo VIII das amostras de C. parapsilosis isoladas de um único neonato P3. Linha 1: Padrão de peso molecular S. cerevisiae; Linha 2: amostra proveniente da hemocultura; Linha 3: amostra proveniente do cateter; Linha 4: amostra proveniente da cavidade oral 62

Figura 11 - PFGE -tipos das amostras de C. parapsilosis isoladas dos neonatos. 1. Perfil molecular de S. cerevisiae; 2. PFGE tipo VIII da amostra isolada do cateter de P3; 3. PFGE tipo VII da amostra isolada da cavidade oral de P4; 4. PFGE tipo VIII da amostra isolada de sangue de P3; 5 : PFGE tipo IX da amostras isolada de cateter; 6 : PFGE tipo IX da amostras isolada de sangue de P15; 7: PFGE tipo IX da amostra isoladas de cateter de P23; 8: PFGE tipo IX da amostra isoladas de sangue de P23 63

Figura 12 - PFGE tipos de C. albicans. P: Padrão de peso molecular de Saccharomyces cerevisiae; linhas 1, 3, 4, 7: PFGE tipo V dos neonatos P 4, P5,P7 e P11; linha 2: PFGE tipo VI do neonato P14; linhas 5 e 6: PFGE tipo VI dos neonatos P22 64

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - Interpretação do comportamento de cepas de *Candida sp.***
Segundo normas do CLSI (M27A2 – 2002), frente a concentração dos
antifúngicos ($\mu\text{L}/\text{mL}$) 44
- TABELA 2 - Identificação das espécies de leveduras isoladas de colonização**
oral, sangue e cateter, PFGE tipos e óbitos dos neonatos internados na UTIN
de Hospital Terciário de São Paulo 52
- TABELA 3 - Distribuição dos PFGE-tipos dentre as amostras de *Candida***
isoladas de neonatos internados na UTIN do Hospital Terciário, São Paulo ... 57
- TABELA 4 - Atividade de proteinase e fosfolipase presente nas amostras**
leveduriformes isoladas dos neonatos hospitalizados na UCIN, Hospital
Terciário, São Paulo 65
- TABELA 5 - Sensibilidade antifúngica das espécies de *Candida spp* isoladas**
dos neonatos internados em UTIN do Hospital Terciário, São Paulo..... 67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DP- DESVIO PADRÃO

FC – FREQUÊNCIA CARDÍACA

RN - RECÉM-NASCIDO

FR – FREQUÊNCIA RESPIRATÓRIA

IG – IDADE GESTACIONAL

HUT – HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE TAUBATÉ

HC – HOSPITAL DAS CLÍNICAS

UTIN – UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL

CO – CAVIDADE ORAL

SG – SANGUE

CAT – CATETER

g – GRAMAS

SCCIH – SERVIÇO DE COMISSÃO DE CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR

LISTA DE SÍMBOLOS

g	- gramas
%	- porcentagem
>	- maior que
<	- menor que
MG/L	- miligrama por litro

SUMÁRIO

1	Introdução	20
2	Objetivos	31
3	Material e métodos	32
3.1	Local de estudo	32
3.2	Amostras estudadas	34
3.2.1	Critérios de inclusão	34
3.2.2	Definições dos casos de colonização e infecção hospitalar	34
3.2.3	Coleta	35
3.2.4	Identificação das leveduras isoladas	37
3.2.4.1	Método clássico	37
3.2.4.2	Método comercial API-20CAUX	37
3.2.4.3	Método molecular - ribotipagem	38
3.3	Fatores relacionados à virulências das leveduras	39
3.3.1	Pesquisa de proteinase	39
3.3.2	Pesquisa de fosfolipase	39
3.4	Teste de sensibilidade aos antifúngicos	40
3.4.1	Processamento do teste	40
3.4.2	Interpretação dos resultados	41
3.5	Técnicas para diferenciação de <i>C.albicans</i> e <i>C.dublinsiensis</i>	42
3.5.1	Testes fenotípicos	42
3.5.2	Testes genotípicos	42
3.5.2.1	Extração do DNA das amostras de leveduras para diferenciação molecular	42
3.5.2.2	Visualização do DNA extraído	43
3.5.2.3	Reação de PCR	44
3.6	Análise estatística	45
4	Resultados	46
5	Discussão	55
6	Conclusões	60
	Referências	64
	Anexos	68

1 INTRODUÇÃO

Um organismo, para ser saudável necessita preservar sua individualidade e interagir harmoniosamente com o meio em que vive. É importante destacarmos que vivemos em um ambiente repleto de diferentes seres vivos e nossa sobrevivência está condicionada às relações que estabelecemos com as demais espécies e o meio ambiente. As infecções representam uma forma desarmônica desta relação, do homem com outros organismos (FERNANDES et al., 2000).

Um considerável número de pacientes pode ser colonizado por espécies de *Candida*, durante o período de internação, porém nem todos, posteriormente, desenvolvem processos infecciosos (EGGIMAN et al., 2003).

As infecções hospitalares constituem um grave problema de Saúde Pública, sendo apontada na estatística das principais causas de morbidade e mortalidade. O custo adicional causado, pelas infecções hospitalares é extremamente alto, podendo multiplicar várias vezes os custos adicionais de cada tratamento realizado.

Pacientes hospitalizados em Unidades Intensiva de Tratamento (UTI) apresentam alto risco de desenvolver infecções hospitalares, devido primeiramente, a gravidade do caso, e depois a grande exposição aos procedimentos invasivos. Outro fator importante, também, é o número de profissionais que entram em contato com estes pacientes para ministrar os devidos cuidados e a maneira com que estes cuidados são ministrados. Além de outros inúmeros fatores que surgiram, nas últimas décadas, e fizeram com que as infecções hospitalares aumentassem cada vez mais.

Segundo Fernandes (2000), os avanços médicos, como transplantes, avanços em quimioterapia, inclusão de antibióticos de amplo espectro, por um lado alteram significativamente a história natural das doenças aumentando a sobrevivência dos pacientes, por

outro lado, resultaram em um grande número de pacientes com os mecanismos de defesa alterados ou imunodeprimidos o que levou a população hospitalar ficar altamente susceptível às infecções causadas por microrganismos oportunistas, onde os fungos se destacam por causar infecções graves e com significativas taxas de mortalidade, principalmente em ambiente hospitalar (COLOMBO e GUIMARÃES, 2003; FERNANDES et al., 2000).

As infecções fúngicas nosocomiais têm sido, uma importante causa de mortalidade em hospitais terciários durante a última década, devido ao aumento de sua incidência e a dificuldade em seu diagnóstico (CANTÓN *et al.*, 2001). No caso de candidíase nosocomial, vários fatores contribuíram para aumento de sua frequência (COLOMBO e GUIMARÃES, 2003; REX *et al.*, 1995;). O maior controle dos choques sépticos e redução da mortalidade por bactérias Gram-negativas, tem desencadeado o estabelecimento de uma superinfecção por leveduras do gênero *Candida*. As terapias anti-neoplásicas e processos inflamatórios, em geral, contribuíram para agravamento de neutropenia e lesões em barreiras naturais existentes em mucosas. Todas estas ocorrências contribuem, direta ou indiretamente, para a exposição maior de pacientes hospitalizados às leveduras e aumentam a vulnerabilidade dos hospedeiros às infecções (PFALLER, et al. 2007; COLOMBO et al., 2006; 2007).

As infecções fúngicas têm aumentado, de forma alarmante nos últimos anos, sendo importante causa de morbiletalidade em pacientes hospitalizados. A maioria, das espécies de fungos envolvidas em doenças humanas, é oportunista causando prejuízos em imunocomprometidos. Essas infecções têm sido reportadas em diversas Instituições de Saúde e também em hospitais públicos e privados (SANDVEN et al., 2000).

As doenças infecciosas estão entrando em uma nova era e atualmente os fungos representam uma proporção significativa dos patógenos causadores destas graves infecções,

sendo crucial considerar rapidamente a possibilidade de infecção fúngica, em pacientes hospitalizados, com aumento de sua frequência e elevadas taxas de mortalidade e morbidade (PAULA et al., 1999; AGARWAL et al., 2004; BIZARRO et al., 2005; CHANG et al., 2008). De acordo com Paula et al. (1999), o número de espécies de leveduras do gênero *Candida*, nas últimas décadas, vem aumentando progressivamente, constituindo assim, um grupo dominante de infecções fúngicas em hospitais. Espécies de *Candida* são responsáveis por até 78% dos casos de infecções nosocomiais por fungos (MAROL e YUCESYOY, 2007).

Em revisão da literatura observa-se que as várias espécies de *Candida* são a quarta ou terceira principal causa de infecção da corrente sanguínea na América do Norte, associadas a uma letalidade alta de 40% e particularmente, de 18 a 80% em pacientes neutropênicos. (EDMOND et al., 1999; NG et al., 2000; FRIDKIN et al., 2006; WENZEL E GENNINGS, 2005).

As espécies de *Candida* mais comumente isoladas em infecções invasivas de importância clínica, são: *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. norvegensis*, *C. rugosa*, entre outras (EGGIMANN et al. 2003) .

Embora *C. albicans* seja o patógeno mais isolado, em casos clínicos, a incidência da infecção de corrente sanguínea por outras espécies tais como, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. lusitaniae* tem sido registrada nos últimos anos (GAGGIANO, 2007; SHIN et al., 2007; WANG et al., 2007; CELEBI et al., 2008). *C. parapsilosis* tem sido cada vez mais isolada de sangue de pacientes hospitalizados (LEVIN et al., 1998; RUIZ et al., 2005; ASBECK et al., 2007; CARTER et al., 2008). A importância de *C. tropicalis* é ressaltada, sendo relatada como agente infeccioso com alta mortalidade e associada com infecção sanguínea. Tem sido também descrita em casos de surtos de candidúria (WINGARD et al., 1995; JANG et al., 2005; SILVA et al. 2007).

A espécie *C. krusei* é considerada emergente e tem sido isolada geralmente de pacientes com câncer (WESTBROOK et al., 2007; HASHEM et al., 2008). *C. glabrata* se apresenta em terceiro lugar como causa de infecção hospitalar em uma série de estudos. Ressalta-se a sua ainda a sua resistência ao fluconazol e a outros azóis, fato que contribui com o aumento da infecção onde estas drogas são utilizadas, em muitos casos, como profilaxia (PFALLER et al., 1996; SANGUINETTI et al., 2005; HASHEM et al., 2008). Epidemia por *C. guilliermondi* em pacientes cirúrgicos, após nutrição parenteral e uso de cateter também tem sido descrita (MATSUMOTO et al., 2001; MASALA et al., 2004). *C. dubliniensis* está associada com candidíase da mucosa oral em pacientes infectados pelo HIV (SULLIVAN e COLEMAN, 1997). Esta espécie apresenta características morfológicas e bioquímicas semelhantes a *C. albicans*, sendo necessária a utilização de métodos moleculares para diferenciá-las (PARK, 2000; MILAN et al., 2001; CHAVASCO et al., 2006). Segundo Mariano et al. (2003), na América do Sul, a prevalência de isolados de *C. dubliniensis* parece ser menor do que aquela demonstrada por países da América do Norte. Alguns testes fenotípicos são aplicados para a diferenciação das duas espécies, como o uso de “CHROMagar” *Candida* e capacidade de crescimento a 42 °C (SULLIVAN e COLEMAN, 1998), gerando resultados parciais. Em um estudo anterior realizado em nosso laboratório, Matsumoto et al. (2006) realizaram tanto as técnicas fenotípicas e genotípicas e todas as cepas isoladas foram confirmadas serem *C. albicans*. Casos de doença superficial e invasiva por espécies emergentes, tais como *C. famata*, *C. rugosa* tem sido registradas (HAZEN, 1995; CAGGIANO et al., 2007). A mudança na etiologia das espécies de leveduras, para alguns autores, está associada ao uso profilático do fluconazol, entretanto, as razões da diversidade e variabilidade das diferentes espécies tem sido descrita em diversos estudos, porém gerando controvérsias entre os autores (KREMERY et al., 2002;

DIMOPOULOS et al., 2008). A resistência das espécies não *albicans* aos antifúngicos, representa uma mudança nas estratégias profiláticas e terapêuticas, uma vez que algumas delas apresentam resistência aos antifúngicos (GUDLAUSSON et al., 2003; TORTORANO et al., 2004; DIMOPOULOS et al., 2008).

As espécies, tais como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* também são encontradas nas UTINs (ROILIDES et al., 2003; MANZONI et al., 2007; VENDETUOLLI et al., 2008) correspondendo a quase 10% das infecções fúngicas. *C. parapsilosis* tem se destacado como causadora de candidíase sistêmica neonatal (VENDETUOLLI et al., 2007; GANESAN et al., 2008). Alguns trabalhos têm descrito *C. parapsilosis* em UTINs ocupando o segundo lugar após *C. albicans* (SAIMAN et al., 2001; STOLL et al., 2002; FRIDKIN ET al., 2006;. Entretanto, em outros estudos, a prevalência tem mudado de *C. albicans* para *C. parapsilosis* (HUANG et al., 1999; STOLL et al., 2002; BORDERON et al., 2003; RUIZ et al., 2005; ASBECK et al., 2007).

No Brasil, Matsumoto et al. (2001) realizaram um estudo em um hospital público infantil, em São Paulo e verificaram que de 80 amostras provenientes de sangue e cateter, as espécies prevalentes foram *C. parapsilosis* (35%) seguida de *C. albicans* (20%). Pasqualoto et al. (2006) realizaram estudo retrospectivo durante o período de 9 anos, 1995 a 2003, em hospital terciário de Porto Alegre e verificaram que 191 pacientes tiveram candidemia, prevalecendo a espécie *C. parapsilosis*. Saiman et al. (2001) estudaram os fatores de risco para a colonização por *Candida* em seis UTINs. Foi realizado estudo retrospectivo de 15 anos de candidemia em UTIN nos Estados Unidos. Em relação às espécies de leveduras, *Candida albicans* predominou no primeiro período, ou seja, de 81 a 90; *Candida parapsilosis* predominou no período seguinte (91 a 95), sendo responsável por 60% dos casos.

Nos anos 70 e 80, a sepse por bactérias Gram-negativas foi a principal preocupação dentre as infecções hospitalares. Os principais agentes envolvidos eram a *Klebsiella sp.*, *Escherichia coli*, *Enterobacter sp.* e *Pseudomonas sp.* Durante os anos 80 e 90 as bactérias Gram-positivas, particularmente o *Staphylococcus sp.* e o *Enterococcus sp.* passaram a ser as principais causadoras de infecções hospitalares. Entretanto, mais recentemente, leveduras do gênero *Candida* tornaram-se a quarta causa principal de sepse hospitalar, ultrapassando a *E. coli* (REX et al., 2001).

É importante ressaltar que há variações geográficas, significativas, no padrão etiológico de infecções invasivas por *Candida* spp documentadas em diferentes países. Enquanto na América do Norte nota-se o predomínio de *C. glabrata* entre as espécies não *albicans*, na América do Sul, observa-se predomínio de *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* (COLOMBO e GUIMARÃES, 2003).

Em um estudo de revisão, realizado por Colombo e Guimarães (2003), estes autores relataram que leveduras do gênero *Candida* têm grande importância pela alta frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano. Espécies de *Candida* são encontradas no tubo gastrointestinal em 20 a 80% da população adulta saudável. Entre as mulheres, cerca de 20 a 30% apresentam colonização por *Candida* na vagina. Estes microorganismos comensais tornam-se patogênicos caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou o comprometimento de barreiras anatômicas secundariamente a queimadura ou procedimentos médicos invasivos. Alterações dos mecanismos de defesa do hospedeiro podem ser decorrentes de mudanças fisiológicas características da infância (prematuridade) e envelhecimento ou mais frequentemente, associadas a doenças degenerativas, neoplásicas, imunodeficiências congênicas ou adquiridas e imunodepressão induzida por atos médicos (DIGNANI et al., 2003).

De acordo ainda, com os mesmos autores, as peculiaridades apresentadas por diferentes espécies de *Candida* spp, do ponto de vista epidemiológico, justificam a necessidade de identificação de espécies, destas leveduras quando associadas às doenças sistêmicas. A identificação é considerada uma etapa fundamental para a monitorização das taxas de infecção hospitalar bem como para a identificação precoce de surtos por *Candida* (COLOMBO e GUIMARÃES, 2003).

O reconhecimento da importância de investigação das infecções fúngicas nosocomiais tem levado ao aumento das pesquisas em busca de novos diagnósticos e terapêuticas para detectar e conduzir melhor esse tipo de micose (PAULA et al., 1999; MATSUMOTO et al., 2001, 2007; RUIZ et al., 2005; COLOMBO et al., 2006, 2007). Além disso, as pesquisas mostram a necessidade de um monitoramento epidemiológico, juntamente com uma vigilância contínua nos padrões de sensibilidade aos antifúngicos, assim como mais trabalhos associando resistência-sensibilidade às demais características biológicas da levedura.

Os avanços da biologia molecular tem permitido o rápido desenvolvimento de técnicas de genotipagem molecular para estudos clínicos e epidemiológicos (Scherer & Stevens, 1988; Stevens et al., 1990). Uma variedade de métodos são utilizados para subtipar espécies de *Candida* spp através do DNA, uma vez que não existe um método “gold standard”. A técnica de RAPD (“Random amplified polymorphic DNA”) ou REA (“Restriction enzyme analyses”) geralmente são utilizados para determinar a origem de uma infecção, mas muitas vezes é necessário a utilização de métodos mais reprodutíveis e discriminatórios como hibridização por Southern blotting e eletroforese em campo pulsado (PFGE – Pulsed field gel electrophoresis). Estas técnicas quando aplicadas, em algumas infecções nosocomiais causadas por *Candida* spp, uma variedade de cepas e espécies podem

ser identificadas. Além disso ocorre microevolução de espécies de leveduras e cepas epidemiologicamente relacionadas podem mostrar pequenas diferenças no seu perfil genotípico criando a incerteza se estas são cepas distintas (REISS et al., 1998).

Nos últimos anos, têm ocorrido um aumento da incidência de espécies não *albicans* devido ao uso abusivo de antibióticos e antifúngicos promovendo redução da sensibilidade das cepas frente a estes fármacos (EGGIMAN et al., 2003). Além disso, existem ainda os fatores de virulência desenvolvidos pelo microrganismo que tornam o tratamento mais difícil (GHANNOUM, 2002) e promovem aumento na ocorrência de infecções por *Candida spp* (SOBEL et al., 2002). Os fatores mais comuns descritos por Xisto et al. (2005) são a antibioticoterapia (100%) e o uso de cateter vesical de demora (92,6%).

Não existe nenhum teste diagnóstico rápido e preciso que permita confirmar com certeza a presença de doença fúngica invasiva. Com ausência de biópsias de tecido, as culturas fúngicas nem sempre são positivas na presença da doença invasiva. Além disso, as culturas positivas não significam definitivamente a presença de doença invasiva, pois elas podem representar colonização. Todavia, em pacientes que são imunossuprimidos, a positividade da cultura é altamente correlacionada com doença invasiva. Assim, em um paciente de alto risco, a cultura positiva deve ser considerada infecção até que se prove o contrário (REX et al., 2001).

O diagnóstico de candidíases disseminadas apresenta dificuldades e limitações. A melhor ferramenta é a hemocultura, porém ela tem valor limitado, pois até mesmo em pacientes com neutropenia grave ou imunossuprimidos, com suspeita significativa de candidemia, as hemoculturas são positivas em cerca de 50% dos episódios. Por isso, estão sendo estudadas estratégias diagnósticas não baseadas em hemoculturas, mas ainda não foi encontrada uma alternativa fidedigna (BERENGUER et al., 1993; BORST et al. 2001).

Em estudo realizado por Mähns et al. (2005), foram comparados diferentes métodos fenotípicos para identificação de *Candida spp*, entre eles o API 20C AUX (Biomerieux), entre outros métodos clássicos, utilizando como padrão cepas de leveduras já identificadas por PCR (Reação em cadeia da polimerase), e concluíram que não existe um único método capaz de diferenciar todas as espécies, principalmente quando elas possuem características semelhantes, como é o caso de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*, por exemplo. Dependendo da espécie é necessário o uso de pelo menos três provas fenotípicas diferentes ou o uso de PCR que pode ser complementado por outro método molecular chamado RFLP (Restriction fragment length polymorphism) que é um método prático e confiável quando comparado aos métodos de identificação convencionais (CIRAK et al., 2003).

Cada vez mais, são estudados os fatores de virulência dos fungos e acredita-se que *C. albicans* e outras espécies do gênero, possuam atributos celulares e moleculares que conferem a habilidade de causarem infecções, dentre as quais, podemos relacionar a secreção de exoenzimas, como proteinases e fosfolipases.

Estudos sobre a atividade das proteinases e fosfolipases tem sido relatados com objetivo de compreender os mecanismos de virulência de *Candida*. O destaque da espécie como patógeno está relacionado a vários fatores incluindo a secreção destas enzimas (SATIB et al., 2002). Esta atividade pode ser monitorada “in vitro” (RUCHEL et al., 1982; PRICE et al., 1982). Segundo Oksuz et al. (2007), as atividades enzimáticas foram mais baixas em amostras colonizantes do que em amostras isoladas de infecção. Cerikrioglu et al. (2004), sugerem que a atividade enzimática, durante a colonização, por longo tempo, pode contribuir para o desenvolvimento de candidemia.

Durante as últimas décadas, a incidência e a severidade das infecções fúngicas têm aumentado significativamente. Estes eventos levaram ao estudo e desenvolvimento de novos

antifúngicos. As principais limitações das opções terapêuticas atuais incluem: espectro inadequado de atividade, a falta de eficácia devido a resistência crescente, pequeno índice de tolerância, interações com outras drogas, perfil farmacocinético inadequado e custo excessivo (LEWIS, KLEPSER e PFALLER, 1998).

No país, os principais antifúngicos utilizados no controle de espécies de *Candida* são os poliênicos, anfotericina B, os azólicos como cetoconazol e miconazol (imidazólicos) ou itraconazol, fluconazol e voriconazol (triazólicos).

A anfotericina B convencional tem sido utilizada como droga de escolha para infecções por *Candida* spp em neonatos, mas causa efeitos colaterais severos, como nefrotoxicidade (BALEY et al., 1984; BLISS et al., 2003). A anfotericina B lipossomal mostrou-se efetiva e segura no tratamento de neonatos (KREBS et al., 1999; BLISS et al., 2003).

O uso terapêutico e profilático de agentes tais como anfotericina B e os azóis, menos tóxicos, que são freqüentemente administrados por períodos prolongados, tem dado origem a casos alarmantes de resistência aos antifúngicos (DIAZ-GUERRA et al., 1998; PFALLER et al., 1998; PFALLER ET al., 2006; PFALLER et al., 2007). Porém, sabe-se que algumas espécies de *Candida* como *C. krusei* e *C. glabrata* apresentam susceptibilidade reduzida aos triazólicos e, desta maneira, os pacientes devem ser tratados com outros antifúngicos (PFALLER et al., 2007; PFALLER et al., 2008). Efeitos colaterais menos sérios do que os causados pela anfotericina B e a sua fácil administração tem tornado os azólicos, fármacos bastante utilizados. O aumento da ocorrência de espécies de *Candida* spp potencialmente resistentes às drogas azólicas de primeira e segunda gerações, levou ao desenvolvimento de novas drogas antifúngicas, como o voriconazol, que apresenta um amplo espectro de ação e vem mostrando resultados promissores contra espécies de *Candida* resistentes a outros

azóis, como o fluconazol (DRAGO et al., 2004; PFALLER et al., 2007). Kullberg et al. (2005) verificaram que o voriconazol é tão eficaz quanto o esquema da anfotericina seguida de fluconazol para tratamento de pacientes não neutropenicos. O voriconazol é considerado um fármaco seguro para os neonatos (KOHLI et al., 2008). A caspofungina pertence a uma nova classe de compostos antifúngicos que inibe a síntese da β -1,3-D-glucana, o maior componente da parede celular de leveduras . É a primeira equinocandina a ser licenciada e seu espectro está limitado às espécies de *Candida* e *Aspergillus* (MORA-DUARTE et al., 2001; STONE et al., 2002; WALSH et al., 2002). Estudos têm sido relatados sobre a ação da caspofungina em neonatos (VASQUEZ et al., 1997; WALSH et al., 2002; LEHNRBECKER e GROLL, 2008).

Para que um antifúngico seja considerado ideal ele deve possuir um amplo espectro de atividade, ação fungicida ao invés de fungioestática, estar disponível em formulações oral e parenteral, causar poucas interações medicamentosas, ser seguro em doses eficazes, ser custo-efetivo e estável à resistência microbiana. Sendo assim, o desenvolvimento de um agente antifúngico é um grande desafio, pois há poucos alvos potenciais de ação que não sejam compartilhados pelo fungo e a espécie humana. Além disso, as dificuldades inerentes ao diagnóstico e identificação da espécie envolvida prejudicam o desenvolvimento de estudos populacionais adequados (PFALLER et al., 1998; REX et al., 2001).

2 OBJETIVOS

Com base nas considerações descritas, o presente estudo teve por objetivos:

1. Identificar as leveduras do gênero *Candida* isoladas de pacientes hospitalizados, por meio de métodos clássicos, “kit” comercial API-20C e por Ribotipagem.
2. Diferenciar as cepas de *Candida albicans* de *Candida dubliniensis* por métodos fenotípicos e pelo método de PCR.
3. Verificar a ocorrência das leveduras do gênero *Candida* nos diversos espécimes clínicos, cateter e sondas de pacientes hospitalizados
4. Comparar a presença das leveduras do gênero *Candida* nos diversos espécimes clínicos e equipamentos médicos com relação à presença de bactérias
5. Determinar os casos de colonização e de infecção hospitalar por leveduras.
6. Averiguar a produção de fatores relacionados à virulência (proteases e fosfolipases) pelas leveduras isoladas.
7. Determinar a sensibilidade das leveduras do gênero *Candida*, por meio do método “E-test”, frente aos antifúngicos: anfotericina B, 5-fluorocitosina, cetoconazol, itraconazol, fluconazol e voriconazol.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de Estudo:

O presente estudo foi realizado no Hospital Universitário de Taubaté (HUT) – Vale do Paraíba, SP, nas unidades de Terapia Intensiva (UTIs) Adulto (12 leitos) e Neonatal (12 leitos), Oncohematologia Adulto e Infantil (13 leitos), e Clínica Médica (24 leitos), respectivamente figuras 1, 2, 3 e 4.

O HUT é caracterizado como Hospital Geral de Ensino da Universidade de Taubaté, de grande porte (170 leitos), localizado na região do Vale do Paraíba no estado de São Paulo. O hospital atende pacientes do Vale do Paraíba, principalmente os pacientes provenientes do Sistema Único de Saúde (SUS), vindo de cidades vizinhas da região do Vale do Paraíba e região Serrana.



Figura 1. UTI neonatal do HUT localizado na região do Vale do Paraíba – SP



Figura 2. Leito de UTI adulto do HUT localizado na região do Vale do Paraíba – SP.



Figura 3. Disposição de um quarto de 2 leitos do setor de Clínica Médica do HUT, localizado na região do Vale do Paraíba – SP.



Figura 4. Leito do setor de Oncohematologia do HUT localizado na região do Vale do Paraíba – SP.

3.2 Amostras estudadas

3.2.1 Critérios de inclusão

Isolados clínicos de pacientes, adultos, crianças e neonatos, com um período de internação, nos setores pré – selecionados, superior a 72 horas com suspeita clínica de infecção hospitalar.

3.2.2 Definições dos casos de colonização e infecção hospitalar:

O critério para a classificação de casos de infecção ou colonização foi realizada pelo Centro de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH), do hospital em estudo pela medica responsável, Dra. Marina Moreira juntamente com a enfermeira Teresinha Ferreira, responsável pela busca ativa, dos casos e compilação dos dados, por meio de critérios específicos definidos pela *Centers for Disease Control and Prevention* (C.D.C), americana e da portaria nº2.616 da ANVISA que se baseam em evidências clínicas, derivadas da observação direta do paciente ou da análise do seu prontuário, resultados de exames de laboratório, ressaltando-se

os exames microbiológicos.

Além de critérios gerais importantes, para a classificação de infecção como:

- Quando, na mesma topografia em que foi diagnosticada infecção comunitária, for isolado um germe diferente, seguido do agravamento das condições clínicas do paciente, o caso deverá ser considerado como infecção hospitalar.
- Quando se desconhecer o período de incubação do microrganismo e não houver evidência clínica e/ou dado laboratorial de infecção no momento da internação, convencionam-se infecção hospitalar toda manifestação clínica de infecção que se apresentar a partir de 72 horas após a admissão.
- São também convencionadas infecções hospitalares aquelas manifestadas antes de 72 horas da internação, quando associadas a procedimentos diagnósticos e/ou terapêuticos, realizados durante este período.
- Os pacientes provenientes de outro hospital que se internam com infecção, são considerados portadores de infecção hospitalar do hospital de origem.

Os resultados da distribuição das espécies mais encontradas em cada setor analisado, bem como doença de base e a classificação de infecção hospitalar e casos de colonização, foram trabalhados no programa *Excel*, com realização de gráfico e tabelas.

3.2.3 Coleta

Foram estudadas 105 amostras de leveduras, isoladas de 954 espécimes clínicos 67 pacientes, de diversos materiais, no período de Fevereiro de 2002 a Fevereiro de 2003, com a aprovação da Comissão de Ética do HUT (anexo A).

Estes pacientes foram submetidos a um protocolo básico individual de avaliação, sendo registrados dados referentes à idade, sexo, tipo de material a ser analisado, setor de internação, patologia(s) de base, uso de antifúngicos, corticóides, radioterápicos, quimioterápicos e tempo de internação dos mesmos (Anexo B).

As amostras utilizadas fazem parte de um estudo em comum, realizado no estado de São Paulo, entre a Universidade de São Paulo (USP), Instituto Adolfo Lutz (IAL) e o Hospital Universitário de Taubaté (HUT).

Os diversos espécimes clínicos e materiais médicos, foram colhidos de pacientes com suspeita clínica de infecção hospitalar (tempo de internação superior a 72 horas) nos setores pré - selecionados do HUT. Os dados dos pacientes encontram-se arquivados no Laboratório de Microbiologia e no Serviço da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do HUT.

Com a aprovação da Comissão de Ética do HUT (Anexo A), as coletas foram realizadas, em cada setor selecionado, por profissionais devidamente treinados. O material coletado foi introduzido, imediatamente, em meio de transporte Stuart (DIFCO), com exceção das hemoculturas que foram coletadas em meio de “Brain Heart Infusion” bifásico (BHI-IAL). Foram analisados apenas pacientes com suspeita clínica de infecção hospitalar (tempo de internação superior a 72 horas). Em seguida o material, devidamente identificado, foi encaminhado ao Laboratório de Microbiologia do HUT, o qual foi submetido ao registro e a sementeira em tubo com meio de ágar Sabouraud Dextrose com Cloranfenicol inclinado e incubado a 30° C até 5 dias, para posterior identificação.

Uma alternativa para o isolamento e diferenciação da maioria das espécies patogênicas de *Candida* foi o uso do CHROMagar, onde após a incubação a 30° C por 48 horas, as colônias de *C. albicans* apresentam coloração verde, *C. tropicalis* azul, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii* rosa, *C. parapsilosis* e *C. lipolytica* coloração creme.

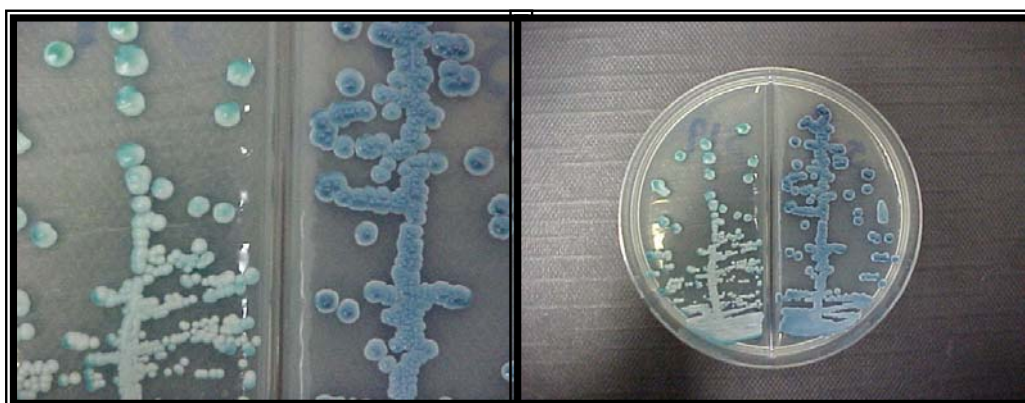


Figura5. Obtenção de colônias de levedura, de *C. albicans* e *C. tropicalis*, respectivamente, após crescimento em CHROMagar®, em maior e menor aumento.

3.2.4 Identificação das leveduras isoladas

3.2.4.1 Método Clássico

Todos os espécimes clínicos positivos para leveduras foram enviados ao setor de Micologia do Laboratório 1 de Taubaté do Instituto Adolfo Lutz (IAL) duas vezes por semana, onde foram registrados, analisados e identificados de acordo com o protocolo de identificação de leveduras, segundo técnicas do Manual “The Yeasts”(KURTZMAN e FELL, 1998) e as amostras de *Trichosporon* foram identificadas segundo Gueho et al, 1992; pelo kit comercial API 20 C e pela Ribotipagem.

As culturas positivas, que apresentaram colônias leveduriformes, foram analisadas através do exame direto com azul de lactofenol, para a confirmação microscópica das células características. Em seguida, foram repicadas em CHROMagar *Candida* e feitos tantos repiques quantos fossem as variantes morfológicas apresentadas neste meio, isolando-se assim as colônias morfológicamente distintas em ágar Sabouraud Dextrose (DIFCO) em placas.

3.2.4.2 Método Comercial API 20C AUX (Biomeriex)

É um sistema preciso de identificação de leveduras freqüentemente encontrada em material clínico.

A galeria API 20C AUX consiste em 20 cúpulas contendo substrato desidratado que permite execução de 19 testes de assimilação de carboidratos (identificação bioquímica).

As cúpulas são inoculadas e as leveduras somente crescerão se elas forem capazes de utilizar cada substrato como única fonte de carbono.

A leitura destas reações se tem se dá através da comparação com o controle de crescimento (1ª cúpula controle negativo e a 2ª cúpula controle positivo), e a identificação é obtida referente a um catálogo analítico ou usando o programa de informática de identificação.

3.2.4.3 Método Molecular - Ribotipagem

Células provenientes de uma cultura fresca foram submetidas ao protocolo extração de do DNA genômico conforme descrito por Philippsen et al. (2004). Para identificação por similaridade, amplificamos a região D1/D2 do rDNA 28S. A reação de PCR foi realizada com o Kit Go Taq (Promega). Para uma reação de 25 μ l, foi utilizado 1X do tampão para PCR, 3 mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,4 μ M dos iniciadores Uni-f e Uni-r (DONELLY et al., 1999), 5 μ l do produto total de extração, 0,2 μ l de Taq DNA polimerase (5U/ μ l) e água desmineralizada esterilizada q.s.p. A amplificação foi realizada no termociclador Express Thermal Cycler (Hybaid Limited) e constou de uma desnaturação inicial a 95°C por 3 min, seguida de 30 ciclos de: 30 s a 95°C, 30 s a 58°C e 50 s a 72°C.

Uma vez que tinha – se colônias puras, optamos pelo sequenciamento direto do produto da PCR, assim, os amplicons foram usados como template para a reação de seqüenciamento e foi utilizado o Kit DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing (Amersham Biosciences), tanto a reação quanto a termociclagem seguiram os padrões do manual, alterando-se os primers para os mesmos usados na amplificação e com a mesma concentração. A determinação das sequencias foi realizada pelo seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems). As configurações do aparelho adotadas seguiram as recomendações do fabricante.

As sequências obtidas foram analisadas através do programa SeqMan™ II (DNA Star Inc.). As comparações dos arquivos foram realizadas com o banco de seqüências nucleicas não redundantes (nr), obtido do banco de dados do GenBank (NCBI) (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/db) (atualizado em abril de 2009), utilizando o programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Altschul et al, 1997), configurado na opção “blastn”.

3.3 Fatores relacionados à virulência das leveduras

Os testes foram realizados empregando a cepa-padrão de *Candida albicans* (ICB-12A) como controle positivo. A atividade enzimática (Pz) foi mediada segundo Price et al. (1982), utilizando a razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação (dcp), ou seja, $Pz=dc/dcp$. Os resultados de Pz foram considerados da seguinte maneira: (1) negativa ($PZ=1$), (2) positiva ($PZ \geq 0,64 < 1,0$) e (3) fortemente positiva ($PZ < 0,64$).

3.3.1 Pesquisa de proteinase

Este estudo foi baseado no procedimento descrito por Ruchel et al, 1982. O meio básico esterilizado foi resfriado a 50° C, na qual foi adicionado o meio de albumina e então, a mistura foi distribuída em placas de Petri em volume de 20 mL. Após a solidificação da mistura foram semeados quatro isolados de leveduras por placa com alça de platina calibrada. As placas foram incubadas à 37° C durante 96 horas. A presença da enzima foi detectada pela formação de um halo claro de degradação da albumina ao redor das colônias de leveduras. A atividade enzimática (Pz) foi medida de acordo com a técnica de Price et al, 1982.

3.3.2 Pesquisa de fosfolipase

O meio básico foi preparado contendo 1% de peptona, 2% de dextrose, 6 % de cloreto de sódio, 0.06% de cloreto de cálcio. Este meio foi enriquecido com gema de ovo e posteriormente distribuído em placas. Foram semeados quatro isolados de leveduras por placa com alça de platina calibrada. As placas foram incubadas à 37° C durante 96 horas. A presença da enzima foi detectada pela formação de um halo opaco de precipitação ao redor da colônia de levedura. A atividade enzimática (Pz) foi medida de acordo com a técnica de Price et al, 1982 da mesma maneira que para a atividade de proteinase.

3.4 Teste de sensibilidade aos antifúngicos

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antifúngicos – “kit” comercial Etest (AB Biodisk, Solna, Suécia):

Neste teste foi utilizado o sistema comercial E-test (AB-Biodisk, Solna, Suécia), incluindo os antifúngicos seguintes: fluconazol, itraconazol, cetoconazol, voriconazol, anfotericina B e 5- Fluorцитosina.

3.4.1 Processamento do teste

Inicialmente, 105 amostras de leveduras foram subcultivadas em ágar Sabouraud-dextrose (Difco) por 24 horas a 37° C. O inóculo de cada amostra de levedura foi preparado a partir de suspensão em salina estéril ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland. A amostra foi, então, semeada em estrias na superfície de placas de Petri contendo ágar RPMI 1640 + 2% de glicose + MOPS conforme recomendado pelo fabricante. As fitas do Etest produzidas pela AB Biodisk (Solna, Suécia) são plásticas e contém um gradiente definido e contínuo do antifúngico. Cada fita contém um gradiente de concentração correspondente a 0,016 a 256µg/mL para fluconazol e 0,002 a 32µg/mL para cetoconazol, itraconazol, voriconazol, anfotericina B e 5 - fluorцитosina. Estas fitas contendo os antifúngicos foram aplicadas cuidadosamente sobre a superfície do ágar e então incubadas a 35° C durante 24 – 48 horas. Para controle, foram incluídas no teste, *C. parapsilosis* ATCC (American type culture collection) 22019 e *C. krusei* ATCC 6258.

A leitura do teste foi feita de acordo com as instruções da AB Biodisk (1993) considerando a CIM de cada antifúngico para cada uma das amostras.

3.4.2 Interpretação dos resultados

O critério de sensibilidade/resistência aos antifúngicos fluconazol e voriconazol foi aquele recomendado pelo CLSI (documento M27-A2, 2002 e suplemento M27-S3, 2008) que preconiza de acordo com a tabela abaixo os seguintes valores de concentrações de antifúngicos para avaliar a sensibilidade ou resistência aos fármacos pela técnica da microdiluição.

TABELA 1. Interpretação do comportamento de cepas de *Candida* spp. Segundo normas do CLSI (M27A2 – 2002), frente à concentração dos antifúngicos ($\mu\text{L}/\text{mL}$).

Agentes antifúngicos	Sensíveis	Sensível Dose Dependente	Resistente	Referência
Fluconazol	≤ 8	16-32	≥ 64	M27-A2/2002
Itraconazol	$\leq 0,125$	0,25-0,5	≥ 1	M27-A2 /2002
Anfotericina B	-	-	>2 (sugere-se)	M27-A2 /2002
Voriconazol	≤ 1	2	≥ 4	M27-S3 /2008
5-fluorocitosina	≤ 4	-	≥ 32	M27-S3/2008

O critério não estipula valores para cetoconazol que é considerada uma droga fungistática. Apenas indica que a maioria dos valores são encontrados entre 0,03 e 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para os isolados clínicos (M27-A2,CLSI). Neste estudo, valores acima de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foram considerados como resistência.

Para voriconazol, cepas com CIMs acima de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foram consideradas resistentes,segundo o documento do M27-S3, 2008. Para 5 fluorocitosina, as cepas foram

consideradas resistentes quando mostravam CIMs maiores que 32 µg/mL (Pfaller et al., 2008).

3.7 Técnicas para diferenciação de *C. albicans* e *C. dubliniensis*

3.7.1 Testes Fenotípicos

As amostras identificadas pelo método tradicional como sendo *C. albicans* foram semeadas em meio cromogênico (CHROMagar *Candida*, Difco, EUA) e incubadas a 32° C por até 3 dias. A presença de colônia verde clara foi indicativo de *C. albicans* e colônias verde escura indicativo de *C. dubliniensis*. O teste do crescimento a 42° C foi realizado segundo Sullivan e Coleman, 1998. Amostras que semeadas em ágar Sabouraud dextrose (Difco-Massachussets, EUA) com crescimento a esta temperatura foi sugestivo de *C. albicans* e amostras que não cresceram sugestivas de *C. dubliniensis*. Para controle positivo utilizamos a cepa *C. albicans* ATCC 64548 e *C. dubliniensis* ATCC 777.

3.7.2 Testes genotípicos

3.7.2.1 Extração do DNA das amostras de leveduras para diferenciação molecular entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*.

Foi realizada a técnica de PCR, com extração de DNA de acordo com Scherer e Stevens, 1987. Amostras de *C. albicans* foram cultivadas em tubos contendo 5 mL de YPD (“Yeast Peptone Dextrose” – Difco, Detroit, EUA) líquido por 18 horas, sob agitação a 37° C. Após a incubação, o meio líquido contendo o crescimento da levedura foi transferido para Eppendorf de 1,5mL contendo 1,0 mL de tampão SET (Tris 20mM, EDTA 25mM, NaCl 75mM, pH 8,0) para serem lavadas. Foram então adicionados 300µL de lisozima (Amersham-Pharmacia, EUA) em uma concentração de 3,0mg/mL em tampão SET, e os tubos foram incubados a 37° C durante uma hora. A seguir, cerca de 5µL de RNase a

10,0mg/mL (Amersham-Pharmacia, EUA) foi adicionada e a mistura foi incubada a 37° C por 30 minutos. Após, foi acrescentados 50µL de SDS (Sodium dodecyl sulphate – Sigma, St. Louis, EUA) a 10% e 10µL de proteinase K a 10,0mg/mL (Invitrogen, Brasil). A mistura foi incubada a 37° C por uma hora, após o qual foram acrescentados 150µL de acetato de sódio (Merck, Germany) a 3 Me mantidos em gelo durante 20 minutos. Cerca de 500µL da mistura fenol-clorofórmio-álcool isoamílico na proporção 25:24:1 (Amersham-Pharmacia, EUA) foi adicionada, misturadas 50x por inversão e centrifugadas a 5000 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para outro tubo Eppendorf de 1,5mL. A mistura clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 foi adicionada e após serem 50 vezes misturados por inversão, foram centrifugados a 5000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido em outro Eppendorf com igual volume de álcool isopropílico (Amersham-Pharmacia). O tubos foram mantidos em gelo seco por 20 minutos. Os tubos foram centrifugados durante 30 minutos 10000 x g e o sobrenadante descartado. Etanol a 70% foi adicionado à mistura e centrifugados a 10000 x g durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado novamente, e o tubo foi secado a temperatura ambiente. O DNA presente no sedimento dentro do tubo foi ressuspendido em 25µL de tampão TE 1X (Tris 0,01M, EDTA 1mM e pH 7,5). A quantificação do DNA extraído foi realizada por dosagem espectrofométrica a 260nm (Beckman DU 640, EUA).

3.7.2.2 Visualização do DNA extraído

Gel de agarose 0,8% foi preparado com tampão TBE (Tris 0,09M; ácido bórico 0,09M, EDTA 2mM, pH8,0) 1X. O tampão de corrida foi a solução TBE 1X. O gel teve capacidade para 8 poços. No primeiro poço foi depositado a mistura de 1 µL do marcador de peso molecular – fago ϕ digerido com *Hind III* (Amersham-Pharmacia) com 4µL de corante azul de bromofenol (Invitrogen, Brasil) e 4µL de TE. Nos demais poços foi depositada a mistura

de 5µL de DNA da amostra e 5µL de corante. A corrida foi realizada a 90V por 30 minutos, posteriormente corado com solução de 2µg/mL de brometo de etídio (Sigma, St. Louis, EUA) durante 15 minutos. A visualização do DNA extraído foi realizada com auxílio do equipamento GEL DOC 1000 sob iluminação de luz ultravioleta, com o programa “Molecular Analyst” (Versão 1.4.1. Bio-Rad).

3.7.2.3 Reação de PCR

Para a reação de PCR foi utilizado dois pares de primers: um para *C. albicans* e um para *C. dubliniensis* (Maranelli et al., 1998).

C. albicans:

Sense: CAL 5 5' TGT TGC TCT CTC GGG GGC GGC CG 3'

Anti-sense: NL4CAL 5' AAG ATC ATT ATG CCA ACA TCC TAG GTA AA 3'

C. dubliniensis:

Sense: CDU2 5' TGT TGC TCT CTC GGG GGC GGC CG 3'

Anti-sense: NL4CAL 5' AAG ATC ATT ATG CCA ACA TCC TAG GTA AA 3'

Para o preparo do mix de 25µL foram colocados em tubo Eppendorf, tampão com 2mM de MgCL₂ (Biotools, Brasil), 0,2mM de dNTP (Biotools, Brasil), 0,5mM de cada primer (Invitrogen, Brasil), 1,2U de taq polimerase (Biotools, Brasil), 10ng de DNA da amostra e H₂O miliQ para completar o volume. A amplificação foi realizada em termociclador (MJ Bio Research, EUA) com a programação: denaturação inicial 3' a 98°C seguida de 35 ciclos

de 1' a 95°C (denaturação); 1,5' a 52°C (anelamento); 1,5' a 72°C (extensão) e extensão final de 10' a 72°C. A presença do fragmento amplificado ou não foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1,2% e utilização do peso molecular de 100pb (Invitrogen, Brasil). O gel foi corado com brometo de etídio (Sigma, St. Louis, EUA) (2µg/mL) e a visualização do produto do PCR foi realizada com auxílio do equipamento GEL DOC 1000 sob iluminação de luz ultravioleta com o programa “Molecular Analyst™” (versão 1.4.1., Bio Rad) As cepas utilizadas para os testes genotípicos foram os mesmos dos testes fenotípicos: ATCC 64548 (*C. albicans*) e 777 (*C. dubliniensis*)

3.8 Análise Estatística

Para os dados referentes ao teste de sensibilidade aos antifúngicos foi aplicado o teste de Tuckey e realizada a análise de variância (ANOVA) c nível de significância de 5%. Para os demais dados, o tratamento estatístico não se aplicou.

4 RESULTADOS

Foram analisados 954 espécimes clínicos: líquido, secreções diversas, ponta de cateter, sonda vesical, sangue, líquido ascítico, lavado brônquico, lavado gástrico, intracath, líquido peritoneal, úlceras por pressão (escaras), fragmento ósseo, das quais 105 foram positivas para leveduras.

4.1 Identificação por métodos clássicos, kit comercial (API 20 C) e ribotipagem:

O resultado da comparação entre os três métodos de identificação está representado no quadro abaixo (quadro 1). A coluna onde aparece % e T refere-se aos resultados do API, onde: a % é a chance da amostra ser daquela determinada espécie e T um índice de confiança do resultado, quanto mais próximo de 1 maior é semelhança com as cepas controle usadas na validação do método. Na última coluna podemos observar o resultado da ribotipagem por sequenciamento, para todas elas teve uma porcentagem de 100% de semelhança com os dados disponíveis no banco do NCBI e o $evaluate = 0,0$, para o $evaluate$ quanto mais próximo de zero melhor. O cálculo do $evaluate$ leva em conta vários fatores, como o tamanho da sequência que estamos comparando, quantas identidades foram encontradas e quantas penalidades foram verificadas. Nesse caso, tivemos 100% de identidade e nenhuma penalidade, por isso ele deu zero.

Observa-se ainda, uma não concordância de identificação entre os métodos genotípicos e molecular em 4 amostras, assinaladas, representando cerca de 3,8% das amostras avaliadas.

Quadro 1. Comparação dos métodos de identificação fenotípicos e genotípicos das amostras de leveduras.

Nº	Código	Assimilação/ Fermentação	API			Identificação Molecular
			Espécies	%	T	
1.	SK 001	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
2.	SK 002	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	93,6	0,57	<i>C. parapsilosis</i>
3.	SK 003	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
4.	SK 004	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	99,9	1,00	<i>C. parapsilosis</i>
5.	SK 005	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	88,9	0,89	<i>C. tropicalis</i>
6.	SK 006	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	88,9	0,89	<i>C. tropicalis</i>
7.	SK 007	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	99,9	0,68	<i>C. parapsilosis</i>
8.	SK 008	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
9.	SK 009	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0	<i>C. tropicalis</i>
10.	SK 010	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	99,9	1,00	<i>C. parapsilosis</i>
11.	SK 011	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
12.	SK 012	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
13.	SK 013	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
14.	SK 014	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
15.	SK 015	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
16.	SK 016	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99,3	1,0	<i>C. glabrata</i>
17.	SK 017	<i>C. norvagensis</i>	<i>C. norvagensis</i> <i>G. capitatum</i>	43,8 41,4	1,0 1,0	<i>G. capitatum</i>
18.	SK 18	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	81,2	0,92	<i>C. kefir</i>
19.	SK 19	<i>H. polymorpha</i>	<i>H. polymorpha</i>	-	-	<i>O. thermophila</i>
20.	SK 21	<i>T. asahii</i>	<i>T. asahii</i>	99,9	0,9	<i>T. asahii</i>
21.	SK 020	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
22.	SK 022	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	99,9	1,00	<i>C. parapsilosis</i>
23.	SK 023	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
24.	SK 024	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
25.	SK 025	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
26.	SK 026	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	99,9	1,00	<i>C. parapsilosis</i>
27.	SK 027	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
28.	SK 029	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
29.	SK 030	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
30.	SK 031	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
31.	SK 032	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99,3	1,0	<i>C. glabrata</i>
32.	SK 033	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0	<i>C. tropicalis</i>

33.	SK 034	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
34.	SK 035	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
35.	SK 036	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99,3	1,0	<i>C. glabrata</i>
36.	SK 037	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0	<i>C. tropicalis</i>
37.	SK 038	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	99,9	0,86	<i>C. parapsilosis</i>
38.	SK 039	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99,3	1,0	<i>C. glabrata</i>
39.	SK 040	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99,3	1,0	<i>C. guilliermondii</i>
40.	SK 041	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0	<i>C. tropicalis</i>
41.	SK 042	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	99,9	1,00	<i>C. parapsilosis</i>
42.	SK 043	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. guilliermondii</i>	84,3	1,00	<i>C. guilliermondii</i>
43.	SK 044	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	99,9	1,00	<i>C. parapsilosis</i>
44.	SK 045	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0	<i>C. tropicalis</i>
45.	SK 046	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
46.	SK 047	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0	<i>C. tropicalis</i>
47.	SK 048	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0	<i>C. tropicalis</i>
48.	SK 049	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	99,9	1,00	<i>C. parapsilosis</i>
49.	SK 050	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	88,9	0,89	<i>C. tropicalis</i>
50.	SK 051	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	88,9	0,89	<i>C. tropicalis</i>
51.	SK 052	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	99,9	1,00	<i>C. parapsilosis</i>
52.	SK 053	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	99,9	0,86	<i>C. parapsilosis</i>
53.	SK 054	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0	<i>C. tropicalis</i>
54.	SK 055	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
55.	SK 056	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
56.	SK 057	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0	<i>C. tropicalis</i>
57.	SK 058	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0	<i>C. tropicalis</i>
58.	SK 059	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	99,9	0,86	<i>C. parapsilosis</i>
59.	SK 060	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
60.	SK 061	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
61.	SK 062	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0	<i>C. tropicalis</i>
62.	SK 063	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. guilliermondii</i>	60,3	0,83	<i>C. guilliermondii</i>
63.	SK 064	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
64.	SK 065	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
65.	SK 066	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	88,9	0,89	<i>C. tropicalis</i>
66.	SK 067	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	88,9	0,89	<i>C. tropicalis</i>
67.	SK 068	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
68.	SK 069	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
69.	SK 070	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>

70.	SK 071	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	88,9	0,89	<i>C. tropicalis</i>
71.	SK 072	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
72.	SK 073	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
73.	SK 074	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
74.	SK 75	<i>C. rugosa</i>	<i>C. rugosa</i>	97,1	0,93	<i>C. metarugosa</i>
75.	SK 76	<i>C. rugosa</i>	<i>C. rugosa</i>	97,1	0,93	<i>C. metarugosa</i>
76.	SK 077	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
77.	SK 078	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
78.	SK 079	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99,3	1,0	<i>C. glabrata</i>
79.	SK 080	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	99,9	0,82	<i>C. parapsilosis</i>
80.	SK 081	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0	<i>C. tropicalis</i>
81.	SK 082	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0	<i>C. tropicalis</i>
82.	SK 083	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	88,9	0,89	<i>C. tropicalis</i>
83.	SK 084	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. guilliermondii</i>	99,7	0,99	<i>C. guilliermondii</i>
84.	SK 085	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
85.	SK 086	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
86.	SK 087	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
87.	SK 088	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei/ inconspicua</i>	96,2	1,00	<i>C. krusei</i>
88.	SK 089	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	99,9	0,86	<i>C. parapsilosis</i>
89.	SK 090	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	99,9	0,86	<i>C. parapsilosis</i>
90.	SK 091	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
91.	SK 92	<i>T.asahii</i>	<i>T.asahii</i>	99,9	0,9	<i>T.asahii</i>
92.	SK 093	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	99,9	1,00	<i>C. parapsilosis</i>
93.	SK 094	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
94.	SK 095	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0	<i>C. tropicalis</i>
95.	SK 096	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99,3	1,0	<i>C. glabrata</i>
96.	SK 097	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0	<i>C. tropicalis</i>
97.	SK 098	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	99,9	0,82	<i>C. parapsilosis</i>
98.	SK 099	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	99,9	0,82	<i>C. parapsilosis</i>
99.	SK 100	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	99,9	1,00	<i>C. parapsilosis</i>
100.	SK 101	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0	<i>C. tropicalis</i>
101.	SK 102	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	99,9	068	<i>C. parapsilosis</i>
102.	SK 103	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	95,7	1,0	<i>C. tropicalis</i>
103.	SK 104	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>
104.	SK 105	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	-	-	<i>C. albicans</i>

OBS: Amostra SK 28 = foi feito o seqüenciamento: *Pichia norvegensis* strain TY27 26S ribosomal RNA gene, partial sequence. Score = 837 bits (453), Expect = 0.0; Identities = 453/453 (100%) .

Esses dados estão dizendo que a possibilidade de ser *P. norvegensis* é de 100%.

1. Diferenciação da cepa de *C. albicans* e *C. dubliniensis*:

Testes fenotípicos e genotípicos para a diferenciação de C. albicans e C. dubliniensis. Através dos testes fenotípicos para diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis*, constatamos que todas as amostras classificadas como *C. albicans* apresentaram cor verde claro no meio cromogênico e crescimento a 42° C. Quanto ao teste genotípico, através da técnica de PCR, obtivemos o produto da reação específico para *C. albicans* pela presença da banda de 175 pb em 100% das amostras. Portanto, não ocorreu isolamento de *C. dubliniensis* (figura 07)

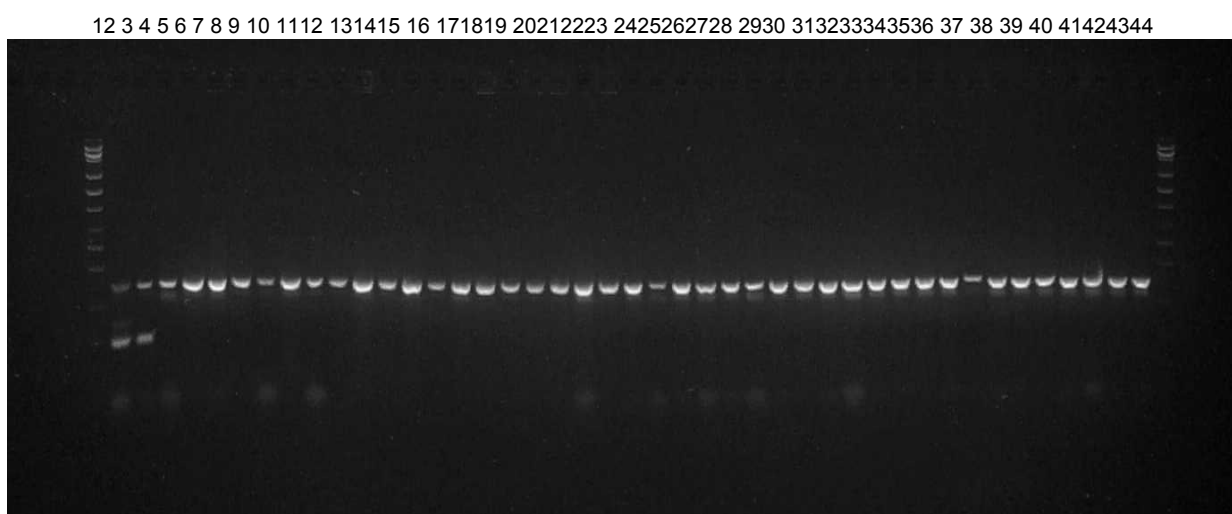


Figura 7. As três primeiras amostras são os controles: *C. dubliniensis* ATCC 777; *C. dubliniensis* ATCC 78157 e *C. albicans* ATCC1023. As demais, são de amostras de *C. albicans*, isoladas de pacientes, que começa no número 1 e termina no número 105, ordem crescente (4 -44).

Tabela 2. Frequência e distribuição das leveduras isoladas de diferentes materiais clínicos de pacientes internados no HUT – SP (Fevereiro de 2002 a Fevereiro de 2003).

Espécies	Sangue	Cateter Venoso	Ponta de Sondas	Secreções	Lavado Gástrico	Total (n=105)
<i>C. albicans</i>	6 (7,3%)	01 (1,8%)	6 (10,9%)	25 (16,4%)	2 (3,6%)	40 (40,0%)
<i>C. tropicalis</i>	2 (0,0%)	1 (1,8%)	13 (9,0%)	8 (14,6%)	1 (0,0%)	25 (25,5%)
<i>C. parapsilosis</i>	6 (5,5%)	6 (3,6%)	2 (1,8%)	7 (12,7%)	0 (0,0%)	21 (21,0%)
<i>C. glabrata</i>	0 (0,0%)	0 (0,0%)	5 (5,5%)	4 (3,6%)	0 (0,0%)	09 (9,0%)
<i>C. rugosa</i>	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (1,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	01 (1,0%)
<i>C. norvegensis</i>	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (1,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	(1,0%) (1,0%)
Total (n=100)	0 (12,7%)	4 (7,3%)	16 (29,1%)	26 (47,3%)	2 (3,6%)	100 (100,0%)

Os dados referentes aos testes de sensibilidade aos antifúngicos estão demonstrados na tabela 3, abaixo.

Tabela 3. Perfil de susceptibilidade de espécies de *Candida* isoladas de pacientes hospitalizados em Hospital Universitário de Taubaté – S.P, no período de 2002 a 2003.

Espécies	Antifúngico	Variação ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Susceptibilidade (%)
<i>Candida albicans</i>	Anfotericina B	0.012-0.064	0.011	0.013	100
	5-fluorocitosina	0.006- \geq 32.0	0.75	50.2	62
	Fluconazol	0.047-0.75	0.016	0.056	100
	Voriconazol	0.003-0.032	0.0015	0.016	100
	Itraconazol	0.006-0.94	0.0045	0.032	100
	Ketoconazol	0.004-0.25	0.0036	0.022	ND
<i>Candida tropicalis</i>	Anfotericina B	0.023-4.0	0.09	1.75	92
	5-fluorocitosina	0.002-32.0	0.9	44.0	72
	Fluconazol	0.094-3.0	0.25	1.2	100
	Voriconazol	0.006-0.19	0.009	0.01	100
	Itraconazol	0.047-8.0	0.18	1.0	72
	Ketoconazol	0.01-8.0	0.047	4.0	ND
<i>Candida parapsilosis</i>	Anfotericina B	0.012-12.0	0.75	2.0	76
	5-fluorocitosina	0.008-32.0	0.0075	52.3	67
	Fluconazol	0.125- \geq 64.0	0.31	80.0	86
	Voriconazol	0.004- \geq 4	0.0047	0.094	95
	Itraconazol	0.002-16.0	0.025	16.0	76
	Ketoconazol	0.002-16.0	0.16	2.0	ND
<i>Candida glabrata</i>	Anfotericina B	0.004-23.0	0.07	1.0	89
	5-fluorocitosina	0.016- \geq 32.0	0.17	39.0	78
	Fluconazol	0.094- \geq 64.0	60.0	88.0	33
	Voriconazol	0.003-0.25	0.0035	1.0	100
	Itraconazol	0.016- \geq 1.0	0.77	1.36	33
	Ketoconazol	0.008- \geq 32.0	1.5	54.0	ND

ND, ponto de corte não normatizado pelo CLSI.

Os isolados de *C. parapsilosis* analisados frente ao cetoconazol, itraconazol, fluconazol, anfotericina B e 5-fluorocitosina apresentaram, respectivamente, CIM média e desvio padrão de: 0,302 e 0,586; 0,770 e 1,458; 0,072 e 0,088; 2,504 e 3,177.

Já as cepas de *C. tropicalis* analisadas frente ao cetoconazol, itraconazol, fluconazol, anfotericina B e 5-fluorocitosina apresentaram, respectivamente, CIM média e desvio padrão de: 0,932 e 1,601; 0,602 e 2,123; 0,040 e 0,084; 2,143 e 1,823.

Os isolados de *C. glabrata* analisados frente ao cetoconazol, itraconazol, fluconazol, anfotericina B e 5-fluorocitosina apresentaram, respectivamente, CIM média e desvio padrão de: 0,400 e 0,548; 0 e 0; 0,15 e 0,335; 3,2 e 7,155. Não foi analisado o desvio padrão e a média da *C. norvegensis* por ser amostra única.

Dos antifúngicos testados, a 5-fluorocitosina foi a que mais apresentou ausência do halo de inibição, dando CIM > ou igual a 32µg/ml. Em contrapartida, o Itraconazol foi o antifúngico que mais apresentou halo de inibição correspondente à menor concentração do antifúngico ou igual a 0,002µg/ml.

Para a 5-fluorocitosina, 96,4% das amostras apresentaram CIM > 32 µg/ml (maior valor da escala de leitura).

Tabela.4 Distribuição dos pacientes internados, de Fevereiro de 2002 a fevereiro de 2003, nas unidades de um hospital Universitário segundo as características de idade, sexo, fatores de risco por doença de base, para ocorrência de colonização/infecção hospitalar por leveduras (n= 67 pacientes*).

Paciente	Casos Positivos
Sexo → Masculino/Feminino	10/28
Idade → Média	45
Doença de Base	
Câncer	08
Diabetes	10
Cirurgias em geral	06
Politraumatismo	05
Outros	09
Uso de Antibióticos	23
Uso de Antifúngicos	06
Total de pacientes cateterizados	30
Imunodeprimidos	09
Colonização	26
Infecção Hospitalar	22
Óbitos em relação aos casos de Infecção Hospitalar	11
Total	

* As 105 amostras representam um total de 67 pacientes, pois de um mesmo paciente se obteve mais de uma amostra.

3 DISCUSSÃO

A problemática que envolve este estudo está na importância da identificação das leveduras do gênero *Candida* e suas espécies para complementação do diagnóstico clínico dos casos de infecção e colonização, assim como em pesquisas especialmente nacionais relacionadas à esta levedura.

Previamente à realização dos experimentos, verificou-se as padronizações e preconizações existentes para sua realização, assim como os fatores importantes a serem avaliados com relação ao tipo de amostra analisada e os dados clínicos dos pacientes.

Como pudemos observar, a prevalência de colonização/infecção foi de 9,85%, onde justifica a realização de mais pesquisas neste campo para a caracterização desta levedura no ambiente hospitalar.

Relacionada a distribuição dos microrganismos presentes nas suspeitas clínicas de infecção hospitalar, a *Candida* ocupa a 2^a posição, evidenciando ainda mais a relevância da investigação para esta levedura.

Comparando-se o número total de amostras positivas obtidas no período estudado com os setores, pudemos observar um significativo número de amostras do setor de Clínica Médica em relação aos demais setores estudados: UTI neonatal, UTI adulto e Oncohematologia, não tendo, infelizmente literatura que indique a distribuição dos setores em relação às leveduras encontradas.

Em estudo realizado por RODERO et al. (1999), a distribuição das espécies obtidas de diversos materiais clínicos foi: *C. albicans* (50,6%), *C. tropicalis* (22,5%), *C. parapsilosis* (20,2%), *C. krusei* (3,4%), *C. glabrata* (2,2%) e *Debaryomyces krusei* (1,1%), similar ao nosso trabalho onde as espécies identificadas foram *C. albicans* (40,0%), *C. tropicalis* (25,5%), *C. parapsilosis* (23,6%), *C. glabrata* (9,1%) e *C. norvegensis* (1,8%),

observando-se que a *C. krusei* não foi encontrada em nossas pesquisas, mesmo sendo esta integrante das principais espécies de interesse médico encontradas na literatura (VOSS et al., 1996; PFALLER et al., 1998).

Da mesma forma que encontramos na literatura (ABI-SAID et al., 1997), a *Candida-não-albicans* tem demonstrado uma prevalência maior que a *Candida albicans*, com resultado de 60,0% para *Candida-não-albicans* e 40,0% para *Candida albicans* dos episódios, em nossa pesquisa e, 63,0% para *Candida-não-albicans* e 37,0% para os episódios de *Candida albicans* no estudo realizados por COLOMBO et al. (1999), mostrando assim a necessidade da identificação das espécies, visto que o tratamento antifúngico é diferente entre as espécies de *Candida* devido à resistência aos antifúngicos existentes.

A metodologia para o estabelecimento das CIMs de microrganismos, frente a diferentes antibióticos sempre foi tema de discussão, devido à importância de uma boa reprodutibilidade de dados entre diferentes laboratórios (COLOMBO et al., 1995).

Em contraste aos resultados obtidos na rotina laboratorial comparando o “Etest” contendo antibacterianos com os métodos de referências do NCCLS (“*National Committee for Clinical Laboratory*”), há poucas informações sobre o desempenho do “Etest” com antifúngicos .

Os antifúngicos realizados pelo método da fita de “Etest”, demonstraram ser práticos, rápidos e apropriados para a rotina de laboratório, especialmente em emergências clínicas.

Em nosso estudo, observamos o feito “trailing” (microcolônias dentro do halo de inibição) frente aos compostos azólicos (Anexo 6). No entanto estes resultados não chegaram a constituir um problema na determinação das CIMs.

Para facilitar o uso do “Etest” em isolados clínicos de leveduras e, permitir a comparação dos resultados entre tais estudos, o desenvolvimento de uma metodologia padronizada é de grande prioridade. Além disso, estudos multicêntricos de várias amostras de *Candida* sp. são necessários para avaliar a eficácia do “Etest” (PFALLER et al., 1996).

Pudemos observar que, 96,4% das amostras se apresentaram “resistentes” à 5-fluorocitosina, pelo grande número de amostras com ausência do halo de inibição fúngica, da mesma forma que encontrada em literatura, onde por este motivo, essa droga quase nunca é utilizada sozinha na terapia antifúngica (SIDRIM & MOREIRA, 1999).

C. albicans é a levedura mais isolada nas colonizações, mas também é a espécie mais invasiva e foi descrita sendo a mais sensível ao fluconazol com CIM 90 $\leq 1\mu\text{g/mL}$ (SAFDAR et al., 2001). Em nosso estudo, a maior CIM 50 para o fluconazol foi encontrada nas amostras de *C. albicans*, seguida de *C. parapsilosis* e *C. krusei*. Porém, a maior CIM 90 para fluconazol foi observada para *C. krusei*, seguida de *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Apesar de *C. krusei* ser uma espécie relatada como intrinsecamente resistente ao fluconazol (WINGARD et al., 1991) o teste “in vitro” mostrou sensibilidade das amostras frente a este antifúngico. Estes dados corroboram com os achados de MATSUMOTO et al, 2001; MATSUMOTO et al., 2007). Estas cepas deverão ser melhor estudadas e podemos realizar outros testes de sensibilidade “in vitro” como o CLSI e EUCAST. O fluconazol é o azol mais estudado em neonatos, incluindo sua farmacocinética (SAXEN et al., 1993). A dosagem utilizada neonatos foi descrita em estudo empregando este fármaco como profilático durante, uma epidemia por *C. parapsilosis*. (SAXEN et al., 1995).

Convém salientar que as maiores CIMs foram encontradas em amostras provenientes do sangue e cateter. Apesar dos valores serem menores que $1\mu\text{g/mL}$ é importante relatarmos os dados obtidos uma vez que a administração de antifúngicos, especialmente do fluconazol,

tem sido descrita como uma forma de reduzir a colonização e, conseqüentemente, a infecção por leveduras (BERTINI et al., 2005; HEALY et al., 2005). *C. glabrata* e *C. parapsilosis* vêm mostrando resistência após exposição ao fluconazol fato que pode modificar a prevalência de *C. albicans* por espécies não *albicans* (CASTAGNOLA et al., 2004). Porém, há controvérsias, conforme Manzoni et al. (2008) têm relatado o uso de fluconazol como um antifúngico que não seleciona cepas resistentes. É importante ressaltar que o uso profilático por antifúngicos deve ser melhor estudado levando-se em conta a gravidade do estado geral do neonato. Já tem sido descrito casos de infecção por fungos filamentosos em substituição as infecções por *Candida* spp devido ao amplo uso de triazólicos em pacientes imunocomprometidos (CASTAGNOLA et al.,2004).

As amostras de *C. parapsilosis* mostraram maior CIM 50 para anfotericina B, e maior CIM 90 para fluconazol. Pappas et al. (2004) relataram que anfotericina B e fluconazol são as drogas de escolha para tratar candidemia em neonatos. A anfotericina B deoxicolato é nefrotóxica e esta toxicidade para os neonatos é similar à dos adultos (FRATTARELLI et al., 2004). As formulações lipídicas da anfotericina são indicadas como tratamento de primeira linha, bastante utilizado por neonatologistas, quando pacientes de alto risco desenvolvem intolerância à anfotericina B, ou quando apresentam outros problemas, inclusive insuficiência renal. (ROWEN, 2001; RUEDA, 2006).

Krebs et al., 1999 avaliaram a eficácia da formulação lipídica da anfotericina B em neonatos com candidíase sistêmica, durante o período de 1994 a 1996. Concluíram que o tratamento com formulação lipídica foi mais efetivo e com diminuição dos efeitos colaterais em comparação com o uso da anfotericina convencional.

A CIM 50 do voriconazol foi maior frente a *C. albicans*. O voriconazol é um derivado sintético do fluconazol e tem sido ativo contra cepas de *C. krusei* e *C. glabrata*.

Tem sido descrito como um fármaco seguro em neonatos (KULLBERG et al., 2005; KOHLI et al., 2008).

A maior CIM 50 do itraconazol foi averiguada em *C. krusei*. Este antifúngico assim, como cetoconazol raramente são utilizados em neonatos (ROWEN, 2001). Itraconazol é uma droga recente em relação ao cetoconazol e provoca menos hepatotoxicidade. Porém ambos tem demonstrado efeito fungistático o que não justifica substituir a anfotericina B em associação com fluconazol no tratamento dos neonatos (BLISS et al., 2003).

Os pacientes que mais apresentaram colonização e infecção de leveduras encontrados foram aqueles possuíam doenças de base, faziam uso de antibióticos, tinham cateter venoso, da mesma forma que relatada em estudo realizado por LUNEL et al. (1999), sendo que dos casos de infecção hospitalar 50% dos pacientes foram a óbito.

O “E-test” é um método comercial aprovado pelo “Food Drug Administration” (FDA) o qual apresenta uma boa correlação com a metodologia de referência. Este método pode ser aplicado dentro da prática laboratorial. Atualmente, é importante ressaltar, que este teste está em fase final de implementação em rotina laboratorial de vários hospitais (MOTTA, A.L. et al, 2010).

5 CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos através dos exames laboratoriais executados das amostras biológicas dos pacientes internados no HUT com suspeita de infecção hospitalar no período de Fevereiro de 2002 a fevereiro de 2003, revelaram que leveduras do gênero *Candida* ocuparam a 2ª posição dentre os agentes isolados, sendo responsável por 9,85% de positividade para infecção e colonização.
- Pudemos observar que a unidade de Clínica Médica foi o setor de onde se obteve mais amostras positivas para leveduras (63,6%), seguido por UTI neonatal (20%) e UTI adulto (16,4%), sendo que, da Oncohematologia não obtivemos amostra positiva, podendo este fato estar relacionado ao número reduzido de amostras que obtivemos desta unidade.
- Das amostras analisadas positivas para leveduras, observou-se que a *Candida albicans* apresenta a maior prevalência, seguida da *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. No entanto, torna-se relevante expor que as leveduras não- *albicans* superaram a *C. albicans* em 60% das amostras.
- Secreções de sítios variados, foram os materiais biológicos mais freqüentes de amostras positivas para *Candida* (47,3%), sendo as leveduras comumente identificadas: *C. albicans* (16,4%), *C. tropicalis* (14,6%) e *C. parapsilosis* (12,7%).
- As pontas de sonda analisadas ocuparam o segundo lugar dos materiais biológicos positivos para leveduras analisados (29,1%), sendo os agentes mais encontrados *C. albicans* (10,9%) e *C. tropicalis* (9,0%) seguidos em menor percentagem pela *C. glabrata* (5,5%), *C. parapsilosis* (1,8%) e *C. norvegensis* (1,8%).
- *C. albicans* esteve presente na totalidade dos casos positivos envolvendo lavado gástrico (3,6%).

- *C. parapsilosis* foi o agente mais frequentemente isolado de cateter venoso (3,6%), seguido de *C. albicans* (1,8%) e *C. tropicalis* (1,8%).
- Desta maneira, evidenciou-se que os achados laboratoriais são de grande importância para a complementação do diagnóstico clínico de candidose, no que se refere à identificação das espécies e tratamento a ser empregado.
- Cepas de *C. albicans* isoladas dos diversos materiais clínicos analisadas frente ao cetoconazol, itraconazol, fluconazol, anfotericina B e 5-fluorocitosina apresentaram, respectivamente, CIM média e desvio padrão de: 0,129 e 0,329; 0,396 e 1,275; 0,067 e 0,080; 0,853 e 0,642.
- Os isolados de *C. parapsilosis* analisados frente ao cetoconazol, itraconazol, fluconazol, anfotericina B e 5-fluorocitosina apresentaram, respectivamente, CIM média e desvio padrão de: 0,302 e 0,586; 0,770 e 1,458; 0,072 e 0,088; 2,504 e 3,177.
- Já as cepas de *C. tropicalis* analisadas frente ao cetoconazol, itraconazol, fluconazol, anfotericina B e 5-fluorocitosina apresentaram, respectivamente, CIM média e desvio padrão de: 0,932 e 1,601; 0,602 e 2,123; 0,040 e 0,084; 2,143 e 1,823.
- Os isolados de *C. glabrata* analisados frente ao cetoconazol, itraconazol, fluconazol, anfotericina B e 5-fluorocitosina apresentaram, respectivamente, CIM média e desvio padrão de: 0,400 e 0,548; 0 e 0; 0,15 e 0,335; 3,2 e 7,155.
- Não foi analisado o desvio padrão e a média da *C. norvegensis* por ser amostra única.
- Dos antifúngicos testados, a 5-fluorocitosina foi a que mais apresentou ausência do halo de inibição, dando CIM > ou igual a 32µg/ml. Em contrapartida, o Itraconazol foi o antifúngico que mais apresentou halo de inibição correspondente à menor concentração do antifúngico ou igual a 0,002µg/ml.

- Para a 5-fluorocitosina, 96,4% das amostras apresentaram CIM > 32 µg/ml (maior valor da escala de leitura).
- Observou-se um grande número de colonização por leveduras do gênero *Candida* e, dos casos de infecção hospitalar, 50% dos pacientes evoluíram ao óbito, denotando a importância da identificação dos casos e da existência de padronizações de medidas preventivas de infecção para estes fungos emergentes.

Considerações finais

Estas e muitas outras questões constituem o início de uma atividade essencial no controle de infecções hospitalares que seria a normatização dos procedimentos básicos.

Para cada cuidado prestado direta ou indiretamente ao paciente deve ser avaliado quanto ao potencial de transmissão de infecções, devendo-se no planejamento desta atividade levar-se em conta o risco, elaborando-se uma padronização adequada. Todos os funcionários devem ser continuamente reciclados nas medidas de controle, contribuindo para que cada um perceba seu papel no processo de cura do paciente.

Através da Sistematização da Assistência de Enfermagem (SAE), onde o enfermeiro determina o estado de saúde e identifica quaisquer problemas reais ou potenciais do paciente, diagnosticando e planejando a conduta a ser implementada; o enfermeiro pode avaliar todos os cuidados prestados direta ou indiretamente ao paciente a fim de se identificar problemas e apontar soluções, medir o risco de aquisição de infecção hospitalar, avaliando prioridades para o seu controle, sendo que, para o sucesso de um programa de controle de infecções hospitalares a integração das normas propostas para o controle e da prática individual de cada profissional de saúde é fundamental, e como resultado final teremos a qualidade da assistência ao paciente.

Como a maioria das instituições não está preparada para intervir nos episódios de candidíases e, através deste trabalho apresentamos as características das leveduras do gênero *Candida* assim como o perfil dos pacientes envolvidos neste episódios, servindo como base para os profissionais de saúde, visto que não existe atualmente uma padronização das medidas de prevenção e controle específicas para fungos sendo que estes ocupam uma posição de destaque perante os achados clínicos/laboratoriais e, o conhecimento e reconhecimento deste patógeno é de suma importância no que tange a qualidade da assistência de uma instituição.

Referências

ABI-SAID, D. et al. The epidemiology of hematogenous candidosis caused by different *Candida* species. **Clin Infect Dis.** .v.24, p.1122-1128, 1997

AGARWAL, J.; BANSAL, S.; MALIK, GK. Trends in neonatal septicemia: emergence of non-*albicans Candida*. **Indian. Pediatr.**, v.41, p.712-5, 2004.

BIZARRO, M.J.; RASKIND, C.; BALTIMORE, R.S. Seventy-five years of Neonatal Sepsis at Yale: 1928-2003. **Pediatrics**, v. 116, p. 595-602, 2005.

CHANG, M.R.; CORREIA, F.P.; COSTA, L.C.; XAVIER P.C.N.; PALHARES, D.B.; TAIRA, D.L.; PANIAGO, A.M.M.; PONTES, E.R.J.C.; MACHADO, V.E. *Candida* bloodstream infection: data from a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil . **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.**, v. 50, p. 265-268, 2008.

CIRAK, M.Y; KALKANCI, A; KUSTIMUR, S. Use of Molecular Methods in identification of *Candida* Species and Evaluation of Fluconazole Resistance. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.98, p. 1027-1032, 2003.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, p.599-607, 2003.

COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; PARK, B.J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **J. Clin. Microbiol.**, v.44, p. 2816-23, 2006.

COLOMBO, A.L., GUIMARÃES, T.; SILVA L.R. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 28, p. 570-6, 2007.

DIGNANI, M.C., SOLOMKIN J. S., ANAISSIE E. *CANDIDA*. IN: ANAISSIE E, MCGINNIS MR, PFALLER MA (eds) *Medical Mycology*. Filadélfia: Churchill Livingstone, 2003, p. 195-239.

EDMOND, M.B. et al. Nosocomial bloodstream infections in the United States hospitals: a three-year analysis. **Clin Infect Dis.**, v. 29, p. 239-244, 1999.

EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet. Infect. Dis.*, v. 3, p. 685-702; 2003.

FERNANDES, A.T.; FERNANDES, M.O.V.; RIBEIRO FILHO, N. **Infecção Hospitalar e Suas Interfaces na Área da Saúde**. São Paulo: Atheneu, p. 418-452., 2000.

FRIDKIN, S.K.; KAUFMAN, D.; EDWARDS, J.R.; SHETTY, S.; HORAN, T. Changing incidence of *Candida* bloodstream infections among nicu patients in the united states: 1995-2004. **Pediatrics**, v. 117, p. 1680-7, 2006.

GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 13, p. 122-43, 2002.

MÄHNSS, B; STHER, F; SCHÄFER, W; NEUBER, K. Comparison of standard phenotypic assays a PCR method to discriminate *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. **Mycosis**, v.48, p. 55-61, 2005.

MAROL, S.; YUCESYOY, M. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from clinical specimens of intensive care unit patients. **Mycoses**, v. 51, p. 40-49, 2008.

MATSUMOTO, F.E.; GANDRA, R.F.; RUIZ, L.S.; AULER, M.E.; MARQUES, S.A.V.; GAMBALE, W.; PIRES, M.F.C.; PAULA, C.R. Yeasts isolated from blood and catheter in children from a Public Hospital of São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v. 154, p. 63-69, 2001.

MATSUMOTO, F.E.; DIAS, A.L.T.; MELHEM, M.S.C.; SZESZS, M.A.; AULER, M.E.; RUIZ, L.S.; SILVA, E.G.; GANDRA, R.F.; PAULA, C.R. Antifungal susceptibility of bloodstream yeasts isolated at a public children's hospital in Brazil: comparison of the Etest and the AFST-EUCAST microdilution method. **Can. J. Microbiol.**, v.53, p. 1300-1306, 2007.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Portaria No 2616. 12 de maio de 1998.

NG, K.P.; SAW, T.L.; NA, S.L.; SOO-HOO, T.S. Systemic *Candida* infection in University Hospital 1997-1999: The Distribution of *Candida* Biotypes and antifungal susceptibility patterns. **Mycopathologia**, v. 149, p. 141-146, 2000.

PAULA, C.R.; MATSUMOTO, F.E.; MARQUES, S.A.; MELO, T.A.; GAMBALE W. Nosocomial yeast infection in a Public Children's Hospital of São Paulo, Brazil. In: Trends in Invasive Fungal Infections 5. 1999. **Abstracts**. Washington: American Society for Microbiology, 1999. p.152.

PFALLER, M.A. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. **Clin Infect. Dis**, v. 22, p. 89-94, 1996

PFALLER, M.A. et al. National epidemiology of mycoses survey: A multicenter study of strain variation and antifungal susceptibility among isolates of *Candida* species. **Diagn Microbiol Infect Dis**. v.31, p. 289-296, 1998.

PFALLER, M.A., DIEKEMA D.J., JONES R.N., SADER. H.S., FLUIT, A.C., HOLLIS, R.J., MESSER, S.A; Sentry Participant Group. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole and variconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the Sentry antimicrobial surveillance program. **J. Clin. Microbiol.**, p. 3254-3259, 2001.

PRICE, M.F.; WILKINSON, I.D.; GENTRY, L.O. Plate methods for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v.20, n.7, 1982.

REX, J.H. et al. A randomized and blinded multicenter trial of high-dose fluconazole (F) + placebo (P) vs F + amphotericin B (A) as treatment of candidemia in non-neutropenic patients. **Program and abstracts of the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. p. 16-19, 2001.

RUIZ, L.S.; SUGIZAKI, M. F.; MONTELLI, A. C.; MATSUMOTO, F. E.; PIRES, F.C.; DA SILVA, B. C. M.; SILVA, E. H.; GANDRA, R. F.; SILVA, E.G.; AULER M. E.; PAULA, C. R. Fungemia by yeasts in brazil: occurrence and phenotypic study of strains isolated at the Public Hospital, Botucatu, São Paulo. **J. Mycol. Med.**, v.15, p.12-21, 2005.

SADVEN, P. Epidemiology of candidemia. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 17, p. 73-81, 2000.

SOBBEL, J.D. et al. Candiduria: a randomized, double- blind study of treatment with fluconazole and placebo. **Clin. Infect. Dis.** v. 31, p. 19-24, 2000.

RÜCHEL, R. Proteinases of pathogenic fungi. **Mycoses**, v.42, p. 48-52, 1999.

RÜCHEL, R.; UHLEMANN, K.; BONING, B. Secretion of acid proteinases by different species of the genus *Candida*. **Zbl. Bakt. Hyg. I. Abst. Orig.**, v. 255: 237-248, 1982.

XISTO, S.P. et al. *Candida* colonization in intensive care unit patients urine. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 100, p. 925-928, 2005.

WENGEL, R.P.; GENNINGS, C. Bloodstream infections due to *Candida* species in the intensive care unit: identifying specially high – risk patients to determine prevention strategies. **Clin. Infect. Dis.**, v. 15, p. S389-S393, 2005.

ANEXOS

ANEXO A

FUNDAÇÃO UNIVERSITÁRIA DE SAÚDE DE TAUBATÉ

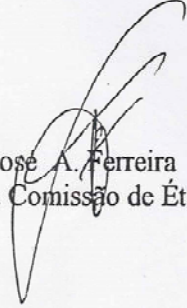
COMISSÃO DE ÉTICA MÉDICA

PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA MÉDICA SOBRE O PROJETO DE PESQUISA "INFECÇÃO NOSOCOMIAL POR LEVEDURAS DO GÊNERO CANDIDA"

À Sra. Sônia Khouri, Auxiliar de Ensino da UNIVAP –
Universidade do Vale do Paraíba.

Em resposta a vossa solicitação de parecer da Comissão de Ética Médica do Hospital Universitário de Taubaté, sobre o trabalho acima, que contará com a sua participação, vimos por meio deste comunicar que o protocolo deste trabalho foi por nós analisado, e a ele conferimos a nossa aprovação integral, visto que respeita todos os princípios éticos fundamentais da pesquisa biomédica, sem risco; devendo constar no mesmo, para cada paciente, o Termo de Consentimento Pós-Informado.

Taubaté, 23 de agosto de 2001.


Dr. Vicente José A. Ferreira
Presidente da Comissão de Ética Médica

ANEXO B

**BUSCA ATIVA
Ficha Simplificada**

Paciente: _____ RG: _____ Leito _____

Clínica: _____ Data de Internação: ____/____/____ Alta: ____/____/____

Diagnóstico: _____

HD: _____

Evolução: _____

Infecção Hospitalar: () não () sim Data ____/____/____

Sítio Infeccioso: _____

Dispositivo Relacionado:

início ____/____/____ início ____/____/____ início ____/____/____ início ____/____/____

término ____/____/____ término ____/____/____ término ____/____/____ término ____/____/____

Tipo de cirurgia e data quanto ao potencial de contaminação:

____/____/____ _____

____/____/____ _____

Antibiótico:

_____ início ____/____ início ____/____ início ____/____

término ____/____ término ____/____ término ____/____

_____ início ____/____ início ____/____ início ____/____

término ____/____ término ____/____ término ____/____

Agente Isolado: _____ Sítio: _____

Agente Isolado: _____ Sítio: _____

Agente Isolado: _____ Sítio: _____

Agente Isolado: _____ Sítio: _____