

VANESSA KUMMER PERINAZZO DE OLIVEIRA

Ocorrência das espécies de leveduras isoladas de sangue e cateter de pacientes internados em Hospital Público Infantil de São Paulo (período 2007 a 2010)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre de Ciências.

São Paulo
2011

VANESSA KUMMER PERINAZZO DE OLIVEIRA

Ocorrência das espécies de leveduras isoladas de sangue e cateter de pacientes internados em Hospital Público Infantil de São Paulo (período 2007 a 2010)

Dissertação apresentada ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Dra. Claudete Rodrigues Paula

Versão original

São Paulo
2011

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

© reprodução total

Oliveira, Vanessa Kummer Perinazzo de.

Ocorrência das espécies de leveduras isoladas de sangue e cateter de pacientes internados em Hospital Público Infantil de São Paulo (período 2007 a 2010) / Vanessa Kummer Perinazzo de Oliveira. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Claudete Rodrigues Paula.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Leveduras patogênicas: características fenotípicas e genotípicas.

Versão do título para o inglês: Yeasts species isolated from blood and catheter in patients admitted to Children's Public Hospital of São Paulo (period 2007 to 2010)

Descritores: 1. Infecção hospitalar 2. Leveduras 3. Candidemia 4. Cateter 5. *Candida albicans* 6. *Candida spp.* I. Paula, Claudete Rodrigues II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0184/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Vanessa Kummer Perinazzo de Oliveira.

Título da Dissertação: Ocorrência das espécies de leveduras isoladas de sangue e cateter de pacientes internados em Hospital Público Infantil de São Paulo (período 2007 a 2010).

Orientador(a): Claudete Rodrigues Paula.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

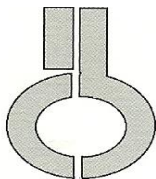
Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Nome completo:
Instituição:

Presidente: Nome completo:
Instituição:



**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) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 27 de outubro de 2010.

PARECER 970/CEP

A *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos* do ICB, na sessão de 26.10.2010, **APROVOU** o projeto intitulado: "Fenótipo de leveduras isoladas de sangue e cateter provenientes de Hospital Público Infantil (2010 e 2011). Comparação das espécies de leveduras isoladas no presente estudo com as espécies isoladas nos anos de 2009, 2008, 2007" sob responsabilidade de execução dos autores Profa. Dra. **CLAUDETE RODRIGUES PAULA** e a aluna **VANESSA KUMMER PERINAZZO DE OLIVEIRA**.

Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **26.10.2011**

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAOLO M. A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Dedico este trabalho a Deus pelo dom da vida,

Aos meus pais, Marino e Zuleika pelo amor incondicional e exemplo de vida,

Ao meu esposo Nélio pelo amor, apoio e incentivo em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial à Dra. Claudete Rodrigues Paula, pela oportunidade, orientação, confiança e amizade tão importantes para a minha formação profissional e humana.

À Universidade de São Paulo e ao Departamento de Microbiologia pela oportunidade.

Ao Hospital Infantil Darcy Vargas pela disponibilidade das amostras, em especial ao Dr. Wagner pela assistência e prontidão.

Às minhas colegas de laboratório que se tornaram minhas amigas: Débora e Carol, pelos ensinamentos e auxílio na realização dos experimentos. E a Elisângela, que chegou no laboratório de micologia apenas para “fazer uns experimentos” e hoje a consideramos parte do grupo.

Aos amigos de laboratório e do departamento por todo apoio e amizade: Pedro, Diana, Wanderson, Bruno, Ériques, Luciana, Satiko, Carlos, Lú, e a Alice da secretaria de pós pela atenção e esclarecimentos.

Aos professores do ICB pelo convívio e amizade professor Flávio Alterthum e Valderez Gambale.

Ao Dr. Arnaldo Lopes Colombo, pela colaboração e ao pessoal do laboratório de micologia da Unifesp, em especial à Ângela e Karina, pelos ensinamentos e ajudas nos experimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Aos meus irmãos Daniela, Juliana e Felipe, pelo carinho, amizade, apoio e torcida.

E a todos aqueles que por ventura não foram mencionados aqui, mas que contribuíram para este sonho, muito obrigada!

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

OLIVEIRA, V. K. P. **Ocorrência das espécies de leveduras isoladas de sangue e cateter de pacientes internados em Hospital Público Infantil de São Paulo (período 2007 a 2010).** 2011. 86 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Neste trabalho, investigamos a ocorrência de espécies de leveduras isoladas de sangue e cateter de pacientes internados em um hospital público infantil no período de 2007 a 2010. Pesquisamos a presença de *C. dubliniensis* pelos métodos fenotípicos; investigamos as espécies dentro do complexo *Candida parapsilosis* por meio da técnica do seqüenciamento; e estudamos as espécies do complexo *Candida parapsilosis* quanto a produção de biofilme. Também investigamos os fatores relacionados a virulência: proteinase, fosfolipase, hemolisina e hialuronidase; e estudamos o perfil de sensibilidade das amostras frente aos antifúngicos a anfotericina B, fluconazol e caspofungina pelo método “Etest[®]”. Observamos que, dentre os anos em estudo, *C. albicans* foi a levedura mais isolada com 36.45%, seguida de *C. tropicalis* 23.36%, *C. parapsilosis sensu stricto* 21.49%, *Pichia anômala* 5.61%, *C. guilliermondii* 4.67%, *C. krusei* 2.80%; *C. orthopsilosis* 1.87%, *C. glabrata* 1.87%, *C. metapsilosis* 0.94%, *C. pararugosa* 0.94%. Na pesquisa de *C. dubliniensis*, todas as amostras cresceram a 45°C, bem como, todas cresceram no “caldo Sabouraud dextrose” hipertônico, sendo, desta forma, identificadas como *C. albicans*. No seqüenciamento das amostras do complexo *Candida parapsilosis*, *C. parapsilosis sensu stricto* foi a espécie mais prevalente, representando 88,46% dos isolados, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* apresentaram apenas 7,69% e 3,85% respectivamente. Na produção de biofilme por amostras do complexo *Candida parapsilosis*, oito amostras de *C. parapsilosis sensu stricto* produziram biofilme, e apenas uma amostra de *C. orthopsilosis* foi produtora, enquanto que *C. metapsilosis* não produziu biofilme. Em relação aos fatores de virulência, as espécies não-*albicans* apresentaram maior atividade de proteinase e hialuronidase do que as *C. albicans*. No estudo das exoenzimas fosfolipase e hemolisina, *C. albicans* foi mais produtora, quando comparada com as espécies não-*albicans*. Das 107 amostras em estudo, frente ao antifúngico anfotericina B todas as amostras foram sensíveis. Com relação ao antifúngico fluconazol, 11 (10.3%) amostras demonstraram sensibilidade dose-dependente (SDD), e quatro (3.74%) foram resistentes. Em relação a caspofungina, duas amostras de *C. guilliermondii* foram resistentes, enquanto que as amostras de *C. parapsilosis* produziram os mais altos valores de CIM₅₀ do que as demais espécies. Dos antifúngicos em estudo, todos parecem ser mais ativos contra *C. albicans* que espécies não-*albicans*.

Palavras-chave: Infecção Hospitalar. Leveduras. Candidemia. Cateter. *Candida albicans*. *Candida spp.*

ABSTRACT

OLIVEIRA, V. K. P. **Yeasts species isolated from blood and catheter from patients admitted into Children's Public Hospital of São Paulo (period 2007 to 2010)**. 2011. 86 p. Masters thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

In this study, we investigated the occurrence of yeast species isolated from blood and catheter in a children's public hospital from 2007 to 2010. We researched the presence of *C. dubliniensis* by phenotypic methods, and investigated the species within the complex *Candida parapsilosis* by sequencing method, and studied this complex in relation to biofilm's production. We also investigated the factors related to virulence: proteinase, phospholipase, hemolysin and hyaluronidase, and studied the sensibility profile of the strains to the antifungals amphotericin B, fluconazole, and caspofungin by the "Etest[®]" method. We observed during the years of study, *C. albicans* was the most isolated yeast with 36.45%, followed by *C. tropicalis* 23.36%, *C. parapsilosis* sensu stricto 21.49%, *Pichia anomala* 5.61%, *C. guilliermondii* 4.67%, *C. krusei* 2.80%, *C. orthopsilosis* 1.87%, *C. glabrata* 1.87%, *C. metapsilosis* 0.94%, *C. pararugosa* 0.94%. In the research of *C. dubliniensis*, all strains grown at 45 ° C, and all grown up on "Sabouraud dextrose broth" hypertonic, thereby being identified as *C. albicans*. In the sequencing of samples belonging to *Candida parapsilosis* complex, *C. parapsilosis* sensu stricto was the most prevalent species representing 88.46% of the isolates, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* showed only 7.69% and 3.85% respectively. In relation of the biofilm production by strains of *Candida parapsilosis* complex, we observed that eight strains of *C. parapsilosis* sensu stricto produce biofilm, and only one sample of *C. orthopsilosis* was producer, while *C. metapsilosis* did not produce biofilm. Regarding the virulence factors, the non-*albicans* species showed greater activity of the proteinase and hyaluronidase than *C. albicans*. In the study of exoenzymes such hemolysin and phospholipase, *C. albicans* was more producer when compared with non-*albicans* species. Of the 107 samples analyzed, in relation of the antifungal susceptibility to amphotericin B, all strains were susceptible. With respect to the antifungal fluconazole, 11 (10.3%) strains showed dose-dependent sensitivity (DDS), and four (3.74%) were resistant. For caspofungin, two strains of *C. guilliermondii* were resistant, whereas those of *C. parapsilosis* produced the highest MIC₅₀ values than other species. Since the antifungal agents studied, all appear to be more active against *C. albicans* to non-*albicans* species.

Key words: Hospital Infection. Yeasts. Candidemia. Catheter. *Candida albicans*. *Candida spp.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 - CHROmagar [®] Candida.....	27
Figura 02 - Determinação da concentração inibitória mínima pelo método “Etest [®] ”.....	36
Figura 03 - Frequência das espécies de leveduras isoladas de sangue e cateter dos anos de 2007 a 2010 em Hospital Público Infantil.....	38
Figura 04 - Características da espécie <i>C. albicans</i> : tubo germinativo em soro fetal bovino a 37 °C e produção de clamidoconídios em “corn meal agar”.....	38
Figura 05 - Variação de espécies <i>C. albicans</i> e não- <i>albicans</i> de 2007 a 2010 em Hospital Público Infantil.....	39
Figura 06 - Relação de amostras de <i>C. albicans</i> e não- <i>albicans</i> isoladas nos anos em estudo (2007-2010) em Hospital Público Infantil.....	39
Figura 07 - Produto da PCR amostras Complexo <i>C. parapsilosis</i>	42
Figura 08 - Frequência de espécies de leveduras após seqüenciamento isoladas nos anos de 2007 a 2010.....	43
Figura 09 - Gel de agarose a 1%, produto da PCR amostras <i>Candida spp.</i> , <i>Pichia anomala</i>	44
Figura 10 - Produção de proteinase por amostra de <i>Candida albicans</i>	47
Figura 11- Produção de fosfolipase por amostras de <i>Candida albicans</i>	49
Figura 12 - Produção de hemolisina por amostra de <i>Candida albicans</i>	50
Figura 13 - Produção de hialuronidase por amostra de <i>Candida albicans</i>	51
Figura 14 - Esquema da concentração inibitória mínima pelo método “Etest [®] ”, por uma amostra de <i>Candida albicans</i>	52
Quadro 01 - Relação das amostras pertencentes ao Complexo <i>C. parapsilosis</i>	40
Quadro 2 - Relação das amostras de leveduras identificadas por seqüenciamento.....	44
Quadro 3 - Relação das espécies de leveduras identificadas fenotipicamente e por seqüenciamento.....	45
Quadro 4 - Relação da produção de biofilme apresentado pelas amostras do complexo <i>C. parapsilosis</i>	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade Enzimática conforme o PZ e o código.....	35
Tabela 2 – Interpretação do comportamento de cepas de <i>Candida spp.</i> segundo normas do CLSI (M27S3 – 2008), frente a concentração do antifúngico.....	36
Tabela 3 - Produção de fosfolipase pelas amostras de leveduras isoladas de sangue e cateter de 2007 a 2010 em Hospital Público Infantil.....	48
Tabela 4 - Produção de hemolisina nas amostras de leveduras isoladas de sangue e cateter de 2007 a 2010 em Hospital Público Infantil.....	49
Tabela 5 - Produção de hialuronidase pelas amostras de leveduras isoladas de sangue e cateter de 2007 a 2010 em Hospital Público Infantil.....	50
Tabela 6 - Concentração inibitória mínima 50 e 90 e variação das drogas antifúngicas anfotericina B, fluconazol e caspofungina para as 107 amostras em estudo.....	52
Tabela 7 - Concentração inibitória mínima 50 e 90 e variação das drogas antifúngicas anfotericina B, fluconazol e caspofungina para cada espécie.....	52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	Epidemiologia das leveduras.....	15
1.2	Características das espécies comumente isoladas em infecções invasivas.....	16
1.3	As espécies <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i>	17
1.4	Complexo <i>Candida parapsilosis</i>	18
1.5	Produção de biofilme por amostras de <i>C. parapsilosis</i>	20
1.6	Fatores relacionados a virulência.....	20
1.7	Principais antifúngicos utilizados na clínica e antifungigrama.....	21
2	OBJETIVOS.....	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1	Hospital em estudo.....	26
3.2	Pacientes.....	26
3.3	Cepas de leveduras isoladas em 2007 e 2008.....	26
3.4	Coletas e sementeiras – 2009 e 2010.....	26
3.5	Processamento e identificação das amostras (2007-2010)	27
3.6	Identificação tradicional.....	27
3.7	Método fenotípico para a diferenciação das amostras de <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i>	28
3.8	Separação do complexo <i>Candida parapsilosis</i> (<i>C. parapsilosis sensu stricto</i> , <i>C. orthopsilosis</i> e <i>C. metapsilosis</i>).....	29
3.9	Seqüenciamento das amostras identificadas como <i>Candida haemulonii</i> , <i>Candida spp.</i> e <i>Pichia spp</i>	31
3.10	Pesquisa da formação de biofilme por <i>Candida parapsilosis</i>	31
3.11	Pesquisa de exoenzimas (Fatores relacionados a virulência).....	32
3.12	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	35
4	RESULTADOS.....	37
4.1	Características dos pacientes.....	37
4.2	Ocorrência e variação das espécies de leveduras nos anos em estudo.....	37
4.3	Diferenciação de <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i>	40
4.4	Identificação das espécies do complexo <i>Candida parapsilosis</i>	40
4.5	Seqüenciamento das amostras identificadas fenotipicamente como <i>Candida spp.</i> , <i>Candida haemulonii</i> e <i>Pichia anomala</i>	43

4.6	Leveduras isoladas de mesmo paciente com culturas repetitivas.....	45
4.7	Produção de biofilme por espécies do complexo <i>C. parapsilosis</i>	45
4.8	Fatores relacionados a virulência.....	47
4.9	Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	51
5	DISCUSSÃO.....	54
5.1	Características dos pacientes.....	54
5.2	Ocorrência das espécies de leveduras.....	54
5.3	Associação entre o cateter colonizado e sepse.....	57
5.4	Diferenciação fenotípica de <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i>	57
5.5	Seqüenciamento das amostras <i>Candida spp.</i> , <i>Pichia anomala</i> e <i>Candida haemulonii</i>	58
5.6	Complexo <i>Candida parapsilosis</i>	59
5.7	Produção de biofilme por espécies do complexo <i>Candida parapsilosis</i>	60
5.8	Produção de fatores de virulência.....	62
5.9	Sensibilidade aos antifúngicos.....	64
6	CONCLUSÃO.....	69
	REFERÊNCIAS.....	70
	ANEXO 1 – Ficha de Identificação.....	85
	ANEXO 2 - Comitê de ética Hospital Infantil Darcy Vargas.....	86

1 INTRODUÇÃO

Desde o início dos anos 80, os fungos têm emergido como uma das maiores causas de doenças humanas, especialmente entre os pacientes imunocomprometidos e aqueles hospitalizados com sérias doenças de base (PAULA et al., 2007).

A incidência de infecções hospitalares fúngicas, também cresceu significativamente nas últimas décadas. Dos pacientes hospitalizados, 8% podem adquirir uma infecção causada por leveduras. O tempo de permanência dos pacientes nos hospitais é ampliado e, conseqüentemente, favorece uma maior utilização dos leitos hospitalares, além de interromper a vida produtiva do indivíduo, e o custo do tratamento (MALUCHE; SANTOS, 2008; NEGRI et al., 2009).

Os microrganismos que causam infecções hospitalares podem ser provenientes de duas fontes: a partir de cepas endógenas trazidas para o hospital pelos próprios pacientes ou por transmissão nosocomial do ambiente hospitalar. Neste último, vários estudos têm incluído transmissão nosocomial de uma fonte comum incluindo: materiais relacionados a infusão que estão contaminados, mãos de trabalhadores da área da saúde, comida servida no hospital e dispositivos médicos (MAGANTI; YAMAMURA; XU, 2011; PAULA et al., 2007).

No recém-nascido, a colonização pode ocorrer durante a passagem através do canal do parto onde as leveduras podem ser ingeridas. A ocorrência comum das leveduras no trato vaginal de mulheres grávidas e sua presença na cavidade oral de seus recém-nascidos têm levado alguns autores a considerar a candidíase vaginal como a principal causa de candidíase neonatal enquanto que outros autores não consideram a mucosa vaginal como a principal via de transmissão para os recém-nascidos (CARAMALAC et al., 2007; FIGUERAS et al., 2011; WAGGONER-FOUNTAIN et al., 1996). A transmissão pode se dar de forma pós-natal, por contaminação cruzada por outros indivíduos ou, como já foi citado anteriormente, por trabalhadores da área da saúde (FIGUERAS et al., 2010).

As espécies de *Candida* são o grupo de leveduras mais freqüentemente isolado, correspondendo a aproximadamente 80% dos casos, sendo o quarto microrganismo responsável pelas infecções da corrente sanguínea nos Estados Unidos; no Brasil, está entre o terceiro e quarto lugar (MOTTA et al., 2010). São ainda consideradas a maior causa de morbidade e mortalidade em crianças hospitalizadas, com a taxa de letalidade chegando a 10% e em recém nascidos de alto risco apresentando uma mortalidade média entre 25% a 60% (BATISTA, 2009; LEVY et al., 1998; PAULA et al., 2006; PAULA et al., 2007; ZAOUTIS et al., 2010). *Candida spp.* pode causar patologias de gravidade diferentes,

variando de infecções mucocutâneas a doenças invasivas que podem acometer qualquer órgão (MIKULSKA et al., 2011).

O termo “candidíase invasiva” engloba uma ampla variedade de doenças invasivas e graves que incluem candidemia, candidíase disseminada, endocardite, meningite, endoftalmite com o envolvimento de outros órgãos, excluindo-se doenças superficiais e menos graves, como candidíase orofaríngea e esofágica. Candidíase invasiva é um problema de crescente relevância na área da saúde, e é prevalente nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI'S) (PAPPAS, 2006).

Fungemias, principalmente as causadas por espécies de *Candida*, são uma grande preocupação na clínica médica relacionada à saúde pública (LORTHOLARY et al., 2011). Candidemia em crianças e adultos está associada com altas taxas de mortalidade – 30% e 50% respectivamente. (VIUDES et al., 2002).

A apresentação clínica da candidíase hematogênica varia nas diferentes populações de pacientes e tem a forma aguda e crônica. Candidemia é freqüentemente associada com sinais e sintomas da síndrome séptica (ZAOUTIS et al., 2010), pois, nos recém-nascidos, a apresentação é semelhante ao da sepse bacteriana, sendo os sinais proeminentes da clínica a dificuldade respiratória e apnéia. Se dissemina para vários órgãos, sendo as áreas afetadas mais freqüentes a pele (66%), sistema nervoso central (64%), e retina (54%) (SIMS; OSTROSKY-ZEICHNER; REX, 2005).

Há duas teorias principais sobre a causa das candidemias endógenas. A primeira é a translocação das espécies de *Candida* colonizadoras do epitélio intestinal. Esta teoria é apoiada por vários estudos mostrando uma relação entre a presença e a densidade da colonização e o aumento das taxas de candidemia, e a correlação entre a *Candida* colonizadora e a cepa isolada do sangue. O segundo mecanismo diz respeito à presença de cateteres intravenosos (SIMS; OSTROSKY-ZEICHNER; REX, 2005).

O uso de cateter venoso central (CVC) é considerado um dos fatores de risco mais relevantes para desenvolvimento de candidemia em pacientes sem neutropenia ou imunodeficiências graves. Mais de metade das infecções da corrente sanguínea, incluindo candidemia, que ocorre na unidade de terapia intensiva, estão relacionadas ao cateter (CAUDA, 2009; ZAOUTIS et al., 2004). Seu uso foi introduzido nos hospitais na década de 1940 e se tornou essencial para a prática médica moderna. Os cateteres são usados para a administração intravenosa de fluídos, drogas, nutrição parenteral e para o monitoramento hemodinâmico de pacientes em estado crítico (BRITO et al., 2007).

O gênero *Candida* inclui mais de 314 espécies de leveduras (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011) que são ubíquas na natureza e comumente encontradas em objetos inanimados, alimentos, plantas e animais. Sabe-se que apenas uma minoria das espécies de *Candida* é capaz de causar doenças em humanos. Deve-se a isso, o fato de que 65% das espécies de *Candida* são incapazes de crescer a temperatura de 37 °C, que é um fator que impede que essas espécies sejam patógenos bem sucedidos ou comensais dos seres humanos. As espécies de *Candida* que são comensais dos seres humanos, freqüentemente habitam a superfície da mucosa oral, o trato gastrointestinal, urogenital e a pele (MAGANTI et al., 2011, SILVA et al., 2011).

Entretanto, é capaz de causar infecção se o equilíbrio com o hospedeiro é quebrado como nos casos em que se observa baixa imunidade nos pacientes; sob manifestações clínicas e fatores de risco relacionados à neutropenia, *diabetes mellitus*, tuberculose pulmonar, lúpus eritematoso sistêmico, síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA ou AIDS), uso de drogas imunossupressoras, mucosite induzida por quimioterapia, altas doses de irradiação e antibioticoterapia (MACEDO et al., 2009; NUCCI; MARR, 2005). Pacientes transplantados apresentam alto risco de desenvolver infecções sanguíneas fúngicas. Em um estudo realizado com pacientes transplantados, foi relatada a ocorrência de fungemia em 80% destes, após seis meses ou mais de transplante (FLORESCU et al., 2010). Também tem sido relatado casos de infecções causadas por leveduras em feridas de queimaduras (MOUSA; AL-BADER, 2001).

Embora *Candida albicans* é a do gênero *Candida* mais comumente isolada em infecções da corrente sanguínea (NGUYEN et al., 1996), infecções invasivas causadas por espécies não-*albicans* são mais difíceis de tratar, por causa de sua resistência inata ou adquirida a agentes antifúngicos, e, portanto, a administração do tratamento deve ser baseada na identificação em nível de espécie (MORACE et al., 2011).

Uma terapia inadequada (definida como um atraso na terapêutica antifúngica 12 horas pós-cultura positiva (MORREL; FRASER; KOLLEF, 2005), dosagem inadequada, ou o emprego de um antifúngico para o qual a espécie é resistente) aplicada em pacientes com candidemia, além de aumentar o custo do tratamento de \$15,832 para \$33,021 dólares, aumenta o risco de morte do paciente de duas para quatro vezes (ARNOLD et al., 2010). E, as infecções da corrente sanguínea causada por fungos estão entre as infecções com as maiores taxas de tratamento inicial inadequado (GAREY et al., 2006).

Diferenças anatômicas e fisiológicas entre os pacientes pediátricos e adultos alteraram a suscetibilidade à infecção por diferentes espécies de *Candida* e influenciam nas abordagens do tratamento antifúngico, incluindo questões relativas à toxicidade das drogas,

farmacocinética, e dosagem. Há também menos dados para orientar a tomada de decisões em crianças com infecções fúngicas invasivas do que em adultos com infecções semelhantes (ZAOUTIS, 2010).

1.1 Epidemiologia das leveduras

A epidemiologia das espécies responsáveis por causar candidíase invasiva tem mudado, variando desde *C. albicans* a espécies não-*albicans*, que podem ser intrinsecamente resistentes ao fluconazol, difíceis de erradicar devido a produção de biofilmes e podem adquirir resistência aos antifúngicos azólicos durante a terapia (MIKULSKA et al., 2011). A importância da vigilância epidemiológica de leveduras envolvidas em processos patogênicos é inquestionável, devido ao aumento dessas infecções durante as últimas décadas (VINITHA; BALLAL, 2011).

Mais de 17 diferentes espécies de *Candida* têm sido relatadas como agentes etiológicos de candidíase invasiva em seres humanos, embora mais de 90% das infecções invasivas por *Candida spp.* são atribuídos a cinco espécies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. A lista de espécies relatadas continua a crescer e, assim, os laboratórios são forçados a fornecer uma identificação em nível de espécie como um auxílio na otimização da terapia de infecções por *Candida* (PFALLER; DIEKEMA, 2007).

Nos Estados Unidos, *Candida glabrata* é a primeira espécie não-*albicans* causadora de candidemia, e, na Europa, Canadá e em hospitais da América Latina, esta posição é ocupada por *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* (PFALLER et al., 2002).

Essa mudança na frequência de espécies causadoras de candidemia é explicada em parte pela alta afinidade de *C. parapsilosis* para com dispositivos intravasculares e nutrição parenteral, e sua utilização generalizada (ALMIRANTE et al., 2006). As razões para essa variação dramática na frequência de *C. glabrata* como causa de infecções nosocomiais da corrente sanguínea nos Estados Unidos, em comparação com outros países, não são claras, mas podem incluir a exposição a agentes azólicos, a idade do paciente, doença de base, localização geográfica, e outros fatores desconhecidos (PFALLER; DIEKEMA, 2007).

1.2 Características das espécies comumente isoladas em infecções invasivas

C. albicans é um fungo pleomórfico, com três diferentes formas de crescimento: leveduras, pseudohifas e hifas verdadeiras (VESES; GOW, 2009), e tem uma série de atributos que podem estar envolvidos no processo de invasão: adesinas, o já citado dimorfismo, que muitos autores acreditam ser uma característica importante, e a secreção de enzimas hidrolíticas específicas têm sido sugeridos como possíveis fatores de virulência (BARNETT, 2008; NEGRI et al., 2010). Esta espécie foi identificada no século XIX, mas a maioria das pesquisas sobre sua biologia, e de outras leveduras patogênicas, foi feita a partir da segunda metade do século XX em diante. Uma característica importante para a identificação desta espécie, é a produção de tubo germinativo no soro a 37 °C, e clamidoconídios (BARNETT, 2008). Esta espécie é a mais estudada de todas as espécies de *Candida*, sendo amplamente conhecida como um agente de micoses humanas (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

As células de *C. parapsilosis* podem ser redondas, ovais ou cilíndricas. Quando cultivada em ágar Sabouraud dextrose, as colônias de *C. parapsilosis* são brancas, cremosas, brilhantes e lisas ou enrugadas. *C. parapsilosis* não forma hifas verdadeiras e pode existir na forma de levedura ou em forma de pseudohifa (TROFA; GÁCSEK; NOSANCHUK, 2008). *C. parapsilosis* recentemente emergiu como um importante patógeno nosocomial causando candidíase invasiva em pacientes hospitalizados em estado crítico e neonatos de baixo peso (ASADZADEH et al., 2009; BATISTA, 2009), usualmente é transmitida pelas mãos dos trabalhadores na área da saúde (HAYS et al., 2010).

C. tropicalis assim como *C. albicans* apresenta três formas vegetativas: levedura, pseudohifa e hifa. Esta espécie é uma das mais frequentes em infecções invasivas. Ocorre frequentemente em pacientes com septicemia, sofrendo de leucemia ou outras condições debilitantes e, na maioria dos casos, parece ser originado da microbiota dos próprios pacientes (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

Em contraste com a maioria das outras *Candida spp.* que têm células ovóides, as células de *C. krusei* são geralmente alongadas e têm a aparência de “um longo grão de arroz”, e crescem a temperatura máxima de 43 a 45°C (SAMARANAYAK; SAMARANAYAK, 1994).

C. glabrata ao contrário de outras espécies de *Candida* não é dimórfica; e, conseqüentemente, é encontrada na forma de blastoconídio tanto na forma comensal como patógeno, não formando pseudohifas em temperaturas acima de 37 °C, e, nos testes

bioquímicos, assimila apenas os carboidratos glicose e trealose. No ágar Sabouraud dextrose, *C. glabrata* forma colônias lisas, brilhantes, de cor creme. No “CHROmagar[®]” (Difco, EUA), apresenta as cores de rosa a roxo (FIDEL; VAZQUEZ; SOBEL, 1999). Esta levedura é considerada problemática devido a sua resistência inata aos antifúngicos azólicos, embora um tratamento sistemático pareça ser efetivo (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

Colônias de *C. guilliermondii* são tipicamente planas, úmidas e macias, com pigmentação creme ou amarela. Produz aglomerados de pequenas blastoconídios em ágar fubá com tween 80, após 72 horas de incubação a 25 °C. As células são melhores observadas ao longo das poucas e curtas pseudohifas. Esta levedura é amplamente distribuída na natureza e frequentemente isolada do solo, plantas, insetos, água do mar, atmosfera, exsudatos de diversas árvores e alimentos processados, fazendo parte também da microbiota saprófita humana da pele e superfícies mucosas (SAVINI et al., 2010).

Recentemente, tem surgido infecções causadas por leveduras menos comuns tais como: *Pichia*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* e *Saccharomyces spp.* e outras espécies raramente encontradas tem sido relatadas (LEAW et al., 2006).

Pichia anomala (chamada anteriormente de *Hansenula anômala*, forma imperfeita: *Candida pelliculosa*), foi inicialmente descrita por Hansen em 1891. É uma levedura pertencente ao grupo dos ascomicetos, sendo ambiental de vida livre, isolada de plantas, frutas, solo e de outros materiais orgânicos, sendo que esta levedura cresce bem em meios contendo alto teor de açúcar. É conhecida como fazendo parte da microbiota da pele, garganta e do aparelho digestivo (CHAKRABARTI et al., 2001; PAULA et al., 2006). Esta levedura é considerada emergente, responsável por sérias infecções nosocomiais em recém-nascidos e crianças imunocomprometidas (BAKIR et al., 2004). Fatores predisponentes para a infecção por *P. anomala* incluem: prematuridade, baixo peso ao nascer, longo tempo de internação, uso prévio de antibióticos, cateterização intravenosa, uso de drogas por via intravenosa, leucemia linfoblástica e neoplasia (PAULA et al., 2006).

1.3 As espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis*

Apesar do aumento de espécies não-*albicans* em casos de candidemia, *C. albicans* continua a ser o principal patógeno fúngico isolado em laboratórios de rotina (ALVES et al., 2002).

Candida dubliniensis é uma espécie recentemente descrita, intimamente relacionada com *C. albicans*, que compartilha características fenotípicas com *C. albicans* (como a produção de tubo germinativo e clamidoconídio), sendo erroneamente identificada como *C. albicans* pelos laboratórios de micologia (BRANDT et al., 2000). Uma separação fisiológica embasada na ausência e/ou crescimento em meios com determinados açúcares e/ou alcoóis entre *C. albicans* e *C. dubliniensis* não é tão simples como se pensava anteriormente (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). Este microorganismo é, na maioria das vezes, isolado de cavidade oral de pacientes infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV), muitos deles com uma história de candidíase oral recorrente e terapia anterior com fluconazol (ALVES et al., 2002).

Esta espécie tem sido objeto de investigação, particularmente, em decorrência de sua similaridade fenotípica com *C. albicans* e também por sua maior resistência a drogas antifúngicas como o fluconazol (ELLEPOLA et al., 2003; MIRHENDI et al., 2005; PINJON et al., 1998; QUINDÓS et al., 2000; WIRSCHING et al., 2001).

Atualmente, o meio cromogênico “CHROmagar”, tem sido utilizado por vários pesquisadores para investigação da colonização oral por *C. dubliniensis*, uma vez que a coloração verde-escura das colônias foi descrita como um marcador fenotípico dessa espécie. A prova de termotolerância, a temperatura de 45°C, é empregada para separar as duas espécies. *C. albicans* cresce a essa temperatura, porém o mesmo não ocorre para *C. dubliniensis* (ZAITZ et al., 2010). O teste de temperatura é, provavelmente, a ferramenta mais fácil e menos dispendiosa para a triagem de isolados de *C. dubliniensis* (ALVES et al., 2002).

Um teste simples e mais poderoso capaz de discriminar com sucesso *C. dubliniensis* de *C. albicans*, foi desenvolvido. Este teste de triagem para *C. dubliniensis* é baseado na sua incapacidade de crescimento em caldo Sabouraud dextrose com NaCl 6,5%. Este teste é útil e tradicional em microbiologia para a identificação de diferentes microrganismos. O ensaio em caldo Sabouraud hipertônico é barato, de fácil execução e reprodutível, gerando resultados consistentes. (ALVES et al., 2002).

1.4 Complexo *Candida parapsilosis*

Entre as espécies de *Candida*, *C. parapsilosis* tem sido isolada freqüentemente de casos de infecção hospitalar, e parece ser menos susceptível *in vitro* as equinocandinas do que outras espécies (MOUDGAL et al., 2005). Apesar do fato de que o complexo *C. parapsilosis* já é conhecido há um certo tempo, muito pouco se sabe sobre a epidemiologia das duas

espécies raras dentro do complexo, *C. orthopsilosis* (anteriormente *C. parapsilosis* grupo II) e *C. metapsilosis* (anteriormente *C. parapsilosis* grupo III) (LOCKHART et al., 2008).

O sistema tradicional de identificação de leveduras, atualmente disponível, não consegue diferenciar estas espécies, e sendo assim, há uma escassez de informações sobre a sua ocorrência em diferentes regiões geográficas (ASADZADEH et al., 2009).

Recentes trabalhos com polimorfismos dos fragmentos de restrição (RFLP) mostraram que isolados de *C. parapsilosis* são genotipicamente mais heterogêneos do que outras espécies de *Candida*. *C. parapsilosis* pode ser dividida em três grupos distintos, com base no DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD), eletroforese de enzimas multilocus, espaço interno transcrito (ITS), seqüências de DNA que codificam ribossomos, DNA de parentesco, diferença de seqüências de bases no DNA mitocondrial, seqüências de genes da DNA topoisomerase II, e uma sonda de oligonucleotídeos usada como impressão digital “fingerprinting” para caracterizar cepas de *C. parapsilosis* (TAVANTI et al., 2004). Destas técnicas, o seqüenciamento parece ser o melhor, porque comparações entre as cepas são facilmente feitas e, com a seleção de genes apropriados, tanto as espécies próximas quanto as distantes podem ser determinadas (KURTZMAN; ROBNETT, 1997).

No nível molecular, as seqüências genéticas variáveis oferecem uma alternativa ao cultivo para detecção e identificação de fungos. Por exemplo, os genes ribossomais apresentam seqüências de regiões conservadas que são ideais para o “primer” se ligar, assim como regiões de variabilidade que são úteis para identificação de espécies (TURENNE et al., 1999).

O DNA ribossômico (rDNA) consiste em regiões do genoma conservadas separados por regiões variáveis, por isto vem sendo muito utilizado para estudos de identificação de organismos com o objetivo de caracterizar aspectos adicionais dos patógenos que poderiam contribuir para melhor entendimento da sua evolução, bem como para obter um controle mais eficaz do mesmo. Uma das técnicas mais utilizada na micologia é a amplificação de rDNA por PCR. Esta técnica permite a amplificação de regiões específicas do genoma, como a região ITS, localizada entre regiões altamente conservadas. A região ITS é conservada dentro do táxon de espécie, mas é variável entre espécies, sendo freqüentemente usado para taxonomia (FERREIRA, 2010) e, desta forma, vem sendo bastante utilizada para caracterizar as espécies dentro do complexo *C. parapsilosis* (LINTON et al., 2007).

A região ITS também tem se mostrado eficaz para identificação de leveduras de importância médica, por ser um método simples, seguro e prático (LEAW et al., 2006).

1.5 Produção de biofilme por amostras de *C. parapsilosis*

Biofilmes são colônias de células microbianas envoltas em um auto-produto, uma matriz orgânica polimérica, e que são formados em resposta a aderência a uma superfície (MELO et al., 2011; ZIBAFAR et al., 2009).

Biofilmes representam o tipo mais prevalente de crescimento microbiano na natureza e são cruciais para o desenvolvimento de infecções clínicas. Neste último, eles servem como um ninho para a doença e estão associados em um alto nível com a resistência aos medicamentos dos organismos associados (KUHNS et al., 2002). O primeiro exemplo de um biofilme a ser reconhecido na medicina foi o da placa bacteriana na superfície dos dentes, mas estimativas recentes sugerem que uma proporção substancial de infecções humanas envolvem biofilmes (DOUGLAS, 2003).

Células de *Candida* podem formar biofilmes que frequentemente são fontes de infecções e são menos suscetíveis às drogas antifúngicas. Diferentes espécies do gênero são capazes de produzir biofilme, no entanto, *C. parapsilosis* tornou-se a segunda ou terceira levedura mais frequentemente isolada em vários estudos, e tem sido associada como sendo fonte de infecção, a cateterização vesical ou urinária e nutrição parenteral (MELO et al., 2011).

Certos fatores podem dar a *C. parapsilosis* uma vantagem seletiva na formação de biofilmes, incluindo proliferação em altas concentrações de glicose e adesão aos materiais protéticos (BRANCHINI et al., 1994), e, dessa forma, as infecções tornam-se mais refratárias à terapia convencional por causa da resistência aos antimicrobianos (GOKCE; CERIKCIOGLU; YAGCI, 2007).

1.6 Fatores relacionados a virulência

A fisiopatogenia da candidíase é um mecanismo complexo e multifatorial, que envolve características do hospedeiro e do microrganismo (NEGRI et al., 2010)

Acredita-se que, além destes fatores predisponentes, inerentes ao hospedeiro, associada à ocorrência de candidíase estão associados os fatores relacionados às características das leveduras. Os chamados fatores de virulência tais como aderência, tubo germinativo, produção de exoenzimas, como proteinase, fosfolipase, hemolisina e crescimento a 37 °C (KWONG-CHUN; BENNET, 1992; LACAZ et al., 2002; MACEDO et al., 2009; ODDS, 1988; RIBEIRO et al., 2010; RIPPON, 1988), são os mais importantes e

podem variar conforme o isolado (NEGRI et al., 2009; PRICE; WILKINSON; GENTRY, 1982).

Proteinases são enzimas secretadas *in vivo* por espécies patogênicas de *Candida in vivo* durante a infecção. Essas enzimas podem ser secretadas *in vitro* quando a levedura é cultivada na presença de proteína exógena (usualmente albumina sérica bovina) como fonte de nitrogênio. Acredita-se que a proteinase tenha como função degradar anticorpos, aumentando a capacidade do microrganismo de colonizar e penetrar tecidos do hospedeiro (VINITHA; BALLAL, 2009; MENEZES et al., 2004; VINITHA; BALLAL, 2008). Experimentalmente, mutantes deficientes na produção de proteinase parecem ser menos virulentos do que as cepas capazes de produzir enzimas proteolíticas (SILVA et al., 2007).

Fosfolipases estão associadas com danos às membranas das células hospedeiras, degradando os fosfolipídios das mesmas. A invasão das células hospedeiras por microrganismos, implica penetração e dano da membrana celular externa. Dados preliminares sugerem que o dano direto a célula do hospedeiro e a lise, são os principais mecanismos que contribuem para a virulência do fungo (MENEZES et al., 2004; VINITHA; BALLAL, 2011).

No hospedeiro humano o ferro é ligado a proteínas plasmáticas e, patógenos como *C. albicans* devem possuir mecanismos para quebrar esta ligação (ALMEIDA; WILSON; HUBE, 2009). A hemoglobina é uma importante fonte de ferro para os microrganismos patogênicos e a atividade hemolítica e a utilização de hemoglobina tem sido considerada fatores de virulência (LUO; SAMARANAYAKE; YAU, 2001; TANAKA et al., 1997). Tem sido demonstrado que o fator hemolítico secretado por *C. albicans* causa a liberação da hemoglobina, o qual foi caracterizado como uma mannoproteína, que promove o rompimento dos eritrócitos humanos ligando-se a sua proteína de três bandas (FRANÇA et al., 2009).

A produção da exoenzima hialuronidase por microrganismos pode afetar a permeabilidade do epitélio do hospedeiro agindo nos espaços intercelulares. Acredita-se que esta enzima desempenha um papel na patogenicidade de fungos, principalmente espécies do gênero *Candida* (SHIMIZU et al., 1995).

1.7 Principais antifúngicos utilizados na clínica e antifungigrama

A profilaxia com antifúngicos tem sido uma eficaz estratégia preventiva em populações pediátricas de alto risco para candidemia, incluindo recém-nascidos e pacientes oncológicos (ZAOUTIS et al., 2010).

Contudo, as drogas antifúngicas encontram-se em desvantagem quando comparadas ao número das drogas antibacterianas, principalmente em países em desenvolvimento. A resistência aos antifúngicos tem representado um grande desafio para a clínica. Frente às dificuldades observadas no tratamento de micoses, em alguns grupos de pacientes, recomenda-se, sempre que possível, o isolamento do agente responsável pela infecção e a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das drogas passíveis de utilização (ARREDONDO-GARCIA; CUEVAS-AMÁBILE, 2009; BATISTA, 2009).

Numerosos agentes antifúngicos têm sido usados em ensaios em recém-nascidos e crianças com candidemia e candidíase invasiva. Anfotericina B e suas formulações lipídicas, antifúngicos azólicos e equinocandinas, têm demonstrado serem eficazes em neonatos com candidíase (BLYTH; PALASANTHIRAN; O'BRIEN, 2007).

O Fluconazol é uma droga antifúngica pertencente ao grupo dos triazóis. Os azólicos inibem a síntese do citocromo p450 (CYP450), ou 14 α -demetilase, uma enzima importante para a síntese de ergosterol, o principal componente esteroide da membrana da célula fúngica (ANTACHOPOULOS; WALSH, 2005). A inibição desta enzima pelos azólicos causa acumulação dos esteróides metilados C₁₄ que provavelmente rompem a estrutura da membrana (OROZCO et al., 1998). Apesar de ser recomendado como terapia de primeira linha para pacientes com candidemia pela Sociedade de Doenças Infecciosas da América, a terapia com Fluconazol é advertida para pacientes que estão em estado crítico e que tiveram exposição a antifúngicos azólicos recentes. A mesma abordagem terapêutica é aconselhada para crianças, com atenção a diferenças nos regimes de dosagem (PAPPAS et al., 2009).

Pois quando se trata da mais recente geração dos antifúngicos azólicos, as interações medicamentosas, hepatotoxicidade e limitações para uso por causa da insuficiência renal são as principais preocupações (CHEN; SLAVIN; SORRELL, 2011).

Três mecanismos gerais de resistência aos azólicos foram descritos para espécies de *Candida*. O primeiro é uma alteração da enzima alvo, a 14 α -demetilase, e também, em alguns microrganismos resistentes, há uma superexpressão da enzima 14 α -demetilase sendo, dessa forma, menos suscetível à inibição dos azólicos. O segundo mecanismo é uma diminuição na acumulação das drogas, mediada por uma absorção diminuída ou um aumento no efluxo da droga. O terceiro mecanismo de resistência é a deficiência da enzima esteroide C-5 desaturase. Organismos deficientes produzem a enzima 14-methylfecosterol e permanecem viáveis quando a atividade 14 α -demetilase é inibida (OROZCO et al., 1998).

O aumento do uso de antifúngicos azólicos, para profilaxia, diminuiu a incidência de infecções invasivas causadas por espécies de *Candida* em algumas populações, como, por

exemplo, em pacientes que fizeram transplante de medula óssea (GUDLAUGSSON et al., 2003). No entanto, certas espécies têm uma propensão para a diminuição da sensibilidade ao fluconazol (por exemplo, *C. krusei* e *C. glabrata*). Dessa forma, a terapia com Fluconazol pode ser um fator importante no aumento de infecções causadas por *C. glabrata* e *C. krusei* em pacientes hospitalizados (FRIDKIN et al., 2006).

A anfotericina B pertence ao grupo dos antifúngicos poliênicos. Esta classe de drogas age na membrana fúngica, onde a interação do antifúngico com o esterol da membrana resulta na produção de poros aquosos, causando uma alteração na permeabilidade da membrana, extravasamento de componentes citoplasmáticos vitais, e conseqüentemente morte do microrganismo (GHANNOUM; RICE, 1999). Foi o primeiro agente antifúngico a ser aprovado pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) (FILLIPIN; SOUZA, 2006).

Durante muitos anos, a anfotericina B foi o único agente antifúngico sistêmico para o tratamento das infecções fúngicas invasivas. O advento dos triazóis e formulações lipídicas de anfotericina B na década de 1990, forneceram novas opções terapêuticas. No entanto, uma grande desvantagem do uso da anfotericina B continua a ser a toxicidade renal (CHEN; SLAVIN; SORRELL, 2011), resultando em insuficiência renal aguda em até 50% dos pacientes (PAPPAS et al., 2009).

Embora a anfotericina B possua maior afinidade por ergosterol, muitos dos efeitos tóxicos que lhe são atribuídos são resultados da sua capacidade em ligar-se ao ergosterol e outros constituintes da membrana celular de mamíferos (FILIPPIN; SOUZA, 2006).

A caspofungina foi a primeira equinocandina autorizada para uso nos Estados Unidos e na maior parte da Europa (ANTACHOPOULOS; WALSH, 2005). As equinocandinas inibem a síntese da 1,3- β -D-glucana, um componente essencial da parede da célula fúngica, e representa uma ótima opção para o tratamento de infecções fúngicas (CHEN; SLAVIN; SORRELL, 2011). A inibição da síntese da 1,3- β -D-glucana, leva ao rompimento da parede celular, seguido por estresse osmótico, lise e morte do fungo (ANTACHOPOULOS; WALSH, 2005).

Esta classe de drogas antifúngicas foi a adição mais recente ao arsenal antifúngico, e até agora seu uso tem sido limitado para avaliar se será desenvolvida uma resistência significativa a essa classe. Microrganismos que demonstram resistência própria ou são incapazes de sintetizar a enzima alvo, ou produzem uma forma alternativa da enzima com uma redução na ligação do alvo das equinocandinas. Todas as equinocandinas exercem atividade fungicida contra as espécies de *Candida*. Esta classe é mais ativa contra *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (SILVA et al., 2011). Equinocandinas

são consideradas como terapia preferencial em infecções causadas por *Candida glabrata* (PAPPAS et al., 2009). É importante enfatizar que *C. parapsilosis* tende a ter maiores valores de MIC relacionados as equinocandinas do que a maioria das espécies de *Candida*, principalmente *Candida albicans* (SILVA et al., 2011).

Outro aspecto relevante no papel da equinocandinas é que, em relação as suas características individuais, este grupo é considerado equivalente, ou possivelmente superior ao fluconazol, porque não requer ajuste da dose em pacientes com insuficiência renal, tem baixa nefrotoxicidade em comparação com a anfotericina B, e tem menos interações medicamentosas ao substituir a primeira escolha dos azóis no tratamento de candidemias (SAMPAIO-CAMARGO et al., 2010).

A resistência aos antifúngicos está emergindo, e os dados da sensibilidade *in vitro* são necessários para guiar a seleção de antifúngicos na quimioterapia. Os métodos de rotina para testar a sensibilidade aos antifúngicos atualmente disponíveis exigem um método padrão para comparação desta sensibilidade (DIAS et al., 2006; LEE et al., 2001).

O desenvolvimento de métodos padronizados de teste de sensibilidade aos antifúngicos tem sido objeto de numerosos estudos durante as últimas décadas. Assim, o CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), desenvolveu vários métodos de referência, inclusive para leveduras (NEGRI et al., 2009).

O CLSI considera como método de referência para testar a sensibilidade aos antifúngicos o método de microdiluição em caldo. No entanto, esse procedimento de referência é difícil de ser implementado em laboratórios clínicos de rotina. Outros métodos são mais fáceis de serem utilizados, por estarem disponíveis comercialmente, proporcionando um rápido resultado, e se comparam com estes testes de referência. Entre eles, o “Etest[®]” (bioMérieux, França) é um método de difusão em ágar, que utiliza uma faixa de material inerte impregnado com um gradiente de concentração pré-definido do antifúngico, capaz de determinar o valor da concentração inibitória mínima, sendo amplamente utilizado em laboratórios de rotina (DANNANOUUI et al., 2010).

Estudos têm relatado a boa correlação do “Etest[®]” com os métodos preconizados pelo CLSI (Manual Clinical and Laboratory Standards Institute, antigo NCCLS), considerados de referência (CLAUDINO et al., 2008; DIAS et al., 2006; MATSUMOTO et al., 2007; PFALLER, 1996).

As principais características destes métodos de difusão em ágar é que eles permitem uma resposta rápida a leveduras resistentes aos agentes antifúngicos, impedindo desnecessárias concentrações abusivas da droga em pacientes (NEGRI et al., 2009).

2 OBJETIVOS

Objetivo geral:

Investigar a frequência de espécies de leveduras isoladas de sangue e cateter, em um hospital público infantil localizado na cidade de São Paulo, no período de janeiro 2007 a dezembro de 2010 (47 meses).

Objetivos específicos:

- Identificar as cepas de levedura de sangue e cateter de 2007 a 2008 (estudo retrospectivo);
- Identificar e verificar a frequência das espécies de leveduras de sangue e cateter de janeiro de 2009 a dezembro de 2010 (estudo prospectivo);
- Averiguar a presença de *C. dubliniensis*, por meio da coloração no meio cromogênico “CHROMagar[®]”, crescimento a temperatura de 45 °C e crescimento no meio caldo Sabouraud dextrose, com NaCl a 6,5%;
- Pesquisar a presença das espécies dentro do complexo *Candida parapsilosis* pelo método do seqüenciamento da região ITS;
- Estudar as espécies do complexo *Candida parapsilosis* quanto a produção de biofilme.
- Investigar os fatores relacionados a virulência das cepas estudadas: proteinase, fosfolipase, hemolisina e hialuronidase;
- Estudar o perfil de susceptibilidade das amostras identificadas frente aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina pelo método “Etest[®]”.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Hospital em estudo

O presente estudo foi realizado em um Hospital Público Infantil, localizado na cidade de São Paulo, Estado de São Paulo, subordinado à Coordenadoria de Saúde da Região Metropolitana da Grande São Paulo – Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, integrado ao sistema SUS. O hospital possui alta complexidade e 90 leitos, o que lhe confere, o título de hospital terciário e de médio porte.

3.2 Pacientes

O hospital recebe crianças de 0 a 18 anos, em todos os níveis de atendimentos. Foi mantido sigilo sobre a identidade dos pacientes e somente mencionado o número da amostra registrada no Laboratório de Leveduras Patogênicas; Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas – USP.

3.3 Cepas de leveduras isoladas em 2007 e 2008

As amostras de leveduras isoladas neste período estão mantidas na micoteca do Laboratório de Leveduras Patogênicas sob liofilização a -20°C. Os isolados deste Banco de Microrganismos foram armazenados como *Candida* spp.

3.4 Coletas e sementeiras – 2009 e 2010

A sementeira do sangue foi feita em meio de cultura bifásico BACTEC (Difcotm, EUA). No caso de ponta de cateteres, os materiais foram sementeiros em ágar sangue pela técnica de rolamento. Em ambos os casos (sangue e cateter) as culturas de leveduras isoladas foram transferidas para tubos contendo ágar Sabouraud dextrose (Difcotm, EUA). Todos estes materiais foram colocados em caixas, identificados e transportados para o laboratório de Leveduras Patogênicas do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo. Tanto a coleta quanto o transporte das amostras foram feitos pelos funcionários do citado hospital.

3.5 Processamento e identificação das amostras (2007-2010):

As amostras de leveduras isoladas de sangue e cateter foram semeadas por esgotamento de alça no meio cromogênico “CHROmagar[®]” (Figura 01) e incubadas a 32°C por até 3 dias. A identificação presuntiva foi interpretada de acordo com as cores apresentadas pelas colônias, seguindo a orientação do fabricante. A semeadura neste meio garantiu a pureza das amostras.

As amostras de leveduras estudadas foram:

2007- sangue: 14, cateter: 11.

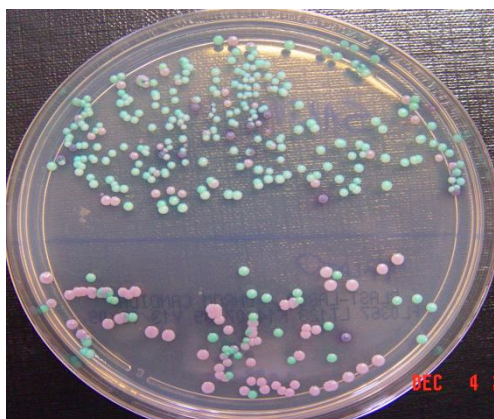
2008- sangue: 17, cateter: 12.

2009 – sangue: 19, cateter: 08.

2010 - sangue: 21, cateter: 05.

Total das amostras estudadas: 107 cepas.

Figura 01- CHROmagar[®] Candida. Colônias verdes: *C. albicans*, Colônias azuis: *C. tropicalis*, Colônias rosas, roxas ou brancas: *Candida spp.* (presuntivo para). Interpretação de acordo com orientações do fabricante.



3.6 Identificação tradicional (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011)

A identificação tradicional das amostras foi feita seguindo-se o protocolo de Kurtzman; Fell; Boekhout, (2011) (descrita abaixo) e modificações padronizadas no laboratório. É importante salientar que, para todos os testes foi necessário um crescimento prévio da levedura por 24 horas.

Pesquisa de tubo germinativo: Após crescimento em ágar Sabouraud dextrose (Difco, EUA) por 24 horas, foi retirada uma pequena alíquota da levedura, escala 0,5 de Mcfarland, e inoculada em soro fetal bovino (1,0 ml), incubado a 37 °C durante período máximo de 3 horas. Logo após, foi depositado uma gota da suspensão sobre a lâmina (com pipeta Pasteur), coberta com lamínula, observando-se o tubo germinativo em microscópio óptico, com objetivas de 10x e 40x.

Microcultivo: Após o preparo do meio “Corn meal Agar” (Difco, EUA), o mesmo foi distribuído com pipetas Pasteur em lâminas dentro das placas de Petri. Semeou-se duas estrias paralelas da levedura sobre o ágar e cobertas com lamínula. Após 48 horas, a lâmina foi observada ao microscópio com as objetivas de 10x e 40x, visando detectar estruturas características (clamidoconídios e produção de hifas). A placa foi incubada por até 4 dias na temperatura de 25 °C.

Auxanograma (assimilação de carboidratos e nitrato): Preparou-se uma suspensão da levedura em 1,0 ml de água destilada na escala 5 de Mcfarland. Após feito o inóculo, misturou-se a suspensão e a mesma foi vertida em placa de Petri esterilizada, e, logo após, o meio fundido C (sem carbono) ou N (sem nitrogênio) foi vertido na mesma placa. Após a homogeneização do inóculo com o meio, esperou-se a placa secar, e acrescentou-se nas placas com meio C açúcares e, nas placas com meio N acrescentaram-se peptona e nitrato de potássio. As placas foram incubadas a 25 °C durante 24-96 horas e feito a leitura conforme literatura citado.

Zimograma (fermentação de açúcares): A levedura foi inoculada no meio de cultura com os respectivos carboidratos, incubado a 32 °C por no máximo 28 dias, e, a leitura realizada conforme literatura citada.

3.7 Método fenotípico para a diferenciação das amostras de *C. albicans* e *C. dubliniensis*:

As amostras de *C. albicans* cultivadas em “ágar Sabouraud dextrose”, foram repicadas em “CHROMagar[®]” e incubadas por até 96 horas a 32 °C, visando-se a obtenção de colônias de coloração característica, segundo a orientação do fabricante, que é verde clara para *C. albicans* e verde escura para *C. dubliniensis*.

Outro teste realizado foi o crescimento a 45 °C em “ágar Sabouraud dextrose”. Para a realização dos ensaios utilizamos as amostras padrões ATCC 64548 (*C. albicans*) e ATCC

777 (*C. dubliniensis*). A leitura dos ensaios foi realizada de acordo com os métodos descritos por Sullivan et al., (1995); onde foram consideradas *C. albicans* as amostras que apresentaram a capacidade de crescimento a 45 °C e a coloração verde clara, no meio cromogênico. As amostras que apresentaram coloração verde escura no meio cromogênico CHROmagar® e não cresceram a 45 °C foram consideradas como *C. dubliniensis*.

O crescimento em meio hipertônico foi feito seguindo-se o protocolo de Alves et al., (2002). As amostras identificadas fenotipicamente como *C. albicans* foram cultivadas em “ágar Sabouraud dextrose” por 48 horas. Então foi feita uma suspensão da levedura em água destilada estéril e, em seguida, ajustada por espectrofotometria para produzir uma suspensão com 85% de transmitância em 530 nm. Alíquotas de 20 µL de cada inóculo foram adicionados a tubos contendo 1,0 mL de caldo Sabouraud suplementado com 6,5% NaCl e, em seguida, incubados por 96 h. Tubos contendo apenas o meio ágar Sabouraud hipertônico, bem como tubos contendo inóculos das ATCC's (ATCC 64548 *C. albicans* e ATCC 777 *C. dubliniensis*) foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. As culturas foram então examinadas visualmente para a detecção do crescimento das leveduras em intervalos de 24 h. Resultado positivo foi definido como a ausência de qualquer crescimento visual de colônias no tubo de ensaio após 96 horas de incubação, descrito por Alves et al., (2002).

3.8 Separação do complexo *Candida parapsilosis* (*C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*)

Extração do DNA total de leveduras

As amostras fenotipicamente identificadas como *C. parapsilosis*, foram repicadas pela técnica de esgotamento no “CHROmagar®” e incubadas a 37°C por 48 horas. Retirou-se uma colônia isolada da amostra e repicou-se em 1 mL do meio YEPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*, Difco™ - EUA), incubada “overnight” em agitador magnético a 30°C, a 200 rpm por 24 horas para crescimento rápido da levedura.

A cultura obtida foi empregada para a extração do DNA total de leveduras, conforme protocolo comercial “*PrepMan™ Ultra Sample Preparation reagent Quick Reference Card*” (Applied Biosystems, EUA): foi retirado 1000 µL do caldo e colocado em tubo criogênico, centrifugado por 3 minutos a velocidade de 16.000 x g, descartado o sobrenadante, e a amostra foi lavada em água milli-Q, vortexada por 30 segundos e repetida toda a operação

novamente. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuspensão em 100 µL do reagente “*PrepMan*” e submetido a agitação por 20 segundos em vórtex. A reação foi incubada em banho-maria por 10 minutos a 100 °C e, em seguida, a amostra ficou por 2 minutos a temperatura ambiente. Logo após, foi centrifugada por 3 minutos a 16.000 x g e, retirado 90 µL do sobrenadante contendo o DNA. Esta preparação foi transferida para um tubo novo e armazenado em freezer a -20 °C.

O DNA extraído foi quantificado no aparelho “*NanoVue Plus*” (General Electric, EUA) para avaliar a o grau de pureza do DNA em relação à proteína (260/280) e o grau de pureza do DNA em relação ao sal (260/230), no qual é esperado em torno de 1,8-2,0.

Reação de PCR

A amplificação foi realizada utilizando “primers” que amplificam fragmentos da região ITS do DNAr. Os “primers” da ITS1/ITS4 foram: forward 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG3' e reverse 5' TCCTCCGCTTATGATATGC3'. Como padrão foi utilizada a cepa ATCC 64548 (*C. albicans*).

Para a reação de PCR foram preparados 25uL de solução contendo 23uL de “TaqMan Universal PCR Master Mix” (Applied Biosystems, EUA) e 2 uL de DNA a 50 ng/uL. As condições de amplificação foram: denaturação inicial de 5 minutos à 95 °C, seguida de 35 ciclos de 1 minuto a 56 °C, 2 minutos a 72 °C, com extensão final de 10 minutos a 71 °C, em Termociclador (Veriti 96-well Thermal - Applied Biosystems, EUA).

Para a corrida eletroforética, 5 uL do DNA foi adicionado a 2 ul de corante (EZ Vision, Ambresco), que permite a visualização da corrida e dispensa o uso de solução de brometo de etídio. Os amplicons foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (Invitrogen Life Technologies, EUA) a 1% diluído em tampão TAE (Tris-Acido acético-EDTA) 1x. Todas as análises incluíram um marcador de peso molecular de 100 pb (MW MARKER, Ambresco, OHIO, EUA).

Após a eletroforese a visualização das bandas de DNA foi realizada com auxílio de aparelho fotodocumentador (Bio Rad, EUA), sob iluminação de luz ultravioleta.

Seqüenciamento

Além dos “primers” ITS1/ITS4, para a reação de seqüenciamento foram utilizados os “primers” V9G “forward” (5’TTACGTCCCTGTCCTTTGTA3’) e LS “reverse” (5’GCATTCCCAAACAACACTCGACT3’).

A amplificação foi realizada, em placas com 96 poços, adicionando-se 100 ng do DNA purificado, 9 uL de cada “primer” “forward” e “reverse” em poços separados, 2 uL do ABI Prism® Big Dye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, EUA), 4 uL de tampão Tris-HCL 200 mM e 5 mM de MgCl₂.

As condições de amplificação foram: uma etapa de anelamento, de 20 minutos a 95 °C, seguida de 25 ciclos de 50 °C, por 15 minutos, 60 °C, por 1 minuto. Após essa etapa, as placas foram vedadas e armazenadas em freezer a -20 °C.

Após a desnaturação a 94 °C por 4 minutos, as seqüências foram determinadas pelo aparelho DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystem, EUA), pertencente ao Laboratório de Retrovirologia da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp).

As seqüências foram alinhadas com auxílio do software Sequencher 4.1.4 e, comparadas com as seqüências disponíveis no GenBank, com auxílio do programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), onde só identificações com identidade máxima acima de 98% foram aceitas como espécie final.

3.9 Seqüenciamento das amostras identificadas como *Candida haemulonii*, *Candida spp.* e *Pichia spp.*

Para o seqüenciamento das amostras identificadas como *Candida spp.*, *Pichia anomala* e *Candida haemulonii* foi utilizado o mesmo procedimento padrão que para o complexo *Candida parapsilosis*, tanto para a extração do DNA total, PCR, quanto para o seqüenciamento, bem como foram utilizados os mesmos “primers”.

3.10 Pesquisa da formação de biofilme por *Candida parapsilosis*

A pesquisa de biofilme foi feita seguindo-se os protocolos de Melo et al., (2001), Silva et al., (2010) e modificações do laboratório. As amostras do complexo *Candida parapsilosis* foram cultivadas em “ágar Sabouraud dextrose” por 24 horas à 35 °C. A partir deste

crescimento, foi preparado um inóculo padronizado, contendo 3 mL de salina, com turbidez comparada a escala 4 de McFarland. Logo após, alíquotas de 20 µL do inóculo foram transferidos para placa de poliestireno, em quadruplicata, completado com 180 µL de “caldo Sabouraud” suplementado com 8% de glicose. Esta cultura foi incubada por 24 horas a 35 °C, e, então, retirada cuidadosamente com pipeta Pasteur. Cada orifício foi lavado 1x, com água destilada. As células foram fixadas com 110 µL de metanol a 100%, e deixado agir por 15 minutos, e então, retirado o metanol e deixado secar. Foi adicionado 110 µL de solução cristal violeta (CV) a 0,4% por 45 minutos. A solução foi removida e lavada 1 x com água destilada, e foi deixada secar. O corante, então foi resolubilizado com 200 µL de ácido acético a 33% e a placa foi lida em espectrofotômetro a 570 nm. Os valores finais foram obtidos subtraindo-se os valores da absorbância do controle negativo (branco que não continha células) dos valores da leitura do biofilme, para minimizar a interferência do fundo do poço. De acordo com os valores de absorbância obtidos, as amostras foram classificadas em: não-produtoras de biofilme (D.O. <0.1), fraca produtora de biofilme (D.O. 0.1-0.25) e forte produtora de biofilme (D.O. >0.25).

Meio para formação de Biofilme:

Meio A:

Glicose (Difco, EUA) 60g – água destilada....500mL. Meio esterilizado por filtração em membrana Milipore (0,22µm).

Meio B:

“Caldo Sabouraud dextrose” (Difco, EUA) 30g – água destilada...500mL. Meio autoclavado a 120°C por 15 minutos.

Esperou-se o meio B esfriar a 50°C e adicionando-se o meio A e homogeneizou-se.

3.11 Pesquisa de exoenzimas (Fatores relacionados a virulência)

Proteinase

A técnica para produção de proteinase, é baseada no procedimento descrito por Ruchel; Tegeler; Trost, (1982), e modificações do laboratório.

Meio básico:

- YCB 11,7 g – Ágar 18 g – Água destilada...900 ml. Este meio foi esterilizado e resfriado a 50 °C, e, logo após, adicionado a solução estoque, a qual está descrita abaixo e então distribuído em placas de Petri 20 ml:
- Albumina bovina (BSA) fração V (Sigma) 2 g – Protovit 2,5 ml – Água destilada.....100 ml.

Após a solidificação da mistura foram adicionados quatro discos estéreis de 6 mm cada ao meio. As cepas inoculadas em solução salina foram ajustadas na escala 1 de “McFarland”, absorvidas 0,1ml nos discos estéreis e 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 das leveduras. A atividade enzimática (Pz) foi medida de acordo com a técnica de Price; Wilkinson; Gentry, (1982) (Tabela 1). Foi utilizado como controle positivo a cepa padrão ATCC 90028 *C. albicans*.

As pesquisas de fosfolipase e hialuronidase utilizam como controle a mesma ATCC padrão que o estudo de proteinase, e, todas as pesquisas de exoenzimas implicam em mensurações de halos semelhantes, bem como mesmos procedimentos padrões, mudando apenas a temperatura de incubação e dias de leitura para hemolisina.

Fosfolipase

O meio básico contém:

- ágar Sabouraud dextrose 65 g - Cloreto de sódio (NaCl) 57,3 g – Cloreto de cálcio (CaCl) 0,55 g – Água destilada.....1000 ml. Foi enriquecido com 40 g de gema de ovo e posteriormente distribuído em placas de Petri de 20ml.

Hemolisina:

A produção de hemolisina foi averiguada segundo a técnica descrita por Luo; Samaranayake; Yau, (2001), e modificações do laboratório.

Meio suplemento de glicose – Meio “A”

- Glicose (Difco) 30 g – Água destilada.....500ml. Este meio foi esterilizado por filtração em membrana Millipore (0,22 µm).

Meio ágar base – Meio “B”

- Peptona (Difco) 10g – Ágar (Difco) 20g – Água destilada.....500ml. Este meio foi esterilizado em autoclave a 120 °C por 15 minutos. Depois, resfriado a 50 °C e adicionado o meio “A” e 70 ml do sangue desfibrinado de carneiro. O meio ágar para hemólise foi distribuído em placas de Petri estéreis em volume de 20 ml.

As placas contendo as cepas inoculadas nos discos estéreis foram incubadas a 37 °C por 48 horas. Foi utilizado como controle positivo a bactéria *Streptococcus pyogenes* ATCC AJ012051, que é produtor de hemólise. A atividade enzimática foi medida da mesma maneira que as demais exoenzimas testadas (Tabela 1).

Hialuronidase:

O meio básico com “caldo Sabouraud dextrose” acrescido de 0,2% de ácido hialurônico de cordão umbilical humano (Sigma, EUA) e 0,5% de albumina bovina fração V – BSA (Sigma) foi preparado seguindo a técnica de Khouri, (1998).

Meio I:

- Dextrose 4 g – Peptona 1 g – Água destilada.....80 ml. Esterilizou-se em autoclave a 120°C por 15 minutos.

Meio II:

- Ácido hialurônico 0,2 g – BSA 0,5 g – Água destilada.....20 ml. A solução foi esterilizada por filtração (Membrana Millipore 0,22 µm).

Após resfriamento do meio de cultura, acrescentou-se a solução de ácido hialurônico e BSA assepticamente, e o meio foi distribuído em placas de Petri de 20 ml.

Os resultados da produção de exoenzimas foram analisados conforme padrão descrito na tabela 1.

Tabela 1 – Atividade Enzimática conforme o PZ e o código (PRICE; WILKINSON; GENTRY, 1982)

Pz	Atividade enzimática	Código
1	Negativa	1
>0,64 <1	Positiva	2
≤0,64	Fortemente positiva	3

Foi utilizado para a comparação da produção de exoenzimas entre a espécie *C. albicans* e espécies não-*albicans* o teste estatístico Mann-Whitney.

3.12 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

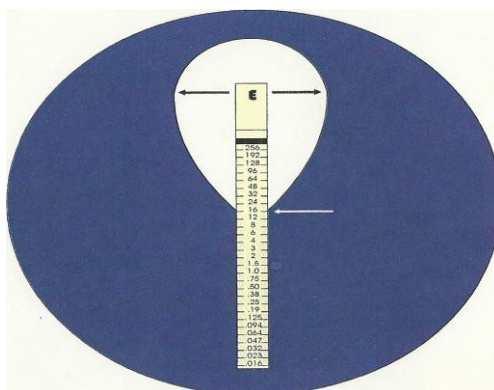
Foi utilizado neste teste o kit comercial E-test[®] (bioMérieux, França).

Processamento:

As amostras foram cultivadas em “ágar Sabouraud dextrose” por 24 horas a 37 °C. A partir do crescimento da amostra, foi preparado uma suspensão em salina estéril ajustada na escala 0,5 de McFarland. A amostra foi semeada em estrias na placa de Petri contendo “ágar Mueller Hinton” (Difco, EUA) com azul de metileno + 2% de glicose. Foi adicionado em pontos distantes da placa, uma fita E-test[®] contendo o antifúngico fluconazol, e outra contendo o antifúngico anfotericina B, e em uma placa separada o antifúngico caspofungina, cuidadosamente sobre a superfície do ágar e incubadas a 35 °C durante 24-48 horas. Foram incluídas no teste, como controle, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258. As fitas de E-test[®] são plásticas e contém um gradiente definido e contínuo do antifúngico. No caso da caspofungina e anfotericina B, cada fita contém gradiente de concentração de 0,002 e 32µg/mL. Para o fluconazol, o gradiente de concentração vai de 0,016 a 256 µg/mL. Estas fitas foram aplicadas cuidadosamente sobre a superfície do ágar e incubadas 35 °C durante 24-48 horas. Foram incluídas no teste, como controle, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei*

ATCC 6258. A leitura do teste foi feita de acordo com as instruções do fabricante, considerando a CIM dos antifúngicos para cada uma das amostras (Figura 02).

Figura 02 - Exemplo da determinação da concentração inibitória mínima pelo método “Etest[®]”



Interpretação dos resultados:

O critério de sensibilidade/resistência aos antifúngicos foram os recomendados pelo CLSI. Foi utilizado o documento M27-S3 (2008) para todos os antifúngicos, o qual preconiza de acordo com a tabela abaixo os seguintes valores de concentrações dos antifúngicos para avaliar a sensibilidade ou resistência aos fármacos pela técnica da microdiluição. Para caspofungina, foram consideradas resistentes as cepas com CIM maior que 2µg/mL (PFALLER et al., 2008).

Tabela 2 –Interpretação do comportamento de cepas de *Candida spp.* segundo normas do CLSI (M27S3 – 2008), frente a concentração do antifúngico

Agente antifúngico	Sensível	Sensível Dose Dependente	Resistente	Não-sensível	Referência
Caspofungina	≤2	-	-	<2	M27-S3/2008
Fluconazol	≤8	16-32	≥64	-	M27-S3/2008
Anfotericina B	-	-	>1 (sugere-se)	-	M27-S3/2008

A determinação do CIM₅₀ (Concentração Inibitória Mínima do antifúngico capaz de inibir 50% dos isolados) e CIM₉₀ (90% dos isolados), foi determinada seguindo-se a equação determinada por Smith et al., (1986). O teste estatístico aplicado para saber se houve diferença significativa na sensibilidade entre *C. albicans* e não-*albicans* foi o Mann-Whitney test.

4 RESULTADOS

4.1 Características dos pacientes:

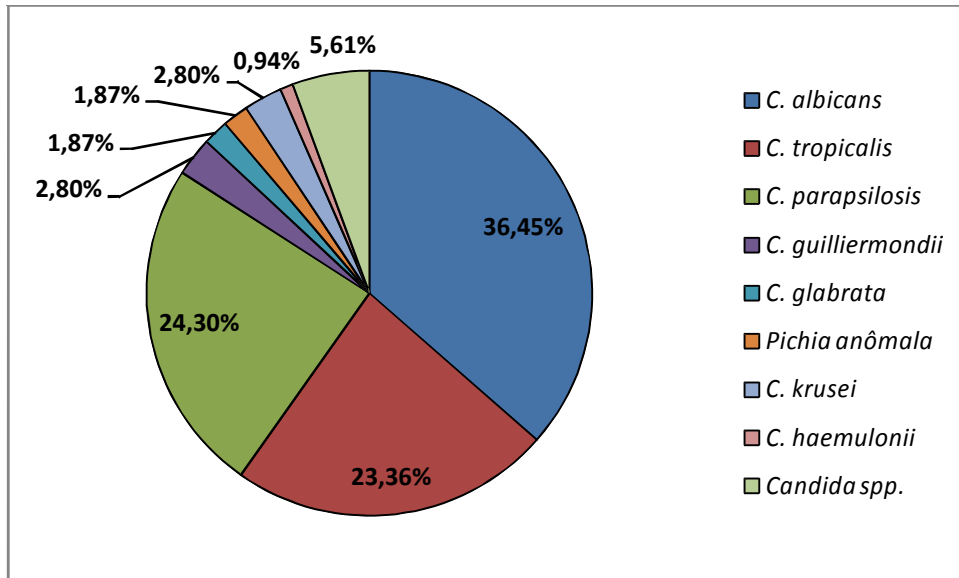
O hospital atende crianças de 0 a 18 anos, sendo a média de idade dos pacientes atendidos no período em estudo de 4,6 anos. Dos pacientes relacionados às amostras de sangue e cateter, 59,81% foram provenientes do sexo masculino e 40,19% do sexo feminino.

4.2 Ocorrência e variação das espécies de leveduras nos anos em estudo:

Em 2007, isolamos 25 amostras (sangue: 14, cateter: 11); em 2008 foram isoladas 29 amostras (sangue: 17, cateter: 12); em 2009, 27 amostras (sangue: 19, cateter: 08); e em 2010, 26 amostras (sangue: 21, cateter: 05). De 2007 a 2010, recebemos um total de 107 (35%) amostras, isoladas de sangue e cateter. As demais foram isoladas de outras fontes, incluindo: urina, fezes, secreção traqueal, “swab” anal, “swab” inguinal, dentre outros.

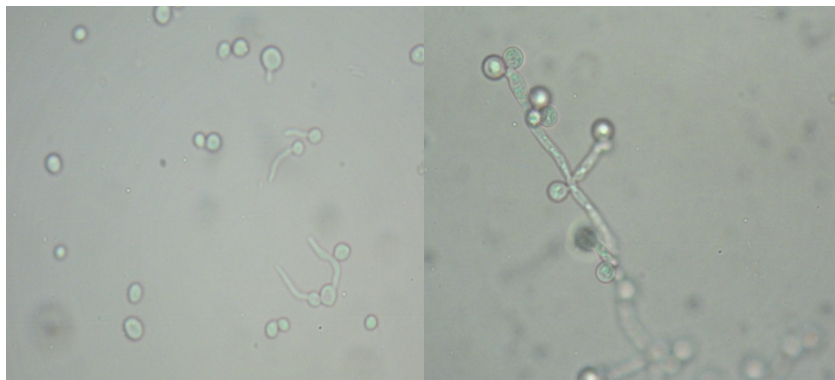
Foram isoladas 107 amostras de sangue e cateter no período de 2007 a 2010, das quais 71 foram de sangue e 36 de cateter. Neste período, a frequência das espécies encontradas de acordo com o perfil fenotípico foi: *C. albicans* com 39/107 (36.45%), seguida de *C. tropicalis* 25/107 (23.36%), *C. parapsilosis* 26/107 (24.3%), *C. guilliermondii* e *C. krusei* com 3/107 (2.80%), *C. glabrata* 2/107 (1.87%), *Pichia anomala* 2/107 (1.87%), *C. haemulonii* 1/107 (0.94%) e *Candida spp.* 06/107 (5.61%) amostras (Figura 03). As amostras identificadas como *Candida spp.* não está citada a espécie, pois não foi possível identificá-las fenotipicamente, de acordo com a literatura consultada. O isolamento de *C. albicans* no Hospital Público Infantil em estudo se manteve nos dois primeiros anos, sendo a frequência de *C. albicans* em 2007 44% e em 2008 48.28%, em 2009 houve uma diminuição nessa frequência, *C. albicans* foi isolada em apenas 22.22% das amostras e em 2010 houve um pequeno aumento no isolamento de *C. albicans* 30.77%. A flutuação das espécies do período de 2007 a 2010, entre *C. albicans* (Figura 04) e espécies não-*albicans* pode ser observada na Figura 05 e a frequência total entre o isolamento *C. albicans* (36,45%) e não-*albicans* (63,55%) dos anos em estudo, pode ser observada na Figura 06.

Figura 03 - Freqüência das espécies de leveduras isoladas de sangue e cateter dos anos de 2007 a 2010 em Hospital Público Infantil.



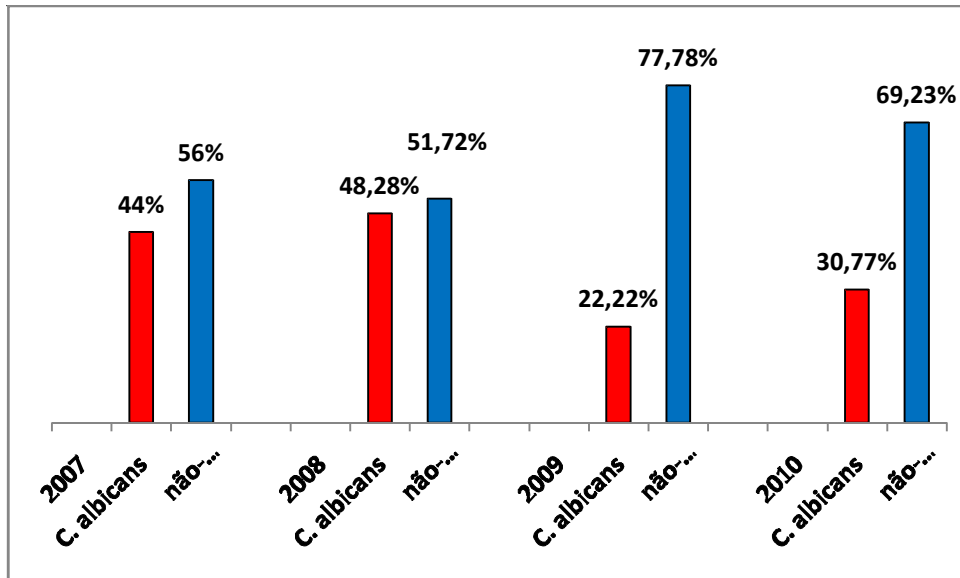
Fonte: Próprio autor

Figura 04 - Características da espécie *C. albicans*: tubo germinativo em soro fetal bovino a 37 °C e produção de clamidoconídios em “corn meal agar”



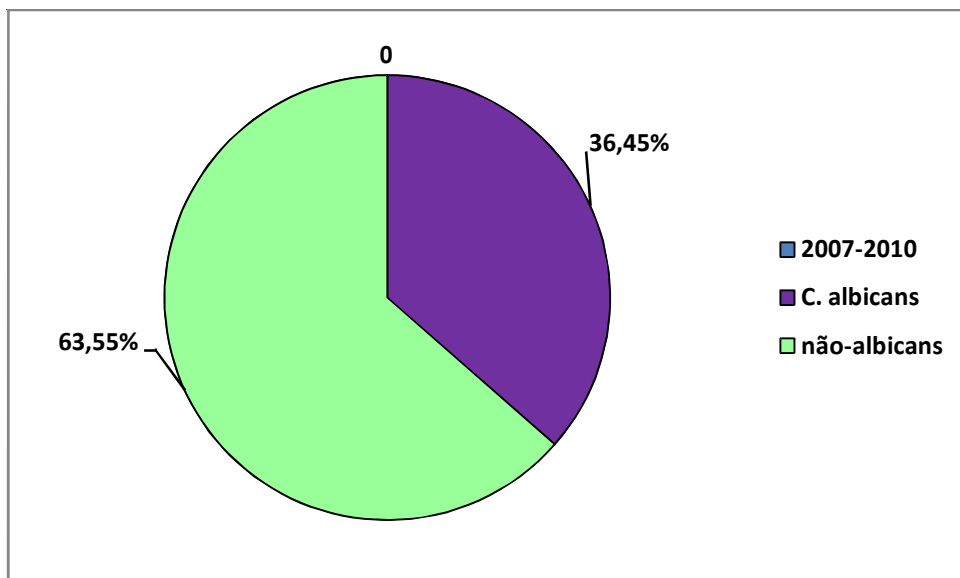
Fonte: Próprio autor

Figura 05 - Variação de espécies *C. albicans* e não-*albicans* de 2007 a 2010 em Hospital Público Infantil



Fonte: Próprio autor

Figura 06 - Relação de amostras de *C. albicans* e não-*albicans* isoladas nos anos em estudo (2007-2010) em Hospital Público Infantil



Fonte: Próprio autor

4.3 Diferenciação de *C. albicans* e *C. dubliniensis*:

Na diferenciação fenotípica de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, através do meio cromogênico CHROmagar[®] (Difco[™], EUA) observamos que das 39 amostras identificadas como *C. albicans*, todas apresentaram a cor verde clara no meio cromogênico (*C. albicans*).

Na prova de termotolerância a 45 °C, após 48 horas, todas as amostras cresceram a esta temperatura, bem como, todas as amostras cresceram no “caldo Sabouraud dextrose” hipertônico, sendo, desta forma, fenotipicamente identificadas como *C. albicans*.

4.4 Identificação das espécies do complexo *Candida parapsilosis*

As 26 amostras fenotipicamente identificadas como *C. parapsilosis* foram seqüenciadas, e, dessas, *C. parapsilosis sensu stricto* foi encontrada em 88,46% (23/26) das amostras (sendo 17 de sangue e 6 de cateter), enquanto que *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* foram encontradas em 7,69% (2/26) e 3,85% (1/26), respectivamente. Tanto *C. orthopsilosis*, quanto *C. metapsilosis* foram isoladas de sangue. O número das amostras e os dados gerados pela página do NCBI se encontram no quadro a seguir (Quadro 01) e o gel com o produto da PCR das amostras do complexo *Candida parapsilosis* se encontra na figura 07. Legenda do Quadro: Letras: número de nucleotídeos. Score: verifica o quanto o alinhamento é bom (quanto maior o número de score, melhor o alinhamento). Valor de E: parâmetro que descreve a similaridade que se espera encontrar ao acaso entre seqüências: quanto menor for o valor de e, ou mais próximo de zero, maior é o significado da similaridade (LUIZ, 2010).

Quadro 01 -Relação das amostras pertencentes ao Complexo *C. parapsilosis*. *Número da amostra mantida na micoteca do Departamento de Microbiologia ICB-USP

Nº Amostra*	Identificação	Nº Acesso NCBI	Letras	Máx. Score	Coverage	Valor de E	Ident. Máxima
331	<i>C. parapsilosis</i>	EU564203.1	524	968	100%	0,0	99%
333	<i>C. parapsilosis</i>	EU564203.1	524	968	100%	0,0	100%
514	<i>C. parapsilosis</i>	EU564203.1	524	939	100%	0,0	100%

(Continua)

(Continuação)

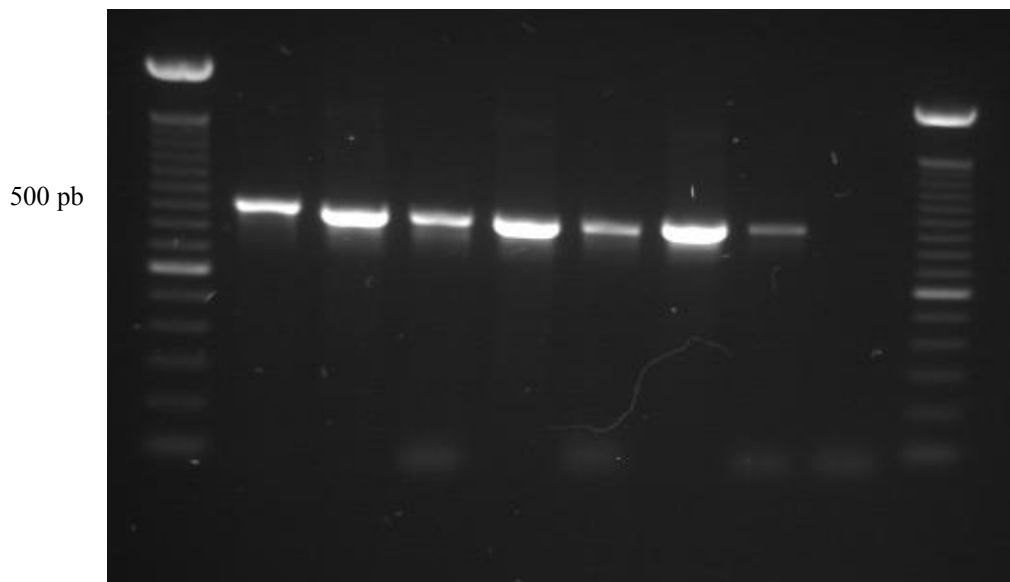
577	<i>C. parapsilosis</i>	FN652300.1	524	950	100%	0,0	99%
591	<i>C. parapsilosis</i>	FN652300.1	524	968	100%	0,0	100%
600	<i>C. parapsilosis</i>	FN652300.1	524	968	100%	0,0	100%
602	<i>C. parapsilosis</i>	FN652300.1	524	963	100%	0,0	99%
619	<i>C. parapsilosis</i>	FN652300.1	515	968	100%	0,0	100%
678	<i>C. parapsilosis</i>	FN652300.1	524	957	100%	0,0	99%
825	<i>C. parapsilosis</i>	EU564203.1	524	968	100%	0,0	100%
876	<i>C. parapsilosis</i>	FN652300.1	535	968	100%	0,0	100%
877	<i>C. parapsilosis</i>	FN652300.1	524	968	100%	0,0	100%
878	<i>C. parapsilosis</i>	FN652300.1	525	963	100%	0,0	99%
880	<i>C. parapsilosis</i>	FN652300.1	524	963	100%	0,0	99%
884	<i>C. parapsilosis</i>	FN652300.1	535	928	100%	0,0	98%
911	<i>C. parapsilosis</i>	FN652300.1	526	953	100%	0,0	99%
912	<i>C. parapsilosis</i>	FN652300.1	524	968	100%	0,0	100%
960	<i>C. orthopsilosis</i>	FM178400.1	517	942	100%	0,0	99%

Continua

Continuação

977	<i>C. parapsilosis</i>	EU564203.1	524	963	100%	0,0	100%
979	<i>C. orthopsilosis</i>	FM178400.1	515	952	100%	0,0	100%
980	<i>C. parapsilosis</i>	FN652300.1	524	968	100%	0,0	99%
991	<i>C. parapsilosis</i>	EU564203.1	524	968	100%	0,0	100%
1006	<i>C. parapsilosis</i>	FN652300.1	524	968	100%	0,0	100%
1011	<i>C. parapsilosis</i>	FN652300.1	524	957	100%	0,0	99%
1014	<i>C. parapsilosis</i>	FN652300.1	524	963	100%	0,0	99%
1031	<i>C. metapsilosis</i>	AY391849.1	535	983	100%	0,0	99%

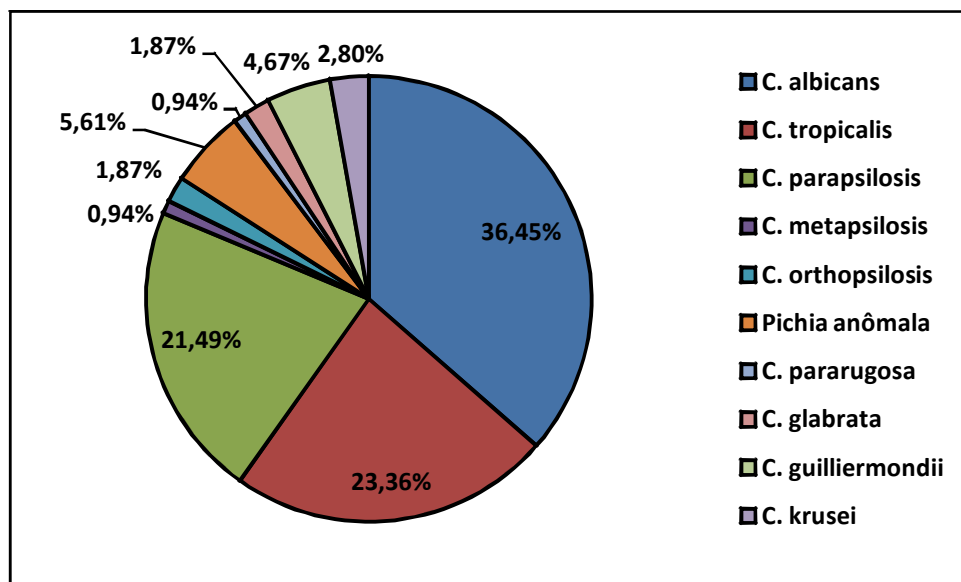
Figura07 - Gel de agarose a 1%, produto da PCR amostras Complexo *C. parapsilosis*. Linha 1: Ladder. Linha2: Controle positivo. Linha 3: ATCC *C. parapsilosis*. Linha 4: *C. parapsilosis*. Linha 5: ATCC *C. orthopsilosis*. Linha 6: *C. orthopsilosis*. Linha 7: ATCC *C. methapsilosis*. Linha 8: *C. methapsilosis*. Linha 9: Controle negativo. Linha 10: Ladder.



4.5 Seqüenciamento das amostras identificadas fenotipicamente como *Candida spp.*, *Candida haemulonii* e *Pichia anomala*

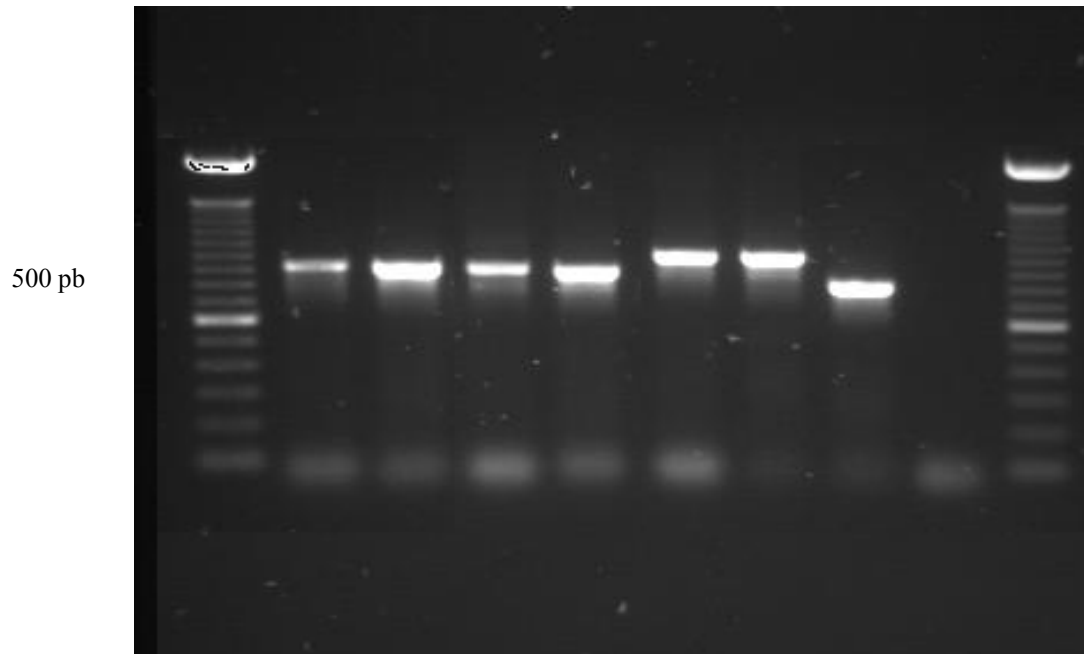
Após a diferenciação entre as espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis*; o seqüenciamento das amostras do Complexo *C. parapsilosis* e das amostras classificadas fenotipicamente como *Candida spp.*, a freqüência de espécies isoladas no período ficou do seguinte modo: *C. albicans* 39/107 (36.45%), *C. tropicalis* 25/107 (23.36%), *C. parapsilosis* 23/107 (21.49%), *C. metapsilosis* 1/107 (0.94%), *C. orthopsilosis* 2/107 (1.87%), *Pichia anômala* 6/107 (5.61%), *C. pararugosa* 1/107 (0.94%), *C. glabrata* 2/107 (1.87%), *C. guilliermondii* 5/107 (4.67%), *C. krusei* 3/107 (2.80%). O gráfico com a freqüência de espécies se encontra na Figura 08, o gel com o produto da PCR referente às amostras seqüenciadas na figura 9, os dados gerados pela página do NCBI no quadro 2 e a relação das amostras com a identificação anterior e a identificação final no quadro 3:

Figura 08 - Freqüência de espécies de leveduras após seqüenciamento isoladas nos anos de 2007 a 2010



Fonte: Próprio autor

Figura 09-Gel de agarose a 1%, produto da PCR. Linha 1: Ladder. Linha 2: Controle positivo. Linha 3: *C. albicans*. Linha 4: *C. metapsilosis*. Linha 5: *C. orthopsilosis*. Linha 6: *C. guilliermondii*. Linha 7: *P. anomala*. Linha 8: *C. pararugosa*. Linha 9: Controle negativo. Linha 10: Ladder.



Quadro 2 - Relação das amostras de leveduras identificadas por seqüenciamento.

Nº Amostra	Identificação	Nº Acesso NCBI	Letras	Máx. Score	Coverage	Valor de E	Ident. Máxima
341	<i>C.guilliermondii</i>	GU385845.1	610	1116	99%	0,0	99%
404	<i>Pichia anomala</i>	EU380207.1	621	1140	99%	0,0	99%
421	<i>Pichia anomala</i>	EU380207.1	621	1140	99%	0,0	99%
429	<i>Pichia anomala</i>	EU380207.1	620	1122	99%	0,0	99%
434	<i>Pichia anomala</i>	EU380207.1	621	1140	99%	0,0	100%
505	<i>C. pararugosa</i>	GQ458032.1	420	763	100%	0,0	99%
528	<i>C.guilliermondii</i>	GU385845.1	611	1123	99%	0,0	100%
1066	<i>Pichia anomala</i>	EU380207.1	621	1140	99%	0,0	100%
1067	<i>Pichia anomala</i>	EU380207.1	619	1127	99%	0,0	100%

Quadro 3 - Relação das espécies de leveduras identificadas fenotipicamente e por seqüenciamento

Nº Amostra	Identificação anterior	Identificação por seqüenciamento
341	<i>C. haemulonii</i>	<i>C. guilliermondii</i>
404	<i>Candida spp.</i>	<i>Pichia anomala</i>
421	<i>Candida spp.</i>	<i>Pichia anomala</i>
429	<i>Candida spp.</i>	<i>Pichia anomala</i>
434	<i>Candida spp.</i>	<i>Pichia anomala</i>
505	<i>Candida spp.</i>	<i>C. pararugosa</i>
528	<i>Candida spp.</i>	<i>C. guilliermondii</i>
1066	<i>Pichia anomala</i>	<i>Pichia anomala</i>
1067	<i>Pichia anomala</i>	<i>Pichia anomala</i>

4.6 Leveduras isoladas de mesmo paciente com culturas repetitivas

Dos pacientes que tiveram leveduras isoladas dos materiais em estudo (sangue e cateter), sete destes pacientes apresentaram amostras positivas mais de uma vez, do mesmo material (sangue), e com a mesma espécie. Cinco pacientes após isolamento de leveduras do mesmo material apresentaram espécies diferentes. E, cinco pacientes apresentaram a mesma espécie de levedura porém em materiais diferentes (sangue e cateter). Quatro pacientes apresentaram espécies diferentes isoladas de materiais diferentes. De um paciente foi isolada de sangue *C. guilliermondii* e, logo após foi observada a mesma espécie em cateter. Porém, tempos depois foi feito um mesmo isolamento do cateter e o paciente apresentou *C. albicans*. O mesmo aconteceu com outra paciente: foi isolado *C. albicans* de sangue e cateter, e logo após, isolou-se do sangue *C. metapsilosis*.

4.7 Produção de biofilme por espécies do complexo *C. parapsilosis*

A média da produção de biofilme das amostras de *C. parapsilosis sensu stricto* foi de 0.08 nm (DP± 0.065), sendo que o mínimo de absorbância apresentado foi de 0.015 nm e o maior foi de 0.233 nm. Nas amostras de *C. orthopsilosis*, a maior leitura observada foi de 0.1 nm e a menor 0.028 nm. E a amostra de *C. metapsilosis* produziu 0.021 nm (quadro 4):

Quadro 4 - Relação da produção de biofilme apresentado pelas amostras do complexo *C. parapsilosis*

Nº Amostra	Identificação	Leitura do biofilme (nm)
331	<i>C. parapsilosis</i>	0,103
333	<i>C. parapsilosis</i>	0,151
514	<i>C. parapsilosis</i>	0,086
577	<i>C. parapsilosis</i>	0,062
591	<i>C. parapsilosis</i>	0,233
600	<i>C. parapsilosis</i>	0,02
602	<i>C. parapsilosis</i>	0,135
619	<i>C. parapsilosis</i>	0,192
678	<i>C. parapsilosis</i>	0,141
825	<i>C. parapsilosis</i>	0,028
876	<i>C. parapsilosis</i>	0,206
877	<i>C. parapsilosis</i>	0,068
878	<i>C. parapsilosis</i>	0,024
880	<i>C. parapsilosis</i>	0,145
884	<i>C. parapsilosis</i>	0,015
911	<i>C. parapsilosis</i>	0,067
912	<i>C. parapsilosis</i>	0,063
960	<i>C. orthopsilosis</i>	0,028
977	<i>C. parapsilosis</i>	0,073
979	<i>C. orthopsilosis</i>	0,1
980	<i>C. parapsilosis</i>	0,019
991	<i>C. parapsilosis</i>	0,095
1006	<i>C. parapsilosis</i>	0,056
1011	<i>C. parapsilosis</i>	0,015
1014	<i>C. parapsilosis</i>	0,03
1031	<i>C. metapsilosis</i>	0,021

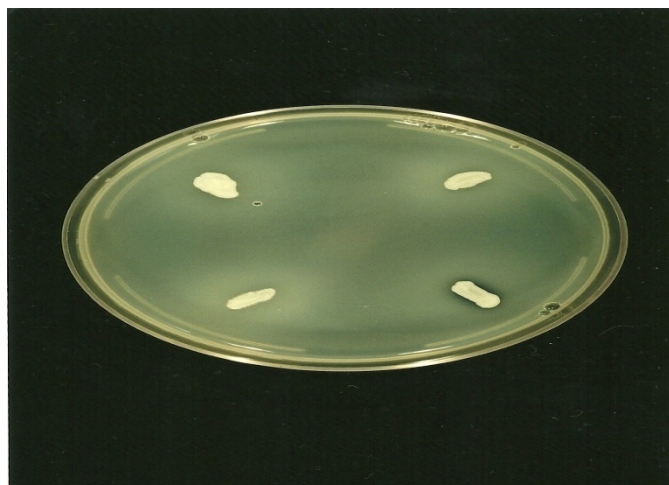
De acordo com os valores de absorvância obtidos, as amostras foram classificadas em: não-produtoras de biofilme (D.O. <0.1), fraca produtora de biofilme (D.O. 0.1-0.25) e forte produtora de biofilme (D.O. >0.25). Sendo assim, das 23 amostras de *C. parapsilosis sensu stricto*, 15 não foram produtoras de biofilme (65,2%), e oito (34,8%) foram consideradas como fracas produtoras de biofilme; dessas oito que foram fracas produtoras de biofilme, apenas uma (1/8 12,5%) foi isolada de cateter, as outras sete foram isoladas de sangue (7/15 46,7%). Em relação as duas amostras de *C. orthopsilosis*, uma não produziu biofilme, e uma foi considerada fraca produtora de biofilme, ambas isoladas de sangue. A única *C. metapsilosis* não produziu biofilme. Nenhuma amostra foi forte produtora de biofilme.

4.8 Fatores relacionados a virulência:

Proteinase:

Em relação a produção de proteinase (Figura 10), todas as 107 amostras foram fortemente produtoras (índice 3). No entanto, quando aplicado o teste estatístico, as amostras não-*albicans* foram as que apresentaram maior atividade proteolítica em comparação com as amostras *C. albicans* $p < 0,05$.

Figura 10 - Produção de proteinase por amostra de *Candida albicans*.



Fonte: Laboratório de Leveduras Patogênicas, USP

Fosfolipase:

A relação da produção de fosfolipase (Figura 11) por espécie e de acordo com os índices apresentados encontra-se na Tabela abaixo (tabela 3):

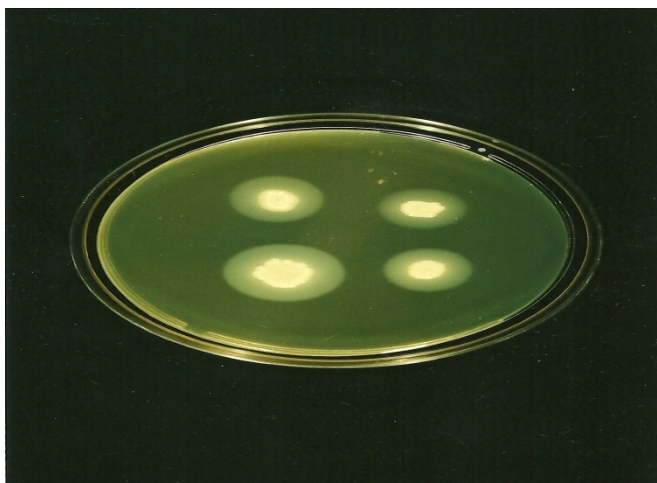
Tabela 3 - Produção de fosfolipase pelas amostras de leveduras isoladas de sangue e cateter de 2007 a 2010 em Hospital Público Infantil.

Espécie	Índice I	Índice II	Índice III
<i>C. albicans</i>	9 (23,08%)	21 (53,84%)	9 (23,08%)
<i>C. tropicalis</i>	19 (76%)	6 (24%)	-
<i>C. parapsilosis</i>	22 (95,65%)	1 (4,35%)	-
<i>C. metapsilosis</i>	1	-	-
<i>C. orthopsilosis</i>	2	-	-
<i>Pichia anomala</i>	3 (50%)	1 (16,67%)	2 (33,33%)
<i>C. guilliermondii</i>	4 (80%)	1 (20%)	-
<i>C. pararugosa</i>	1	-	-
<i>C. glabrata</i>	1 (50%)	1 (50%)	-
<i>C. krusei</i>	3	-	-

Como podemos observar na Tabela 3, *C. albicans* e *Pichia anomala* foram as únicas espécies capazes de produzir índice 3 para fosfolipase. Foram produtoras do índice 2: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *Pichia anomala*, *C. guilliermondii* e *C. glabrata*. As demais espécies não produziram fosfolipase (índice 1).

O teste estatístico Mann-Whitney detectou que as amostras *C. albicans* foram maiores produtoras de fosfolipase quando comparado com as espécies não-*albicans* $p < 0,05$.

Figura 11- Produção de fosfolipase por amostras de *Candida albicans*.



Fonte: Laboratório de Leveduras Patogênicas - USP

Hemolisina:

Na Tabela abaixo (Tabela 4), encontra-se a relação da produção de hemolisina nas amostras de leveduras de acordo com os índices apresentados.

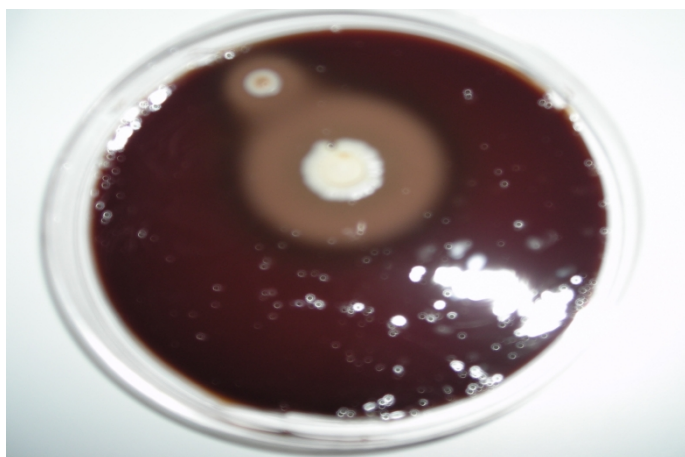
Tabela 4 - Produção de hemolisina nas amostras de leveduras isoladas de sangue e cateter de 2007 a 2010 em Hospital Público Infantil.

Espécie	Índice I	Índice II	Índice III
<i>C. albicans</i>	-	1 (2,56%)	38 (97,44%)
<i>C. tropicalis</i>	-	2 (8%)	23 (92%)
<i>C. parapsilosis</i>	2 (8,70%)	8 (34,78%)	13 (56,52%)
<i>C. metapsilosis</i>	-	1	-
<i>C. orthopsilosis</i>	-	1 (50%)	1 (50%)
<i>Pichia anomala</i>	-	-	6
<i>C. guilliermondii</i>	4 (80%)	1 (20%)	-
<i>C. pararugosa</i>	1	-	-
<i>C. glabrata</i>	-	1 (50%)	1 (50%)
<i>C. krusei</i>	-	3	-

Para produção de hemolisina (Figura 12), produziram índice 3 as espécies: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *Pichia anomala* e *C. glabrata*. Do índice 2, foram produtoras: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata* e *C. krusei*. Não produziram hemolisina *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. pararugosa*.

Quando aplicado o teste estatístico, *C. albicans* apresentou maiores índices hemolíticos que as espécies não-*albicans* $p < 0,05$.

Figura 12 - Produção de hemolisina por amostra de *Candida albicans*.



Fonte: Próprio autor

Hialuronidase:

Em relação a produção de hialuronidase (Figura 13), os índices apresentados de acordo com as espécies se encontra na Tabela 5:

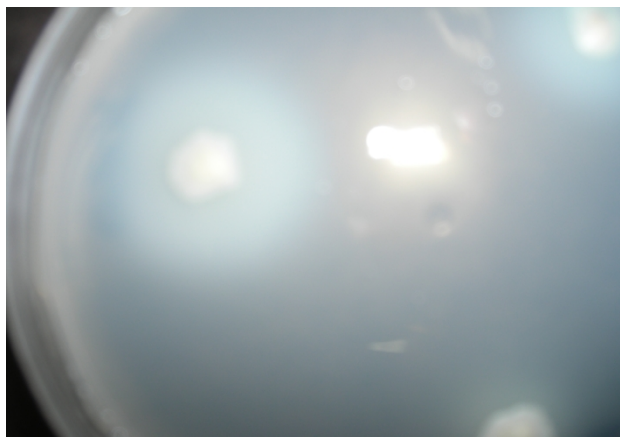
Tabela 5 - Produção de hialuronidase pelas amostras de leveduras isoladas de sangue e cateter de 2007 a 2010 em Hospital Público Infantil.

Espécie	Índice I	Índice II	Índice III
<i>C. albicans</i>	30 (76,92%)	8 (20,52%)	1 (2,56%)
<i>C. tropicalis</i>	2 (8%)	21 (84%)	2 (8%)
<i>C. parapsilosis</i>	20 (86,95%)	2 (8,70%)	1 (4,35%)
<i>C. metapsilosis</i>	-	-	1
<i>C. orthopsilosis</i>	1 (50%)	1 (50%)	-
<i>Pichia anomala</i>	-	2 (33,33%)	4 (66,67%)
<i>C. guilliermondii</i>	2 (40%)	2 (40%)	1 (20%)
<i>C. pararugosa</i>	1	-	-
<i>C. glabrata</i>	1 (50%)	1 (50%)	-
<i>C. krusei</i>	3	-	-

Como pode-se observar na Tabela 5, as únicas espécies incapazes de produzir hialuronidase foi *C. krusei* e *C. pararugosa*.

Na produção de hialuronidase, as amostras não-*albicans* foram maiores produtores da enzima do que as amostras de *C. albicans* $p < 0,05$.

Figura 13 - Produção de hialuronidase por amostra de *Candida albicans*.



Fonte: Próprio autor

4.9 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

Das 107 amostras em estudo, frente ao antifúngico anfotericina B todas as amostras foram sensíveis. Com relação ao antifúngico fluconazol, 11 (10.3%) das amostras foram sensível dose-dependente (SDD), entre elas: 1 *C. krusei*, 2 *C. guilliermondii*, 4 *C. parapsilosis*, 1 *C. orthopsilosis*, 1 *C. metapsilosis* e 2 *C. tropicalis*. Quatro (3.74%) das amostras apresentaram resistência, dentre elas, 2 *C. tropicalis*, 1 *C. parapsilosis* e 1 *C. glabrata*. Quando comparamos a produção de biofilme e a diminuição da sensibilidade para o antifúngico fluconazol, que foi o antifúngico que as espécies do complexo *C. parapsilosis* foram menos sensíveis, três amostras do complexo *C. parapsilosis* não foram produtoras de biofilme, uma amostra SDD foi fraca produtora, e a única amostra resistente não foi produtora de biofilme.

Para caspofungina, 2 amostras de *C. guilliermondii* foram resistentes. A determinação da variação (menor e maior concentração de antifúngico apresentado pelas amostras), bem como o CIM₅₀ e CIM₉₀, para as 107 amostras estudadas encontram-se na Tabela 6. Os dados referentes ao CIM₅₀ e CIM₉₀ e variação da concentração dos antifúngicos de cada espécie se encontram na Tabela 7.

O esquema da concentração inibitória mínima se encontra na figura 14:

Tabela 6 - Concentração inibitória mínima 50 e 90 e variação das drogas antifúngicas anfotericina B, fluconazol e caspofungina para as 107 amostras em estudo.

Antifúngico	Variação	CIM ₅₀	CIM ₉₀
Anfotericina B	0.016 - 1	0.1	0.23
Caspofungina	0.003 - >32	0.048	0.38
Fluconazol	0.094 - >256	1.62	8

Tabela 7 - Concentração inibitória mínima 50 e 90 e variação das drogas antifúngicas anfotericina B, fluconazol e caspofungina para cada espécie. *Demais espécies de levedura: *C. guilliermondii*, *Pichia anomala*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. pararugosa*.

Antifúngico	Espécie	Variação	CIM ₅₀	CIM ₉₀
Anfotericina B	<i>C. albicans</i>	0.032 – 0.5	0.1	0.14
Fluconazol	<i>C. albicans</i>	0.25 – 12	1.05	2.02
Caspofungina	<i>C. albicans</i>	0.012-0.25	0.025	0.07
Anfotericina B	<i>C. tropicalis</i>	0.047-0.75	0.13	0.23
Fluconazol	<i>C. tropicalis</i>	0.75- >256	1.51	16.33
Caspofungina	<i>C. tropicalis</i>	0.003-0.19	0.036	0.12
Anfotericina B	<i>C. parapsilosis</i>	0.023-1	0.132	0.25
Fluconazol	<i>C. parapsilosis</i>	0.75-48	2.23	12
Caspofungina	<i>C. parapsilosis</i>	<0.002- 1.5	0.3	0.75
Anfotericina B	Demais spp.*	0.016 - 0.25	0.1	0.14
Fluconazol	Demais spp.*	0.094 - >256	2.06	13.73
Caspofungina	Demais spp.*	0.032 - >32	0.1	1

Figura 14 - Esquema da concentração inibitória mínima pelo método “Etest[®]”, por uma amostra de *Candida albicans*.



Fonte: Próprio autor

Na avaliação da variação e CIM's para anfotericina B, o grupo que apresentou a maior variação foi o composto pelas espécies: *C. guilliermondii*, *Pichia anomala*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. pararugosa*. Já o grupo que apresentou o maior CIM foi *C. parapsilosis* CIM₅₀ 0.132 µg/mL e CIM₉₀ 0.25 µg/mL e os grupos que apresentaram os menores CIM's foi *C. albicans* e o grupo composto pelas demais espécies: CIM₅₀ 0.1 µg/mL e CIM₉₀ 0.14 µg/mL.

No antifúngico fluconazol, o grupo que apresentou a maior variação foi o composto pelas demais espécies (0.094 µg/mL ->256 µg/mL) o maior CIM₅₀ foi *C. parapsilosis* (2.23 µg/mL) e o maior CIM₉₀ *C. tropicalis*. E a espécie que apresentou os menores CIM's foi novamente *C. albicans*: Cim₅₀ 1.05 µg/mL e Cim₉₀ 2.02 µg/mL.

Para caspofungina, a maior variação apresentada foi novamente o grupo composto pelas demais espécies (0.032 µg/mL - >32 µg/mL) e os maiores CIM's apresentados foi CIM₅₀ 0.3 µg/mL *C. parapsilosis* e CIM₉₀ 1 µg/mL pelo grupo demais espécies, sendo que uma diminuição da sensibilidade foi percebida em 2 amostras de *C. parapsilosis*, que apresentaram MIC's de 4 µg/mL.

Na análise estatística, para todos os antifúngicos (anfotericina B, fluconazol e caspofungina) as espécies não-*albicans* produziram CIM's mais altos que as *C. albicans* (p>0.05).

5 DISCUSSÃO

5.1 Características dos pacientes

Em relação aos pacientes, os do sexo masculino representaram a maioria 59,81%, assim como no trabalho de Viani, (2007), que também trabalhou com amostras provenientes de hospital pediátrico, e os pacientes do sexo masculino representaram cerca de 60%. Assim como no trabalho citado, neste presente trabalho também não encontramos nenhuma explicação plausível para justificar tal fato.

A média de idade dos pacientes atendidos no hospital público infantil no período em estudo foi 4,6 anos. Zaoutis et al., (2004), realizaram uma pesquisa com crianças com candidemia e a média de idade dos pacientes foi de 3,5 anos. Esta média de idade nas duas pesquisas não reflete um grupo de risco para o desenvolvimento de candidemia, quando consideramos apenas a idade dos pacientes, que são a prematuridade e o baixo peso ao nascer (MACDONALD; BAKER; CHENOWETH, 1998). No entanto, diversos outros fatores são considerados de risco para desenvolvimento de ICS: internação em UTI, imunossupressão, uso de CVC, dentre outros.

5.2 Ocorrência das espécies de leveduras

A taxa de infecções da corrente sanguínea (ICS) causadas por fungos têm crescido significativamente nas últimas décadas. Para se ter uma idéia, em um estudo realizado nos Estados Unidos, o número médio de culturas de sangue positivas para fungos aumentou de 6,8 pacientes por ano entre 1991 e 1996, para 13,0 pacientes entre 1997 e 2001 (um aumento de 91%) (ABELSON, et al., 2005). Em um outro estudo também realizado nos Estados Unidos, em 1989 a taxa de isolamento de ICS por fungos era de 11% passando para 23% em 1993 (MCDONALDS; BAKER; CHENOWETH, 1998).

Em nossa pesquisa, em três anos, 35% das amostras de leveduras foram isoladas de sangue ou de cateter. Quando analisamos os períodos, houve um discreto aumento no isolamento de amostras de sangue e cateter de 2007 para 2008. Nos outros anos (2009 e 2010), houve um declínio na ocorrência de leveduras isoladas dos materiais em estudo. No total, podemos dizer que a quantidade de isolamentos de sangue e cateter se manteve estável com o passar dos anos. Entretanto, quando analisamos os materiais separadamente, notamos

que os casos de isolamento de sangue aumentaram com o passar dos anos e os casos de infecções relacionadas ao uso do cateter diminuíram de 2008 a 2010. Uma hipótese para tal fato seria o aumento da vigilância do hospital em relação a assepsia dos profissionais ao manusearem o cateter, pois, o uso de cateter é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de candidemia. Segundo McDonald; Baker; Chenoweth, (1998), embora as crianças diferem dos adultos em muitos aspectos, encontramos um mesmo fator, de risco para candidemia, a nutrição parenteral total, esta se aplica tanto para crianças quanto para adultos.

Em relação ao aumento das leveduras provenientes de hemocultura, mesmo que a contaminação por meio de cateter seja considerado um fator desencadeante, não pode ser considerado como um fator isolado nas infecções nosocomiais.

C. albicans tem sido historicamente a espécie mais frequentemente isolada em culturas de sangue, representando cerca de 60-70% das infecções em pacientes pediátricos, no entanto, estudos têm documentado um aumento da proporção de infecções causadas por *Candida* não-*albicans* (AWASTHI et al., 2011). Em uma pesquisa realizada em um hospital pediátrico, espécies de *Candida* foram as mais comuns isoladas entre os pacientes fungêmicos, presentes em 91% 88 de 97 (dos casos). As espécies de *Candida* mais comuns identificadas no sangue mudaram ao longo do tempo. No geral, *C. albicans* constituiu 60% dos casos isolados de sangue entre 1991 e 1996 e 48% dos isolados entre 1997 e 2001 (P=0,28), o que foi consistente entre os grupos etários (ABELSON et al., 2005).

Em um outro estudo realizado em pacientes com candidemia em um hospital de Porto Rico as espécies não-*albicans* representaram cerca de 83% dos isolados, e com menor frequência *C. albicans* 17% (CONDE-ROSA et al., 2010). Em nosso estudo, também isolamos mais espécies não-*albicans* (63,55%) que *C. albicans* (36,45%). Observamos que *C. albicans* no ano de 2007 representou 44% dos isolados, houve um pequeno aumento no isolamento de *C. albicans* em 2008 (48,28%) e, em 2009 e 2010 houve um declínio no isolamento de *C. albicans* (22,22% e 30,77%, respectivamente). Esta alta taxa de espécies não-*albicans* em candidemia em hospitais brasileiros já vem sendo relatada há algum tempo (COLOMBO et al., 1999).

Pfaller et al., (2002), verificaram a frequência de espécies de leveduras em ICS e em diferentes grupos de faixa etária; este estudo durou três anos e foi realizado em hospitais dos Estados Unidos, Canadá, América Latina e Europa. Nos pacientes com faixa etária inferior a um ano de idade até os 15 anos, foi observado que *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foram as espécies predominantes. No Brasil, estas espécies não-*albicans* são as mais comuns em casos de fungemia. No mesmo estudo, *C. krusei* e *C. glabrata* foram encontradas em uma

proporção muito menor em pacientes na faixa etária em questão. Estes dados são muito similares aos dados do nosso trabalho, porque a nossa pesquisa também foi realizada com pacientes pediátricos, sendo a média de idade dos nossos pacientes 4,6 anos e, *C. albicans* (36.45%), *C. tropicalis* (23.36%) e *C. parapsilosis* (21.49%) foram as espécies prevalentes, enquanto que *C. krusei* e *C. glabrata* foram isoladas em apenas 2.80% e 1.87% dos casos, respectivamente.

Hinrichsen et al.,(2009); Muñoz et al.,(2010); Viani, (2007); e Yapar et al.,(2010); também relatam que houve uma progressão na incidência de candidemia causada pelo aumento de espécies não-*albicans*, representadas por *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, e afirmam que, embora nos últimos anos, *Candida albicans* foi responsável por mais da metade dos casos de candidemia, a taxa de infecções causadas por espécies não-*albicans* tem aumentado gradualmente.

Estudos recentes relatam que *C. tropicalis* é uma das espécies de *Candida* que mais freqüentemente causam infecções do trato urinário e candidemia, especialmente em crianças (NEGRI et al., 2009) além de infecções do trato respiratório e de onicomicoses (FRANÇA et al., 2010).

Trabalhos atuais também evidenciam que o aumento da incidência de *C. parapsilosis* deve-se a alguns fatores importantes tais como: nutrição parenteral e o uso de cateteres venosos centrais, pois esta espécie tem facilidade em formar biofilme (ALMIRANTE et al., 2006; HORASAN et al., 2010). No entanto, possíveis fontes e vias de transmissão de infecções causadas por *C. parapsilosis* não são sempre fáceis de identificar, e em alguns casos a epidemiologia da infecção permanece obscura (ASBECK et al., 2007). Portanto, aqui podemos ressaltar a importância epidemiológica do nosso trabalho uma vez que *C. parapsilosis* foi uma das espécies mais estudadas e que mereceu especial atenção. Comparando-se com a década de 1980, uma maior incidência de espécies não-*albicans*, causadoras de ICS, na atualidade são importantes patógenos, tal como *C. glabrata*, nos Estados Unidos, e na Europa, Canadá e América Latina, esta posição é ocupada por *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* (ALMIRANTE et al., 2006).

O aumento da proporção de fungemia por espécies não-*albicans* como *C. glabrata* e *C. krusei* tem implicações importantes na terapia. *C. krusei* é intrinsecamente resistente ao fluconazol e *C. glabrata* é relativamente resistente ao fluconazol que é o antifúngico escolhido na maioria destes casos (CHOI et al., 2009).

C. guilliermondii também foi isolada de nosso trabalho. Embora ainda sejam relativamente raras, infecções causadas por *Candida guilliermondii*, ocorrem em pacientes

com câncer, neoplasias hematológicas, ou ocorrem como infecções nosocomiais por meio do uso de CVC, sendo a taxa de mortalidade alta (YAMAMURA et al., 2009). Sangue, pele, unhas, tecidos e (menos freqüentemente) na urina e trato genital representam os lugares a partir do qual o fungo tem sido mais frequentemente isolado como um suposto patógeno (SAVINI et al., 2010).

Nós previamente já havíamos isolado *Pichia anomala* do sangue de criança em um hospital pediátrico (PAULA et al., 2006). Pasqualotto et al., (2005), em outro estudo realizado em um hospital pediátrico também no Brasil, de outubro de 2002 a dezembro de 2004, detectaram um surto de *Pichia anomala*, onde 17 pacientes desenvolveram fungemia por esta espécie, e estudos moleculares demonstraram que este surto foi causado por uma única cepa. Esta levedura não foi isolada nem das mãos dos profissionais do hospital e nem do meio ambiente.

Na Índia, um surto hospitalar causado por *Pichia anomala* em um período de 23 meses (Abril de 1996 a Fevereiro de 1998), onde a provável disseminação do fungo era através do transporte pelas mãos de profissionais de saúde, levou a comissão de controle de infecção hospitalar a ter um controle rígido e educacional para melhorar a lavagem das mãos. Na análise dos potenciais fatores de risco para infecção por *Pichia anomala* em crianças constatou-se prematuridade, peso muito baixo, uma maior duração da internação hospitalar (CHAKRABARTI et al., 2001), o uso de cateter venoso central, nutrição parenteral total, emulsão lipídica, uso prévio de antimicrobianos, e outros procedimentos invasivos (ARAGÃO et al., 2011).

5.3 Associação entre o cateter colonizado e sepse

Em nosso trabalho, cinco pacientes apresentaram a mesma espécie isolada tanto de sangue quanto de cateter. Nestes casos o cateter foi possivelmente a fonte de contaminação. Em nosso grupo de trabalho, Batista, (2009) já havia demonstrado infecções em pacientes neonatos causadas pelo uso do CVC.

5.4 Diferenciação fenotípica de *C. albicans* e *C. dubliniensis*

Candida dubliniensis é uma levedura oportunista isolada em vários sítios do corpo humano e em muitas populações, porém, é encontrada com mais freqüência na cavidade bucal de pacientes contaminados com o vírus da imunodeficiência adquirida (Horasan et al, 2010).

Em nosso trabalho, investigamos se haveria alguma *C. dubliniensis* dentro do complexo *C. albicans*, pois *Candida dubliniensis* apresenta perfil bioquímico e morfológico semelhante a *Candida albicans*, porém, existem algumas características fenotípicas nas quais é possível diferenciá-las. Em nosso estudo, de acordo com as provas fenotípicas, não isolamos *C. dubliniensis* de nenhum dos materiais em estudo.

Porém, diferentemente do nosso trabalho, apesar de esta espécie ser considerada rara em candidemia, em uma pesquisa realizada nos Estados Unidos, os autores isolaram as quatro primeiras cepas de *C. dubliniensis* isoladas do sangue (BRANDT et al., 2000). Meis et al., (1999), na Holanda, também relataram três casos de candidemia causada por *Candida dubliniensis* em pacientes HIV-negativos com imunossupressão induzida por quimioterapia e transplante de medula óssea. É importante salientar que ambos autores citados acima utilizaram técnicas moleculares para a diferenciação entre as duas espécies, e isto não ocorreu em nosso trabalho.

No entanto, em nosso grupo de trabalho Batista (2009) e Khouri (2010), fizeram tanto os testes genotípicos quanto os testes fenotípicos para diferenciar estas duas espécies. Estes estudos foram em amostras isoladas do sangue, cavidade oral de neonatos de alto risco e de adultos e crianças com suspeita de infecção hospitalar. No entanto, *C. dubliniensis* não foi encontrada em nenhuma dessas populações em estudo. Vale a pena salientar que os testes fenotípicos como, crescimento a 42 °C ou 45 °C e a coloração no meio cromogênico foram concordantes com os testes genotípicos.

Na literatura encontramos ainda mais relatos de trabalhos em que a diferenciação fenotípica de *C. albicans* e *C. dubliniensis* usando um ou mais testes utilizados em nosso trabalho, é concordante com a identificação molecular (ALVES et al., 2000, ALVES et al., 2002, MARIANO et al., 2003).

Os testes fenotípicos para a diferenciação destas duas espécies são considerados rápidos, baratos, consistentes e reprodutíveis podendo ser utilizados em laboratórios hospitalares. A detecção de *C. dubliniensis* é importante para uma terapia adequada, uma vez que, embora a maioria das cepas sejam sensíveis, tem sido detectadas cepas de *C. dubliniensis* resistentes ao fluconazol (MARTINEZ et al., 2002).

5.5 Seqüenciamento das amostras *Candida spp.*, *Pichia anomala* e *Candida haemulonii*

O método tradicional é importante e nunca deve ser negligenciado pelas técnicas mais modernas (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). Em nosso estudo, a técnica de

seqüenciamento (LEAW et al., 2006) elucidou em nível de espécie sete amostras que pelo método tradicional estavam classificadas como *Candida spp.* Em uma rotina laboratorial é muito difícil implantar algumas técnicas moleculares tanto pelo tempo esperado quanto pelo custo dispendioso.

Também fizemos o seqüenciamento de duas amostras identificadas fenotipicamente como *Pichia anomala* (o qual foi confirmado pelo método do seqüenciamento) e de um de nossos isolados, que na identificação fenotípica, apresentou perfil bioquímico semelhante a *C. haemulonii*, que é uma levedura considerada emergente e que vem sendo isolada de episódios de candidemia em infecções relacionadas ao uso de cateter (KIM et al., 2011). Para confirmarmos o isolamento de *C. haemulonii* foi feito o seqüenciamento pela região ITS e domínio D1/D2, região que também já foi utilizada para identificar *Candida haemulonii* em outros trabalhos (KIM et al., 2009). No entanto, no seqüenciamento o resultado foi *Candida guilliermondii*.

5.6 Complexo *Candida parapsilosis*

Em um estudo de três anos realizado em hospital na Austrália, foram analisados casos de candidemia em neonatos, crianças e adultos. Candidemia foi atribuída ao uso de cateter vascular em 58% dos neonatos, 70% das crianças e 44% dos adultos. *C. parapsilosis* foi significativamente mais comum em neonatos (42%) e crianças (38%) do que em adultos (15%). *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* foram infrequentes em todos os grupos. Porém, *C. orthopsilosis* foi significativamente mais comum em crianças (1.9%) quando comparadas com adultos (0,6%), $P = 0.035$). *C. metapsilosis* apenas foi encontrada na população adulta (0.5%) (BLYTH et al., 2009).

De Toro et al., (2010), pesquisaram as espécies dentro do complexo *Candida parapsilosis*, isoladas de materiais como sangue e outros, e, assim como em nosso trabalho, *C. parapsilosis sensu stricto* foi a espécie mais isolada, representando 91% das amostras (17 em sangue e 6 em cateter), 8,2% *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* 0,8% (ambas em sangue).

Em um estudo realizado em um hospital na Itália, de recém-nascidos foram isoladas 17,7% das leveduras pertencentes ao complexo *Candida parapsilosis*. A maioria dos isolamentos deste complexo foi associada a infecções da corrente sanguínea e ao uso de cateter venoso central. Embora os autores utilizassem outra metodologia molecular para diferenciar as três espécies, também reproduziram resultados bem semelhantes ao nosso

trabalho, onde, *C. parapsilosis sensu stricto* foi a levedura mais isolada representando 95% das culturas, *C. orthopsilosis* 3,6% e *C. metapsilosis* 1,4% (BORGUI et al., 2011).

Silva et al., (2009), pesquisaram a prevalência de espécies do complexo *Candida parapsilosis* em 175 amostras clínicas e ambientais identificadas fenotipicamente como *C. parapsilosis*. Dos 175 isolados, 160 (91.4%) foram identificados como *C. parapsilosis sensu stricto*, quatro (2.3%) foram identificadas como *C. orthopsilosis*, e cinco (2.9%) foram identificadas como *C. metapsilosis*.

Podemos observar por meio da literatura, que, assim como em nosso trabalho, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* são espécies ainda consideradas raras em infecções fúngicas mesmo dentro do complexo *Candida parapsilosis*. No entanto, a importância epidemiológica deste estudo baseia-se no fato de que pesquisas têm demonstrado que estas espécies emergentes possuem perfil de sensibilidade aos antifúngicos diferente de *C. parapsilosis sensu stricto*. Dessa forma, a identificação em nível de espécie dentro deste complexo pode orientar um tratamento mais adequado.

5.7 Produção de biofilme por espécies do complexo *Candida parapsilosis*

Em um estudo realizado no sul da Espanha em um hospital terciário, De toro et al., (2010), utilizando uma metodologia diferente da empregada neste trabalho, observaram produção de biofilme em 45% (66/111) das amostras de *C. parapsilosis sensu stricto* e 0% (0/11) em *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. Estes resultados mostram-se semelhante aos nossos, uma vez que, nesta pesquisa, 34,8% das amostras de *C. parapsilosis sensu stricto* produziram biofilme, e das duas amostras de *C. orthopsilosis*, apenas uma produziu biofilme e *C. metapsilosis* não produziu biofilme.

No entanto esta questão não mostra-se totalmente esclarecida, uma vez que a literatura mostra vários dados conflitantes a respeito da capacidade de formar biofilme das três espécies do complexo. Tavanti et al, (2005) relataram que não existiu nenhuma diferença significativa na formação de biofilmes pelas espécies. Em trabalho subsequente, Tavanti et al., (2007) observaram que isolados de *C. orthopsilosis* não formaram biofilmes “in vitro”. Song et al. (2005) relataram que *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* não produziram biofilme. No entanto, em estudo recente, Lattif et al. (2010) mostraram que similarmente a *C. parapsilosis*, as duas novas espécies de *Candida* identificadas foram capazes de formar biofilme. Estes dados refletem a necessidade de maiores estudos envolvendo a relação do biofilme com as três espécies de *Candida*.

Melo et al., (2011), compararam a produção de biofilme de diferentes espécies de leveduras isoladas em diferentes materiais, pelo método de cristal de violeta, e, assim como neste trabalho, as amostras do complexo *C. parapsilosis* não foram grandes produtoras de biofilme, uma vez que a escala de classificação de produção de biofilme ficou da seguinte forma: *C. tropicalis* > *C. albicans* > *C. parapsilosis* > *C. orthopsilosis* > *C. metapsilosis*. Ao compararem com outras espécies, Hawser; Douglas, (1994), demonstraram que *C. parapsilosis* não foi a maior espécie produtora de biofilme, pois a mesma e outras espécies produziram significativamente menos biofilme que *C. albicans*.

Kuhn et al., (2002), também demonstraram que *C. albicans* produziu mais biofilme que outras leveduras, como *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, e *C. tropicalis*.

Ao estudarem a produção de biofilme em amostras de *C. parapsilosis* isoladas do sangue e da pele, pelo método do cristal de violeta, Ruzicka et al., (2007), notaram que 59% das amostras isoladas de sangue produziram biofilme, enquanto que apenas 39% das amostras isoladas da pele produziram biofilme. Os autores, então, sugeriram que a formação de biofilme desempenha um papel importante no desenvolvimento de infecções sanguíneas por *C. parapsilosis*. Song et al.,(2005), estudando vários materiais, observaram que 83% dos isolados de sangue foram produtores de biofilme, e apenas 46% dos isolados de outros locais foram produtores de biofilme. As leveduras do complexo *C. parapsilosis* isoladas das mãos dos funcionários do hospital, também mostraram uma alta produção de biofilme (72%).

Apesar de a literatura considerar que o biofilme desempenha um papel importante em infecções relacionadas ao cateter, em nossa pesquisa, verificamos que as amostras de sangue produziram mais biofilme que as de cateter, pois apenas uma (1/8) das amostras isoladas de cateter produziram biofilme e sete (7/15) das amostras isoladas de sangue foram produtoras, ainda que fracamente.

É sabido que a produção de biofilme pelos microrganismos têm efeitos na terapia antimicrobiana. No entanto, testes para biofilme ainda não estão padronizados como áqueles para células plantônicas. Porém, alguns artigos têm concordado com essa teoria de uma diminuição da sensibilidade frente aos antifúngicos, principalmente o fluconazol, mediante biofilme (KUHN et al., 2002). Melo et al., (2011) demonstraram que o fluconazol não foi ativo contra biofilmes de *Candida*, enquanto que anfotericina B exibiu alguma atividade antifúngica contra as células do biofilme, dependendo das espécies testadas. No entanto *C. parapsilosis*, apesar de produzir uma massa de biofilme menor que *C. albicans* e *C. tropicalis*, demonstrou ser menos sensível do que as duas outras espécies.

No presente trabalho, ao analisarmos a produção de biofilme das amostras do complexo *C. parapsilosis*, com a sensibilidade apresentada para o antifúngico fluconazol, pareceu não haver correlação entre a produção de biofilme e uma baixa sensibilidade ao antifúngico. No entanto, devemos enfatizar que a técnica de sensibilidade aos antifúngicos utilizada na pesquisa, foi a padronizada pelo CLSI, onde são utilizadas células plantônicas.

5.8 Produção de fatores de virulência (proteínase, fosfolipase, hemolisina e hialuronidase):

Tay et al., (2011), na Malásia, estudaram a produção de proteínase e fosfolipase de amostras isoladas de sangue. A produção de proteínase e fosfolipase pelas amostras de *C. albicans* foram detectadas em 93,7% e 73,3% das cepas, respectivamente. Das amostras não-*albicans*, a produção de proteínase e fosfolipase foi detectada em 88,5% e 7,7% dos isolados. Não houve diferença significativa na produção de proteínase entre os isolados ($P = 0.272$), porém quando comparamos a produção de fosfolipase entre *C. albicans* e espécies não-*albicans*, assim como em nosso trabalho, a produção pelas amostras *C. albicans* foi significativamente maior do que as não-*albicans*.

Vinitha; Ballal, (2009), ao pesquisarem a produção de proteínase, detectaram a produção da exoenzima em 76,47% dos isolados, e fosfolipase em 42,48%, porém, não discriminaram as espécies mais produtoras.

Bosco et al., (2003), analisaram a produção de exoenzimas de leveduras isoladas da cavidade oral de crianças com AIDS. A produção de proteínase e fosfolipase foi maior nos pacientes com AIDS do que no grupo controle, que era composto por crianças saudáveis.

Negri et al.,(2009); trabalharam com oito cepas de *C. tropicalis*. Na produção da exoenzima proteínase, duas cepas, uma de sangue e outra de cateter, foram fortemente produtoras de proteínase, e das outras cinco, isoladas de urina, duas foram fortemente produtoras. Em nosso trabalho todas as cepas foram fortemente produtoras de proteínase. Negri et al., (2009), também estudaram as cepas de *C. tropicalis* em relação à produção de fosfolipase, e apenas uma foi fortemente produtora de fosfolipase, cepa esta isolada de cateter.

Ao analisarem a diferença na produção de exoenzimas de leveduras isoladas de cateter, sangue e da cavidade oral, Costa et al., (2010) diferentemente do nosso trabalho, observaram que, na produção de proteínase, as cepas de *C. albicans* foram as maiores produtoras (88,1%) do que as não-*albicans* (69,8%). Na produção de fosfolipase as 55,9% das amostras de *C. albicans* foram produtoras frente 37,7% das espécies não-*albicans*.

Costa et al., (2009), analisaram a produção de proteinase e fosfolipase em *C. albicans* e *C. tropicalis*, e concluíram que, as duas espécies são produtoras de proteinase, enquanto que, apenas *C. albicans* apresentou atividade fosfolipídica. Em nosso trabalho ambas as espécies apresentaram isolados tanto produtores quanto não produtores de fosfolipase, porém, apenas *C. albicans* e *Pichia anomala* apresentaram índice III, que é considerado fortemente produtor.

Batista, (2009), relatou que cepas de *Pichia anomala* não produziram proteinase e fosfolipase. Porém, em nosso trabalho, além de todas serem produtoras e classificadas como índice III para proteinase, as cepas desta espécie foram as únicas, além de *C. albicans* capaz de produzir também índice III para fosfolipase.

Ainda pouco se discute sobre a atividade hemolítica das diferentes espécies de *Candida*. O elemento inorgânico ferro é indispensável ao desenvolvimento dos microrganismos em geral, inclusive das leveduras, e a obtenção desse elemento é essencial para o estabelecimento de um processo infeccioso. A atividade hemolítica expressa a capacidade da levedura em destruir as hemácias com a finalidade de obter ferro (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Ao compararem a atividade hemolítica de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* de diferentes sítios anatômicos, França et al.,(2010), relataram que amostras de *C. tropicalis* isoladas de sangue tiveram uma maior atividade hemolítica em relação a *C. parapsilosis* isolada do mesmo sítio anatômico. *C. parapsilosis* isolada de secreção traqueal, apresentou uma maior atividade hemolítica do que a mesma espécie isolada de sangue. Igualmente, todas as nossas amostras de *C. tropicalis* produziram hemolisina. Nossas amostras de *C. parapsilosis* em sua grande maioria apresentaram atividade hemolítica, porém tivemos duas amostras que não apresentaram produção da exoenzima. *C. tropicalis* em nosso trabalho, também pareceu ser mais produtor de hemolisina que *C. parapsilosis*.

Viani (2007) observou que *C. glabrata* tem atividade hemolítica inferior a *C. albicans* e *C. tropicalis* estatisticamente significativa para $p < 0,05$. Em nosso trabalho encontramos um número baixo de isolados de *C. glabrata*, portanto, não é possível fazer uma comparação que seja estatisticamente significativa. O que pudemos observar é que, tanto *C. albicans*, *C. tropicalis* quanto *C. glabrata*, apresentaram atividade de hemolisina.

Rörig et al.,(2009) pesquisaram fatores relacionados à virulência de várias espécies de *Candida*, e observaram que amostras de *C. albicans* apresentaram maior atividade de proteinase, fosfolipase e hemolisina que as demais espécies. Luo; Samaranayake; Yau (2001), também pesquisaram a atividade hemolítica de espécies de *Candida*. Concluíram que, das

espécies patogênicas mais comuns, *C. albicans* e *C. dubliniensis* parecem ser mais produtores de hemolisinas.

A literatura não relata estudos sobre a produção de hialuronidase em leveduras isoladas de casos de candidemia, e, mesmo entre o estudo de hialuronidase em *Candida spp.* os dados são escassos.

Em um estudo realizado com leveduras do gênero *Candida* isoladas de lactantes, constatou-se que as atividades enzimáticas de *C. albicans*, a espécie mais prevalente, foram: 100% das cepas produziram fosfolipase; 64% hialuronidase; e nenhuma produziu proteinase. Os autores sugerem que a alta atividade fosfolipidolítica encontrada e a produção de tubo germinativo, bem como a produção de hialuronidase, podem facilitar a penetração da levedura na mucosa (MENEZES et al., 2004).

Shimizu et al., (1995) verificaram a produção da exoenzima hialuronidase em amostras de *Candida* e constataram que, entre as amostras de *C. albicans* 97,8% das mesmas foram produtoras de hialuronidase. A segunda espécie maior produtora foi *C. tropicalis*, seguida por *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*. Não foi encontrada nenhuma relação entre a fonte de isolamento e a quantidade de hialuronidase produzida. Em nosso trabalho, as espécies não-*albicans* foram maiores produtoras desta enzima, sendo que as únicas espécies não foram produtoras foram: *C. krusei* e *C. pararugosa*.

Pelos nossos achados podemos sugerir que os principais fatores relacionados a virulência e estudadas nesta pesquisa, são as enzimas, fosfolipase e hemolisina, para *C. albicans*. As demais enzimas podem servir como facilitadoras do metabolismo desta levedura. Ainda é importante salientar que uma metodologia mais acurada, como a produção da proteinase em meio líquido seguida de eletroforese, poderia modificar estes resultados.

5.9 Sensibilidade aos antifúngicos

A taxa de incidência por fungemia continua a aumentar em muitos hospitais no mundo, sendo *Candida spp.* um dos principais patógenos associados a esse fenômeno. Anfotericina B e fluconazol têm sido amplamente utilizados para o tratamento de fungemia. No entanto, antifúngicos recém sintetizados como a caspofungina expandiram o escasso arsenal antifúngico (GUINEA et al., 2010).

O “kit” comercial “Etest[®]” tem sido descrito como um bom método para uso em rotina laboratorial, provando ser um uma boa alternativa para testes de sensibilidade *in vitro* (MATSUMOTO et al., 2007). Este método permite a determinação da concentração inibitória

mínima, e têm mostrado excelentes benefícios, como fácil execução e rapidez nos resultados (NEGRI et al., 2009), sendo potencialmente útil para detectar amostras resistentes para anfotericina B (CLANCY; NGUYEN, 1999).

Motta et al., (2010) ao pesquisarem a sensibilidade aos antifúngicos pelo método “Etest[®]” em amostras derivadas de ICS, assim como em nosso trabalho, verificaram que todas as amostras foram sensíveis a anfotericina B, sendo que os CIM₅₀ e CIM₉₀ apresentados foram de 0.125 µg/mL e 0.5 µg/mL, respectivamente. Em nossa pesquisa, nossas amostras apresentaram CIM's parecidos: CIM₅₀ 0,1 µg/mL e Cim₉₀ 0.23 µg/mL.

Mimica et al., (2009), estudaram a sensibilidade aos antifúngicos pelo método “Etest[®]” em amostras de leveduras isoladas de diferentes materiais biológicos. Igualmente, todas as amostras foram sensíveis a anfotericina B.

Em um estudo realizado na Itália por Morace et al., (2011), o CIM₅₀ e CIM₉₀ das amostras derivadas de sangue, cateter e fluídos estéreis para anfotericina B foi: 0.19µg/mL e 0.38µg/mL, respectivamente, sendo que não foi encontrada nenhuma amostra resistente.

Diferentemente do nosso trabalho, Metin et al., (2011), detectaram resistência em cepas de *Candida* isoladas de sangue, frente a droga anfotericina B. Dentre elas destacaram as espécies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. inconspicua*, *C. sake*, and *C. pelliculosa*. Os autores sugerem que a variação nas taxas de sensibilidade para anfotericina B, deve resultar das diferenças na população entre os países em estudo; uso anterior de agentes antifúngicos; distribuição das espécies de *Candida*; métodos de sensibilidade *in vitro* e diferentes valores de “breakpoints” para anfotericina B, os quais são controversos.

Negri et al., (2009), ao estudarem a sensibilidade aos antifúngicos em amostras isoladas de colonização e de infecção, também encontraram resistência para anfotericina B em duas amostras: *C. albicans* (MIC=32) e *C. glabrata* (MIC=56).

Em outro estudo foi detectado resistência em espécies de *Candida* frente ao antifúngico anfotericina B pelo método “Etest[®]”. Este estudo de cinco anos foi realizado em um hospital universitário na Turquia com amostras isoladas de sangue, urina, cateter, dentre outros materiais. Dessas amostras, sete (1%) dos isolados de *Candida krusei* apresentaram resistência a anfotericina B. Também realizaram o teste de sensibilidade para o fluconazol, e, das amostras em estudo, *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata* foram consideradas resistentes (KIRAZ; OZ, 2011).

Motta et al., (2010), também pesquisaram a sensibilidade das amostras provenientes de casos de candidemia para o antifúngico fluconazol, onde todas as espécies foram sensíveis

para esta droga. Porém, notaram uma diminuição da sensibilidade em pelo menos uma amostra de cada espécie: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. O CIM₅₀ apresentado pelas amostras foi de 0,25 µg/mL e o CIM₉₀ 4 µg/mL. Em nossa pesquisa, o CIM₅₀ apresentado foi 1.62 µg/mL e o CIM₉₀ 8 µg/mL, sendo que nem todas nossas amostras foram sensíveis; algumas foram SDD, entre elas as espécies: *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* sensu stricto, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. tropicalis*. Também tivemos espécies resistentes, entre elas: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* sensu stricto e *C. glabrata*.

Mimica et al., (2009), pesquisaram a sensibilidade de amostras de leveduras frente ao antifúngico fluconazol, e, igualmente, dectaram resistência em duas amostras: uma de *C. krusei* e uma de *C. parapsilosis*.

Em outro estudo realizado no Chile, todas as amostras provenientes de candidíase invasiva foram sensíveis ao fluconazol, exceto *C. glabrata* (CRUZ; PONTELLI, 2011).

Nos últimos anos, houve um aumento na prevalência de isolados de *Candida glabrata* com sensibilidade reduzida para antifúngicos azólicos, ressaltando-se ainda que *C. krusei*, é intrinsecamente resistente ao fluconazol (SAFDAR et al., 2002). Isso traz preocupações crescentes sobre o uso empírico de antifúngicos azóis, especialmente em doentes com risco de infecção sistêmica.

Recentemente, tem sido descrito na literatura casos de amostras do complexo *Candida parapsilosis* resistentes ao fluconazol. Em um estudo de 12 anos realizado na Finlândia em um hospital infantil foi detectado a resistência de cepas de *C. parapsilosis*. A genotipagem dessas amostras demonstrou que a mesma cepa estava circulando no hospital há anos, e era transmitida para os pacientes por transmissão horizontal. A explicação dos autores para o surgimento desta cepa de *C. parapsilosis* resistente é que ela foi causada por um longo uso de fluconazol como profilaxia no hospital em estudo. Em nosso estudo, 6 das leveduras pertencentes ao Complexo *C. parapsilosis* ou foram SDD e 1 resistente (SARVIKIVI et al., 2005).

Morace et al., (2011), também pesquisou o CIM das amostras frente ao fluconazol e, o CIM₅₀ e Cim₉₀ encontrado foi de 0.38 e 8, respectivamente. Este estudo demonstrou ainda resistência em cepas de *C. krusei* e *C. glabrata*.

Um dos problemas no método “Etest[®]” para o antifúngico fluconazol, é que, especificamente para esta droga foram detectados alguns casos de falsa resistência (NEGRI et al., 2009). Este fato pode ser causado devido a presença de um fenômeno conhecido como “trailing”. O fenômeno “trailing” se refere a um crescimento reduzido, mas persistente, de

alguns isolados de *Candida* em concentrações mais elevadas de antifúngicos azóis, especialmente fluconazol. Este fenômeno está relacionado com a inibição parcial do crescimento da levedura. Isso pode levar a uma interpretação errada, onde um isolado pode ter um valor menor de CIM às 24 horas e um valor de CIM muito maior as 48 horas, sendo que o isolado parece sensível na leitura referente a 24 horas e pode ser interpretado como resistente na leitura de 48 horas (ALP et al., 2010).

No entanto, em nosso trabalho de leitura, o fenômeno “trailing” não foi um problema, visto que as espécies que se apresentaram como resistentes na leitura de 48 horas, já eram resistentes na leitura de 24 horas.

Motta et al., (2010), pesquisaram a sensibilidade das amostras de candidemia frente ao antifúngico caspofungina. O CIM₅₀ apresentado foi 0.125 µg/mL e o CIM₉₀ 1 µg/mL. Duas amostras de *Candida parapsilosis* apresentaram CIM de 4 µg/mL sendo consideradas resistentes. Em nossa pesquisa, as amostras no geral, apresentaram CIM's menores: CIM₅₀ 0.048 µg/mL e CIM₉₀ 0.38. Duas amostras de *C. guilliermondii* foram resistentes, porém quando se analisou cada espécie em separado, podemos notar que *C. parapsilosis* apresentou o maior CIM₅₀ 0.3 µg/mL e o grupo composto pelas demais espécies apresentou o maior Cim₉₀ 1 µg/mL.

O CIM alto para *C. parapsilosis* e a resistência em *C. guilliermondii* pode ser explicado pelo polimorfismo das cepas desta espécie, que ocorre, naturalmente, e está localizado no “hot spot 1” no gene FKS1. Esse gene codifica o alvo e subunidade maior do complexo sintase 1,3-β-D-glucana que é o alvo principal da caspofungina (GARCIA-EFFRON et al., 2008).

Borgui et al., (2011), ao analisarem o CIM₉₀ do complexo *Candida parapsilosis*, para caspofungina, observaram que o mesmo foi de 2 µg/mL, sendo que nenhuma das leveduras em estudo foi considerada resistente.

Para o antifúngico caspofungina, na pesquisa feita por Morace et al., (2011), as amostras apresentaram CIM₅₀ 0.19 µg/mL e Cim₉₀ 0.75 µg/mL, sendo que não foi detectada resistência a este antifúngico com relação as espécies de *Candida*.

Axner-Elings et al., (2011), encontraram resistência para caspofungina em três amostras: *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida guilliermondii*. No total, duas amostras de *Candida krusei* foram consideradas intermediárias para resistência.

No nosso estudo, *Candida albicans* apresentou os menores valores de CIM para todas as drogas antifúngicas utilizadas com relação a todas outras espécies. Assim como no trabalho de Metin et al., (2011), todos os agentes antifúngicos parecem ser mais ativos contra *C.*

albicans que espécies não-*albicans*, pois, em nossa análise estatística, *C. albicans* produziu os menores CIM's para todos os antifúngicos, quando comparada com espécies não-*albicans* ($p > 0.05$).

Pelos nossos achados e pela literatura pertinente podemos notar a importância do estudo de casos de infecção hospitalar por leveduras especialmente do gênero *Candida*. Verificamos o aumento das espécies não-*albicans* com o passar dos anos (principalmente nos anos de 2009 e 2010). As espécies não-*albicans* vem crescendo ano após ano nestes casos de infecção hospitalar, e, por isso, ressalta-se que uma correta identificação em nível de espécie é recomendável. Salienta-se também a resistência aos usuais antifúngicos por espécies não-*albicans*, sendo que alguns métodos comerciais como o “Etest[®]”, podem ser utilizados na rotina laboratorial. Vários aspectos da levedura e do paciente devem ser considerados e mais profundamente estudados para um melhor entendimento desta relação parasita-hospedeiro.

Ao nosso ver esta pesquisa é uma contribuição para este implicado problema que é a ICS por leveduras, abrindo assim perspectivas para futuros estudos.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo *C. albicans* foi a espécie de levedura mais isolada de casos de fungemia e cateter, mas, no geral, as espécies não-*albicans* representam a maioria dos isolados.

Entre as espécies não-*albicans* *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* foram as espécies mais prevalentes.

C. dubliniensis não foi isolada nessa pesquisa, e é considerada uma espécie rara em ICS.

A técnica de seqüenciamento mostrou-se eficaz na identificação de amostras de leveduras em nível de espécie, quando com o método tradicional não pudemos identificar completamente.

C. parapsilosis sensu stricto foi a espécie mais isolada dentro do complexo *Candida parapsilosis* representando 88,46% dos isolados, enquanto que *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* foram isoladas em apenas 7,69% e 3,85%, respectivamente.

A maioria das amostras do complexo *Candida parapsilosis* não são produtoras de biofilme. De 23 *C. parapsilosis sensu stricto*, apenas oito produziram biofilme, uma *C. orthopsilosis* produziu biofilme e *C. metapsilosis* não produziu biofilme.

No presente estudo, as espécies não-*albicans* apresentaram índices de proteinase e hialuronidase mais elevadas do que *C. albicans*.

C. albicans apresentou índices mais elevados das exoenzimas fosfolipase e hemolisina do que as espécies não-*albicans*.

Pelo método “Etest[®]”, pudemos verificar que todas as amostras foram sensíveis a anfotericina B, notamos também que o uso do antifúngico fluconazol deve ser baseado em nível de espécie, devido ao aumento do número de cepas resistentes. Caspofungina é ativa contra a maioria das espécies, no entanto, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* parecem ser menos sensíveis que a maioria das espécies. Os agentes antifúngicos parecem ser mais ativos contra *C. albicans* do que contra espécies não-*albicans*.

REFERÊNCIAS

- ABELSON, J. A.; MOORE, T.; BRUCKNER, D.; DEVILLE, J.; NIELSEN, K. Frequency of Fungemia in Hospitalized Pediatric Inpatients Over 11 Years at a Tertiary Care Institution. **Pediatrics**, v. 116, n. 1, p. 60-68, 2005.
- ALMEIDA, R. S.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* iron acquisition within the host. **FEMS Yeast Research**, v.9, p. 1000-1012, 2009.
- ALMIRANTE, B.; RODRIGUES, D.; CUENCA-ESTRELLA, M.; ALMELA, M.; SANCHEZ, F.; AYATS, J.; ALONSO-TARRES, C.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; PAHISSA, A. Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance. Study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1681-1685, 2006.
- ALP, S.; SANCAK, B.; HASCELİK, G.; ARIKAN, S. Influence of different susceptibility testing methods and media on determination of the relevant fluconazole minimum inhibitory concentrations for heavy trailing *Candida* isolates with low-high phenotype. **Mycoses**, v. 53, n. 6, p. 475-480, 2010.
- ALVES, S. H.; MILAN, E. P.; , SANT'ANA, P. L.; OLIVEIRA, L. O.; SANTURIO, J. M.; COLOMBO, A. L. Hypertonic sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 43, p. 85-86, 2002.
- ALVES, S. H.; SILVA, G. M.; SCOPEL, P. A.; OLIVEIRA, L. T. O.; COSTA, J. M.; MILÁN, E. P.; COLOMBO, A. L. Isolamento de *Candida dubliniensis* da mucosa oral de um paciente com SIDA, no Rio Grande do Sul. **Revista AMRIGS**. v. 44, n. 3,4, p. 185-187, 2000.
- ANTACHOPOULOS, C.; WALSH, T. J. New agents for invasive mycoses in children. **Invasive mycoses**, v. 17, p.78-87, 2005.
- ARAGÃO, P. A.; OSHIRO, I. C. V.; MANRIQUE, E. I.; GOMES, C. C.; MATSUO, L. L.; LEONE, C.; MORETTI-BRANCHINI, M. L.; LEVIN, A. S.; *Pichia anomala* outbreak in a nursery: exogenous source? **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 20, n. 9, p. 843-848, 2001.
- ARNOLD, H. M.; MICEK, S. T.; SHORR, A. F.; ZILBERBERG, M. D.; LABELLE, A. J.; KOTHARI, S.; KOLLEF, M. H. Hospital Resource Utilization and Costs of Inappropriate Treatment of Candidemia. **Pharmacotherapy**, v. 30, n. 4, p. 361-368, 2010.
- ARREDONDO-GARCIA, J. L.; CUEVAS-AMÁBILE, C. F. Susceptibility of Mexican isolates of yeasts and moulds to amphotericin B and triazole antifungals. **The Journal of Infectious Diseases in Developing Countries**; v. 5, p. 398-401, 2009.
- ASADZADEH, M.; AHMAD, S.; AL-SWEIH, N.; KHAN, Z. U. Rapid molecular differentiation and genotypic heterogeneity among *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* strains isolated from clinical specimens in Kuwait. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 745-752, 2009.

ASBECK, E. C. V.; HUANG, Y. C.; MARKHAM, A. N.; CLEMONS, N. V.; STEVENS, D. A. *Candida parapsilosis* fungemia in neonates: genotyping results suggest healthcare workers hands as source, and review of published studies. **Mycopathologia**, v. 164, p. 287–293, 2007.

AXNER-ELINGS, M.; BOTERO-KLEIVEN, S.; JENSEN, R. H.; ARENDRUP, M. C. Echinocandin Susceptibility Testing of *Candida* Isolates Collected during a 1-Year Period in Sweden. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 7, p. 2516–2521, 2011.

AWASTHI A. K.; JAIN, A.; AWASTHI, S.; AMBAST, A.; SINGH, K.; MISHRA, V. Epidemiology and Microbiology of Nosocomial Pediatric Candidemia at a Northern Indian Tertiary Care Hospital. **Mycopathologia**, v. 172, n. 4, p. 269-277, 2011.

BAKIR, M.; ÇERIKCIOGLU, N.; TIRTIR, A.; BERRAK, S.; OZEK, E.; CANPOLAT, C. *Pichia anomala* fungaemia in immunocompromised children. **Mycoses**, v. 47, p. 231–235, 2004.

BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 12: medical yeasts part 1, *Candida albicans*. **Review. Yeast**, v. 25, p. 385–417, 2008.

BATISTA, G. C. M. **Perfil fenotípico e genotípico de leveduras isoladas da cavidade oral, sangue e cateter de neonatos internados em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal de hospital terciário de São Paulo, SP**. 2009. 109 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

BLYTH, C. C.; CHEN, S. C. A.; SLAVIN, M. A.; SERENA, C.; NGUYEN, Q.; MARRIOTT, D.; ELLIS, D.; MEYER, W.; SORRELL, T. C. Not Just Little Adults: Candidemia Epidemiology, Molecular Characterization, and Antifungal Susceptibility in Neonatal and Pediatric Patients. **Pediatrics**, v.123, n 5, 1359-1369, 2009.

BLYTH, C. C.; PALASANTHIRAN, P.; O'BRIEN, T. A. Antifungal Therapy in Children With Invasive Fungal Infections: A Systematic Review. **Pediatrics**, v. 119, n. 4, p. 772-784, 2007.

BOSCO, V. L.; BIRMAN, E. G.; CURY, A. E.; PAULA, C. R. Yeasts from the oral cavity of children with AIDS: exoenzyme production and antifungal resistance. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 17, n. 3, p. 217-222, 2003.

BORGHI, E.; SCIOTA, R.; IATTA, R.; BIASSONI, C.; MONTAGNA, M. T.; MORACE, G. Characterization of *Candida parapsilosis* complex strains isolated from invasive fungal infections. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, DOI 10.1007/s10096-011-1242-x, 2011.

BRANCHINI, M. L.; PFALLER, M. A.; RHINE-CHALBERG, J.; FREMPONG, T.; ISENBERG, H. D. Genotypic Variation and Slime Production among Blood and Catheter Isolates of *Candida parapsilosis*. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 452-456, 1994.

BRANDT, M. E.; HARRISON, L.H.; PASS, M.; SOFAIR, A. N.; HUIE, S.; LI, R. MORRISON, C. J.; WARNOCK, D. W.; HAJJEH R. A. *Candida dubliniensis* Fungemia: the First Four Cases in North America. **Emerging Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, p. 46-49, 2000.

BRITO, C. S.; GONDIM, B. A.; FILHO, A. D.; PAULO, P.; FILHO, P. P. G. Etiology and Pathogenesis of Bloodstream Infections Associated with the Use of Long-Term Central Vascular Catheter (CVC) in Patients Who Undergone Gastrointestinal Surgery. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 96-99, 2007.

CARAMALAC, D. A.; RUIZ, L. S.; BATISTA, G. C. M.; BIRMAN, E. G.; DUARTE, M.; HAHAN, R.; PAULA, C. R. *Candida* Isolated From Vaginal Mucosa of Mothers and Oral Mucosa of Neonates. Occurrence and Biotypes Concordance. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 26, n. 7, p. 553-557, 2007.

CAUDA, R. Candidaemia in Patients with an Inserted Medical Device. **Drugs**, v. 69, n. 1, p. 33-38, 2009.

CHAKRABARTI, A.; K. SINGH, K.; NARANG, A.; SINGHI, S.; BATRA, R.; RAO, K. L. N.; RAY, P.; GOPALAN, S.; DAS, S.; GUPTA, V.; GUPTA, A. K.; BOSE, S. M.; MCNEIL, M. M. Outbreak of *Pichia anomala* Infection in the Pediatric Service of a Tertiary-Care Center in Northern India. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1702-1706, 2001.

CHEN, S.C.; SLAVIN, M.A.; SORRELL, T.C. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison. **Drugs**, v. 71, n. 1, p. 11-41, 2011.

CHOI, H. K.; JEONG, S. J.; LEE, H. S.; CHIN, B. S.; CHOI, S. H.; HAN, S. H.; KIM, M. S.; KIM, C. O.; CHOI, J. Y.; SONG, Y. G.; KIM, J. M. Blood Stream Infections by *Candida glabrata* and *Candida krusei*: A Single-Center Experience. **The Korean Journal of Internal Medicine**, v. 24, n. 3, p. 263-269, 2009.

CLAUDINO, A. L.; PEIXOTO, R. F.; MELHEM, M. S.; SZESZS, M. W.; LYON, J. P.; CHAVASCO, J. K.; FRANCO, M. C. Correlation between CLSI, EUCAST and Etest methodologies for amphotericin B and fluconazol antifungal susceptibility testing of *Candida spp.* clinical isolates. **Die Pharmazie**, v. 63, n. 4, p. 286-289, 2008.

CLANCY, C. J.; NGUYEN, H. Correlation between In Vitro Susceptibility Determined by E Test and Response to Therapy with Amphotericin B: Results from a Multicenter Prospective Study of Candidemia. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 43, n. 5, p. 1289-1290 1999.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; SALOMÃO, R.; BRANCHINI, M. L.; RICHTMANN, R.; DEROSI, A.; WEY, S.B. High rate of non-albicans candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 34, n. 4, p. 281-286, 1999.

CONDE-ROSA, A.; AMADOR, R.; PEREZ-TORRES, D.; COLÓN, E.; SÁNCHEZ-RIVERA, C.; NIEVES-PLAZA, M.; GONZÁLEZ-RAMOS, M.; BERTRÁN-PASARELL, J. Candidemia Distribution, Associated Risk Factors, and Attributed Mortality at a University-Based Medical Center. **ProHealth Sciences**, v. 29, n. 01, p. 26-29, 2010.

COSTA, C. R.; PASSOS, X. S.; SOUZA, L. K. H.; LUCENA, P. A.; FERNANDES, O. F. L.; SILVA, M. R. R. Differences In Exoenzyme Production And Adherence Ability Of *Candida Spp.* Isolates From Catheter, Blood And Oral Cavity. *Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo*, v. 52, n. 3, p. 139-143, 2010.

COSTA, K. R. C. C.; FERREIRA, J. C.; KOMESU, M. C.; CANDIDO, R. C. *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in Oral Candidosis: Quantitative Analysis, Exoenzyme Activity, and Antifungal Drug Sensitivity. *Mycopathologia*, v. 167, p. 73–79, 2009.

CRUZ, C. R.; PIONTELLI, L. E. Invasive fungal disease in patients from five hospitals in the Valparaíso region, Chile: 2004 to 2009. *Revista Chilena de Infectología*, v. 28, n. 2, p. 123-129, 2011.

DANNAOUI, E.; PAUGAM, A.; DEVELOUX, M.; CHOCHILLON, C.; MATHERON, J.; DATRY, A.; BOUGES-MICHEL, C.; BONNAL, C.; DROMER, F.; BRETAGNE, S. Comparison of antifungal MICs for yeasts obtained using the EUCAST method in a reference laboratory and the Etest in nine different hospital laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 16, n. 7, p. 863–869, 2010.

DE TORO, M.; TORRES, M. J.; RUIZ, M.; AZNAR, J. Distribution, biofilm production and antifungal susceptibility profile of Clinical isolates of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in a South Spain Tertiary Care Hospital. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 17, p. 418-424, 2010.

DIAS, A. L. T.; MATSUMOTO, F. E.; MELHEM, M. S. X.; SILVA, E. G.; AULER, M. E.; SIQUEIRA, A. M.; PAULA, C. R. Comparative analysis of Etest and broth microdilution method (AFST – EUCAST) for trends in antifungal drug susceptibility testing of brazilian *Cryptococcus neoformans* isolates. *Journal Of Medical Microbiology*, v. 55, p. 1693-1699. 2006.

DOUGLAS, L. J. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology*, v. 11, n. 1, p. 30-36, 2003.

ELLEPOLA, A.N.; HURST, S.F.; ELIE, C.M.; MORRISON, C.J. Rapid and unequivocal differentiation of *Candida dubliniensis* from other *Candida* species using species-specific DNA probes: comparison with phenotypic identification methods. *Oral Microbiology and Immunology*, v. 18, n. 6, p. 379-388, 2003.

FERREIRA, L. S. **Caracterização De Isolados De *Curvularia Spp.* Endofíticos De Milho (*Zea Mays L.*) Por Parâmetros Morfológicos E Moleculares.** 2010. 119 f. Tese (Doutorado em Genética. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

FIDEL, P. L.; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D. *Candida glabrata*: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, n. 1, p. 80-96, 1999.

FIGUERAS, C.; HEREDIA, C. D.; GARCÍA, J. J.; NAVARRO, M.; RUIZ-CONTRERAS, J.; ROSSICH, R.; RUMBAO, J.; FRICK, M. A.; ROSELLÓ, E. M.; En representación del grupo de estudio de la Infección Fúngica Invasiva de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica (SEIP). Recomendaciones de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica sobre

diagnóstico y tratamiento de la candidiasis invasiva. **Asociacion Española de Pediatría**, v. 74, n. 5. p. 337.e1—337.e17, 2011.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, 2006.

FLORESCU, D. F.; ISLAM, K. M.; GRANT, W.; MERCER, D. F.; BOTHA, J.; NIELSEN, B.; KALIL, A. C. Incidence and outcome of fungal infections in pediatric small bowel transplant recipients. **Transplant Infectious Diseases**, v. 12. n. 6, 2010.

FRANÇA, E. J. G.; FÁVERO, D.; SCREMIN, H.; OLIVEIRA, M. T.; FURLANETO-MAIA, L.; QUESADA, R. M. B.; FURLANETO, M. C. Hemólise produzida por *Candida tropicalis* isoladas de amostras clínicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 3, p. 318-321, 2010.

FRANÇA, E. J. G.; L. FURLANETO-MAIA, L.; QUESADA, R. M. B.; FAVERO, D.; OLIVEIRA, M. T.; FURLANETO, M. C. Haemolytic and proteinase activities in clinical isolates of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* with reference to the isolation anatomic site. **Mycoses**, v. 24, n. 4, p. 44-51, 2009.

FRIDKIN, S.K.; KAUFMAN, D.; EDWARDS, J.R.; SHETTY, S.; HORAN, T.; The National Nosocomial Infections Surveillance System Hospitals. Changing Incidence of *Candida* Bloodstream Infections Among NICU Patients in the United States, 1995-2004. **Pediatrics**, v. 117, n. 5, p. 1680-1687, 2006.

GARCIA-EFFRON, G.; KATIYAR, S. K.; PARK, S.; EDLIND, T. D.; PERLIN, D. S. A Naturally-Occurring Fks1p Proline to Alanine Amino Acid Change in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* Accounts for Reduced Echinocandin Susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 7, p. 2305-2312, 2008.

GAREY, K. W.; REGE, M.; PAI, M. P.; MINGO, D. E.; SUDA, K. J.; TURPIN, R. S.; DAVID T. BEARDEN, D. T. Time to Initiation of Fluconazole Therapy Impacts Mortality in Patients with Candidemia: A Multi-Institutional Study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 1, p. 25-31, 2006.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B.; Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 501–517, 1999.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. M. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.46, n.3, p. 225-234, 2010

GOKCE, G.; CERIKCIOGLU, N.; YAGCI, A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. **Mycopathologia**, v. 164, p. 265–269, 2007.

GUDLAUGSSON, O.; GILLESPIE, S.; LEE, K.; VANDE, B.J.; HU, J.; MESSER, S.; HERWALDT, L.; PFALLER, M.; DIEKEMA, D. Attributable Mortality of Nosocomial Candidemia. **Revisited Clinical Infectious Diseases**, v. 37, n. 1, p. 1172–1177, 2003.

GUINEA, J.; RECIO, S.; ESCRIBANO, P.; TORRES-NARBONA, M.; PELÁEZ, T.; SÁNCHEZ-CARRILLO, C.; RODRÍGUEZ-CRÉIXEMS, M.; BOUZA, E. Rapid Antifungal Susceptibility Determination for Yeast Isolates by Use of Etest Performed Directly on Blood Samples from Patients with Fungemia. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 2205–2212, 2010.

HAWSER, S. P.; DOUGLAS, L. J. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 915–921, 1994.

HAYS, C.; DUHAMEL, C.; CATTOIR, V.; BONHOMME, J. Rapid and accurate identification of species belonging to the *Candida parapsilosis* complex by real-time PCR and melting curve analysis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 477–480, 2010.

HINRICHSEN, S. L.; FALCÃO, E.; VILELLA, T. A. S.; RÊGO, L.; LIRA, C.; ALMEIDA, L.; MARTINS, M.; ARAÚJO, C.; DUARTE, M.; LOPES, G. *Candida* isolates in tertiary hospitals in northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 325–328, 2009.

HORASAN, E. S.; ERSÖRSÖZ, G.; GÖKSU, M.; OTAG, F.; KURT, A. O.; KARAÇORLU, S.; KAYA, A. Increase in *Candida parapsilosis* fungemia in Critical Care Units: A 6-years study. **Mycopathologia**, v. 170, n. 4, p. 263–268, 2010.

KHOURI, S. **Detecção e caracterização de hialuronidase em espécies de *Candida* por eletroforese em gel de poli(acrilamida) e espectrofotometria**. 1998. 115 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

KHOURI, S. **Leveduras isoladas de pacientes internados em hospital universitário da cidade de Taubaté – SP**. 2010. 69 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

KIM, M. N.; SHIN, J. H.; SUNG, H.; LEE, K.; KIM, E. C.; RYOO, N.; LEE, J. S.; JUNG, S. I.; PARK, K. H.; KEE, S. J.; KIM, S. H.; SHIN, M. G.; SUH, S. P.; RYANG, D. W. *Candida haemulonii* and Closely Related Species at 5 University Hospitals in Korea: Identification, Antifungal Susceptibility, and Clinical Features. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, p. 57–61, 2009.

KIM, S.; KO, K. S.; MOON, S. Y.; LEE, M. S.; LEE, M. Y.; SON, J. S. Catheter-related Candidemia Caused by *Candida haemulonii* in a Patient in Long-term Hospital Care. **The Korean Academy of Medical Sciences**, v. 26, p. 297–300, 2011.

KIRAZ, N.; OZ, Y. Species distribution and in vitro antifungal susceptibility of clinical *Candida* isolates from a university hospital in Turkey over a 5-year period. **Medical Mycology**, v. 49, n. 2, p. 126–131, 2011.

KUHN, D. M.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. Comparison of Biofilms Formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on Bioprosthetic Surfaces. **Infection And Immunity**, v. 70, n. 2, p. 878–888, 2002.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The yeasts, a taxonomic study**. 5th. Burlington, MA, EUA. Elsevier Science, 2011. 2354 p.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 5, p. 1216-1223, 1997.

KWONG-CHUNG, K. J.; BENNET, J E. **Candidiasis**. In: Medical mycology. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992, p. 280-336.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELLO, N. T. **Tratado de micologia médica**. São Paulo: Sarvier, 2002. p. 1120.

LATTIF, A. A.; MUKHERJEE, P.; CHANDRA, J.; SWINDELL, K.; LOCKHART, S. R.; DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M.; GHANNOUM, M. Characterization of biofilms formed by *Candida parapsilosis*, *C. metapsilosis*, and *C. orthopsilosis*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, p. 265-270, 2010.

LEAW, S. N.; CHANG, H. C.; SUN, H. F.; BARTON, R.; BOUCHARA, J. F.; CHANG, T. C. Identification of Medically Important Yeast Species by Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer Regions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 693–699, 2006.

LEE, S. C.; FUNG, C. F.; LEE, N.; SEE, L. C.; HUANG, J. S.; TSAI, C. J.; CHEN, K. S.; SHIEH, W. B. Fluconazole Disk Diffusion Test with Methylene Blue- and Glucose- Enriched Mueller-Hinton Agar for Determining Susceptibility of *Candida* Species. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 4, 2001.

LEVY, I.; RUBIN, L.G.; VASISHTHA, S.; TUCCI, V.; SOOD, S.K. Emergence of *Candida parapsilosis* as the Predominant Species Causing Candidemia in Children. **Clinical Infectious Diseases**, v. 26, n. 5, p.1086-1088, 1998.

LINTON, C. J.; BORMAN, A. M.; CHEUNG, G.; HOLMES, A. D.; SZEKELY, A.; PALMER, M. D.; BRIDGE, P. D.; CAMPBELL, C. K.; JOHNSON, E. M. Molecular Identification of Unusual Pathogenic Yeast Isolates by Large Ribosomal Subunit Gene Sequencing: 2 Years of Experience at the United Kingdom Mycology Reference Laboratory. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 4 p. 1152–1158, 2007.

LOCKHART, S. R.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Geographic Distribution and Antifungal Susceptibility of the Newly Described Species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in Comparison to the Closely Related Species *Candida parapsilosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 8, p. 2659–2664, 2008.

LORTHOLARY, O.; DESNOS-OLLIVIER, M.; SITBON, K.; FONTANET, A.; BRETAGNE, S.; DROMER, F.; AND THE FRENCH MYCOSIS STUDY GROUP. Recent Exposure to Caspofungin or Fluconazole Influences the Epidemiology of Candidemia: a Prospective Multicenter Study Involving 2,441 Patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 532–538, 2011.

LUIZ, F. C. J. P. F. **Identificação fenotípica e genotípica de fungos filamentosos isolados de talcos comerciais cosméticos**. 2010. 93 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

LUO, G.; SAMARANAYAKE, L. P.; YAU, J. Y. *Candida* species exhibit differential *in vitro* hemolytic activities. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 8, p. 2971-2974, 2001.

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

MACEDO, D. P. C.; FARIAS, A. M. A.; NETO, R. G. L.; SILVA, V. K. A.; LEAL, A. F. G.; NEVES, R. P. N. Infecções oportunistas por leveduras e perfil enzimático dos agentes etiológicos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 42, n. 2, p. 188-191, 2009.

MAGANTI, H.; YAMAMURA, D.; XU, J. Prevalent nosocomial clusters among causative agents for candidemia in Hamilton, Canada. **Medical Mycology**, v. 49, n. 5, p. 530-538, 2011.

MALUCHE, M. E.; SANTOS, J. I. *Candida* spp. e infecções hospitalares: aspectos epidemiológicos e laboratoriais. **RBAC**, v. 40, n.1, p. 65-67, 2008.

MARIANO, P. L. S.; MILAN, E. P.; MATTA, D. A.; COLOMBO, A. L. *Candida dubliniensis* identification in Brazilian yeast stock collection. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 533-538, 2003.

MARTINEZ, M.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; KIRKPATRICK, W. R.; COCO, B. J.; BACHMANN, S. P.; PATTERSON, T. F. Replacement of *Candida albicans* with *C. dubliniensis* in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients with Oropharyngeal Candidiasis Treated with Fluconazole. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 9, p. 3135-3139, 2002.

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. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 12, p.63-69, 2007.

MEIS, J. F. G.; RUHNKE, M.; PAUW, B. E.; ODDS, F. C.; SIEGERT, W.; VERWEIJ, P. E. *Candida dubliniensis* Candidemia in Patients with Chemotherapy-Induced Neutropenia and Bone Marrow Transplantation. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5. n. 1, p. 150-153, 1999.

MELO, A. S.; BIZERRA, F. C.; FREYMÜLLER, E.; ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; COLOMBO, A. L. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. **Medical Mycology**, v. 49, p. 253-262, 2011.

MENEZES, E A.; GUERRA, A. C. P.; RODRIGUES, R. C. B.; PEIXOTO, M. M. L. V.; LIMA, L. S.; CUNHA, F. A. Isolamento de *Candida* spp. no mamilo de lactantes de Banco de

Leite Humano da Universidade Federal do Ceará e teste de susceptibilidade a antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n.5, p. 299-305, 2004.

METIN, D. Y.; HILMIOGLU-POLAT, S.; SAMLIOGLU, P.; DOGANAY-OFLAZOGLU, B.; INCI, R.; TUMBAY, E. Evaluation of Antifungal Susceptibility Testing with Microdilution and Etest Methods of *Candida* Blood Isolates. **Mycopathologia**, v. 172, p. 87-199, 2011.

MIKULSKA, M.; BASSETTI, M.; RATTO, S.; VISCOLI, C. Invasive Candidiasis in Non-Hematological patients. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 3, n. 1, 2011.

MÍMICA, L. M. J.; UEDA, S. M. Y.; MARTINO, M. D. V.3; NAVARINI, A.; MARTINI, I. J. Diagnóstico de infecção por *Candida*: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 1, p. 17-23, 2009.

MIRHENDI, H.; MAKIMURA, K.; ZOMORODIAN, K.; MAEDA, N.; OHSHIMA, T.; YAMAGUCHI, H. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* using a single-enzyme PCR-RFLP method. **Journal Infectious Diseases**, v. 58, p. 235-237, 2005.

MORACE, G.; BORGHI, E.; IATTA, R.; AMATO, G.; ANDREONI, S.; BRIGANTE, G.; FARINA, C.; LO CASCIO, G.; LOMBARDI, G.; MANSO, E.; MUSSAP, M.; PECILE, P.; RIGOLI, R.; TANGORRA, E.; VALMARIN, M.; MONTAGNA, M. T. Antifungal susceptibility of invasive yeast isolates in Italy: the GISIA3 study in critically ill patients. **BMC Infectious Diseases**, v. 11, n. 130, p. 1-9, 2011.

MORRELL, M.; FRASER, V. J.; KOLLEF, M. H. Delaying the Empiric Treatment of *Candida* Bloodstream Infection until Positive Blood Culture Results Are Obtained: a Potential Risk Factor for Hospital Mortality. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 9, 3640-3645, 2005.

MOTTA, A. L.; ALMEIDA, G. D.; ALMEIDA, J. N.; PINTO, M. I.; BURATTINI, M. N.; ROSSI, F. Analysis of candidemia epidemiological data and antifungigram by distinct methodologies in a large Brazilian teaching hospital. **Journal of Infectious Diseases**, v.14, n. 5, p.441-448, 2010.

MOUDGAL, V.; LITTLE, T.; BOIKOV, D.; VAZQUEZ, J. A. Multiechinocandin- and Multiazole-Resistant *Candida parapsilosis* Isolates Serially Obtained during Therapy for Prosthetic Valve Endocarditis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 767-769, 2005.

MOUSA, H. A. L.; AL-BADER, S. M. Yeast infection of burns. **Mycoses**, v. 44, n. 5, p. 147-149, 2001.

MUÑOZ, P.; GIANNELLA, M.; FANCIULLI, C.; GUINEA, J.; VALERIO, M.; ROJAS, L.; RODRÍGUEZ-CRÉIXEMS, M.; BOUZA, E. *Candida tropicalis* fungemia: Incidence, risk factors, and mortality in a General Hospital. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 10, p. 1538-1545, 2010.

NEGRI, M. F.; FARIA, M. G.; GUILHERMETTI, E.; ALVES, A. A.; PAULA, C. R.; SVIDZINSKI, T. I. E. Hemolytic activity and production of germ tubes related to pathogenic potential of clinical isolates of *Candida albicans*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 1, p.89-93, 2010.

NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; SVIDZINSKI, T. I. E.; OLIVEIRA, R.; PAULA, C. R. Correlation between Etest, disk diffusion, and microdilution methods for antifungal susceptibility testing of species from infection and colonization. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 23, p. 324-330, 2009.

NEGRI, M.; MARTINS, M.; HENRIQUES, M.; SVIDZINSKI, T. I. E.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. Examination of Potential Virulence Factors of *Candida tropicalis* Clinical Isolates From Hospitalized Patients. **Mycopathologia**, v. 169, n. 3, p. 175-182, 2009.

NGUYEN, M. H.; PEACOCK, J. E.; MORRIS, A. J.; TANNER, D. C.; NGUYEN, M. L.; SNYDMAN, D. R.; WAGENER, M. M.; RINALDI, M. G.; YU, V.L. The changing face of candidemia: Emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. **American Journal of Medicine**, v. 100, n. 6, p. 617-623, 1996.

NUCCI, M; MARR, K. A. Emerging Fungal Diseases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p. 521-526, 2005.

ODDS, F. C. ***Candida and Candidosis***. 2^a ed. London: Bailliere Trindall, 1988. p. 1247.

OROZCO, A. S.; HIGGINBOTHAM, L. M.; HITCHCOCK, C. A. ; PARKINSON, T.; FALCONER, D.; IBRAHIM, A. S.; GHANNOUM, M. A.; FILLER, S. G. Mechanism of Fluconazole Resistance in *Candida krusei*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 42, n. 10, p. 2645-2649 ,1998.

PAPPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D.; BENJAMIN, D. K.; CALANDRA, T. F.; EDWARDS, J. E.; FILLER, S. G.; FISHER, J. F.; KULLBERG, B. J.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI, A. C.; REX, J. H.; WALSH, T. J.; SOBEL, J. D. Clinical Practice Guidelines for the Management of Candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases** , v. 48, p. 503-35, 2009.

PAPPAS, P. G. Invasive Candidiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 20, n. 3, p. 485-506, 2006.

PASQUALOTTO, A. C.; SUKIENNIK, T.C.; SEVERO, L. C.; DE AMORIM, C. S.; COLOMBO, A. L. An outbreak of *Pichia anomala* fungemia in a Brazilian pediatric intensive care unit. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 26, n. 6, p. 553-558, 2005.

PAULA, C. R.; KREBS, V. L. J.; AULER, M. E.; RUIZ, L. S.; MATSUMOTO, F. E.; SILVA, E. H.; DINIZ, E. M. A.; VAZ, F. A. C. Nosocomial infection in newborns by *Pichia*

anomala in a Brazilian intensive care unit. **Medical Mycology (Oxford)**, v. 44, n. 5, p. 479-484, 2006.

PAULA, C. R.; MONTELLI, A. C.; RUIZ, L. S.; BATISTA, G. C. M.; MATSUMOTO, F. E.; VOLPERARNONI, M.; VIANI, P. R. C.; KHOURI, S.; GONTIJO, V.; KREBS, V. L. Infecção hospitalar fúngica: experiência em Hospitais Públicos de São Paulo. **Prática Hospitalar**, n. 52, p. 63-66, 2007.

PFALLER, M. A. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, n. 2, p. 89-94, 1996.

PFALLER, M. A.; BOYKEN, R. J.; HOLLIS, J.; KROEGER, J.; MESSER, S. A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D.J. In Vitro Susceptibility of Invasive Isolates of *Candida* spp. to Anidulafungin, Caspofungin, and Micafungin: Six Years of Global Surveillance. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 150–156, 2008.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133–163, 2007.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; JONES, R.N.; MESSER, S.A.; HOLLIS, R.J. Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. Isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997 to 2000. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 852-856, 2002.

PINJON, E.; SULLIVAN, D.; SALKIN, I.; SHANLEY, D.; COLEMAN, D. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 7, p. 2093-2095, 1998.

PRICE, M.F.; WILKINSON, I.D.; GENTRY, L.O. Plate methods for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 20, n. 1, p. 7-14, 1982.

QUINDÓS, G.; ALONSO-VARGAS, R.; GARAIZAR, J.; PONTÓN J. Utility of random amplified polymorphic DNA in the discrimination between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 17, n. 1, p. 10-13, 2000.

RIBEIRO, A. S.; SILVA, D. A.; SILVA, F. P.; SANTOS, G. C.; CAMPOS, L. M. S.; OLIVEIRA, L. V. N.; SANTOS, D. A. Epidemiology and phospholipase activity of oral *Candida* spp. Among patients with central nervous system diseases before and after dental cleaning procedure. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 19-23, 2010.

RIPPON, J.W. Candidiasis. In: **Medical mycology: The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes**. 3^a ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company. 1988. p. 536-581.

RÖRIG, K. C. O.; COLACITE, J.; ABEGG, M. A. Production of virulence factors *in vitro* by pathogenic species of the genus *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 225-227, 2009.

RUCHEL, R.; TEGELER, R.; TROST, T. M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 20, n. 3, p. 233-244, 1982.

RŮZICKA, F.; HOLÁ, V.; VOTAVA, M.; TEJKALOVÁ, R. Importance of biofilm in *Candida parapsilosis* and evaluation of its susceptibility to antifungal agents by colorimetric method. **Folia Microbiologica**, v. 52, n.3, p. 209-214, 2007.

SAFDAR, A.; CHATURVEDI, V.; KOLL, B. S.; LARONE, D. H.; PERLIN, D. S.; ARMSTRONG, D. Prospective, Multicenter Surveillance Study of *Candida glabrata*: Fluconazole and Itraconazole Susceptibility Profiles in Bloodstream, Invasive, and Colonizing Strains and Differences between Isolates from Three Urban Teaching Hospitals in New York City (*Candida* Susceptibility Trends Study, 1998 to 1999). **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 46, n. 10, p. 3268-3272, 2002.

SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. Review Article. **Journal Medical Microbiology**, v. 41, p. 295-310, 1994.

SAMPAIO-CAMARGO, T. Z.; MARRA, A. L.; SILVA, C. V.; CARDOSO, M. F. S.; MARTINO, M. D. V.; CAMARGO, L. F. A.; CORREA, L. Secular trends of candidemia in a tertiary care hospital. **American Journal Of Infection Control**, v. 38, n. 7, p. 546-551, 2010.

SARVIKIVI, E.; LYYTIKAINEN, O.; SOLL, D. R.; PUJOL, C.; PFALLER, M. A.; RICHARDSON, M.; KOUKILA-KAHKOLA, P.; LUUKKAINEN, P.; SAXEN, H. Emergence of Fluconazole Resistance in a *Candida parapsilosis* Strain That Caused Infections in a Neonatal Intensive Care Unit. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 2729–2735, 2005.

SAVINI, V.; CATAVITELLO, C.; DI MARZIO, I.; MASCIARELLI, G.; ASTOLFI, D.; BALBINOT, A.; BIANCO, A.; POMPILIO, A.; DI BONAVENTURA, G.; D'AMARIO, C. Pan-azole-Resistant *Candida guilliermondii* from a Leukemia Patient's Silent Funguria. **Mycopathologia**, v. 169, n. 6, p. 457-459, 2010.

SHIMIZU, M. T.; JORGE, A. O. C.; UNTERKIRCHER, C. S.; FANTINATO, V.; PAULA, C. R. Hyaluronidase and chondroitin sulphatase production by different species of *Candida*. **Journal of Medical & Veterinary Mycology**, v. 33, p. 27-31, 1995.

SILVA, A. P.; MIRANDA, I. M.; LISBOA, C.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A. G. Prevalence, Distribution, and Antifungal Susceptibility Profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a Tertiary Care Hospital. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 8, p. 2392–2397, 2009.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **Federation of European Microbiological Societies**, DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x, p. 1-18, 2011. Review article.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.; AZEREDO, J. Silicone colonization by non-*Candida albicans* *Candida* species in the presence of urine. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, p.747–754, 2010.

SILVA, E. H.; RUIZ, L. S.; MATSUMOTO, F. E.; AULER, M. E.; GIUDICE, M. C.; Débora MOREIRA, D.; SZESZS, W.; PAULA, C. R. Candiduria In A Public Hospital Of São Paulo (1999-2004): Characteristics Of The Yeast Isolates. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 6, p. 349-353, 2007.

SIMS, C. R.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REX, J. H. Invasive Candidiasis in Immunocompromised Hospitalized Patients. Review Article. **Archives of Medical Research**, v. 36, p. 660–671, 2005.

SMITH, J. A.; HENRY, D.; NGUI-YEN, J.; CASTELL, A.; CODERRE, S. Comparison of Agar Dilution, Microdilution, and Disk Elution Methods for Measuring the Synergy of Cefotaxime and Its Metabolite against Anaerobes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 23, n. 6, p. 1104-1108, 1986.

SONG, J. W.; SHIN, J. H.; SHIN, D. H.; JUNG, S. I.; CHO, D.; KEE, S. J.; SHIN, M. G.; SUH, S. P.; RYANG, D. W. Differences in biofilm production by three genotypes of *Candida parapsilosis* from clinical sources. **Medical Mycology**, v. 43, p. 657-661, 2005.

SULLIVAN, D. J.; WESTERNENG, T. J.; HAYNES, K. A.; BENNET, D. E.; COLEMAN, D. C. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. **Microbiology**, v. 141, n. 7, p. 1507-1521, 1995.

TANAKA, W. T. H.; NAKAO, N.; MIKAMI, T.; MATSUMOTO, T. Hemoglobin is utilized by *Candida albicans* in the hyphal form but not yeast form. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 232: p. 350-353, 1997.

TAVANTI, A.; DAVIDSON, A. D.; GOW, N. A. R.; MAIDEN, M. C. J. ODDS, F. C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. To Replace *Candida parapsilosis* Groups II and III. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 284-292, 2005.

TAVANTI, A., HENSGENS, L. A., GHELARDI, E., CAMPA, M. & SENESI, S. Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 1455–1462, 2007.

TAY, S. T.; ABIDIN, I. A.; HASSAN, H.; NG, K. P. Proteinase, phospholipase, biofilm forming abilities and antifungal susceptibilities of Malaysian *Candida* isolates from blood cultures. **Medical Mycology**, v. 49, n. 5, p. 556-560, 2011.

TROFA, D.; GÁCSEK, A.; NOSANCHUK, J. D. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 4, p. 606–625, 2008.

TURENNE, C. Y.; SANCHE, S. E.; HOBAN, D. J.; KARLOWSKY, J. A.; KABANI, A. M. Rapid Identification of Fungi by Using the ITS2 Genetic Region and an Automated Fluorescent Capillary Electrophoresis System. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1846–1851, 1999.

VESES, V.; GOW, N. A. R. Pseudohypha budding patterns of *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 47, n. 3, p. 268 – 275, 2009.

VIANI, P. R. C. **Fatores de virulência, perfil de resistência aos antifúngicos e biotipagem de cepas de *Candida spp.* isoladas de pacientes ambulatoriais e internados.** 2007. 68 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

VINITHA, M.; BALLAL, M. Activity of proteinase, phospholipase and biofilm as virulence markers in *Candida* species isolated from haematogenous samples. **The Hospital Infection Society**, v. 73, n. 1, p. 94-95, 2009.

VINITHA, M.; BALLAL, M. Distribution of *Candida* Species in Different Clinical Samples and Their Virulence: Biofilm Formation, Proteinase and Phospholipase Production: A Study on Hospitalized Patients in Southern India. **Journal Global Infectious Diseases**, v. 3, n. 1, p. 4-8, 2011.

VINITHA, M.; BALLAL, M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, p. 208-210, 2008.

VIUDES, A.; PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; ÚBEDA, P.; LÓPEZ-RIBOT, J. L.; GOBERNADO, M. Candidemia at a Tertiary-Care Hospital: Epidemiology, Treatment, Clinical Outcome and Risk Factors for Death. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 21, p. 767-774, 2002.

WAGGONER-FOUNTAIN, L. A.; WALKER, M. W.; HOLLIS, R. J.; PFALLER, M. A.; FERGUSON II, J. E.; WENZEL, R. P.; DONOWITZ, L. G. Vertical and Horizontal Transmission of Unique *Candida* Species to Premature Newborns. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, p. 803-808, 1996.

WIRSCHING, S.; MORAN, G. P.; SULLIVAN, D. J.; COLEMAN, D. C.; MORSCHHAUSER, J. *MDR1*- mediated drug resistance in *Candida dubliniensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 12, p. 3416-3421, 2001.

YAMAMURA, M.; MAKIMURA, K.; FUJISAKI, R.; SATOH, K.; KAWAKAMI, S.; OTA, H. N. Y. Polymerase chain reaction assay for specific identification of *Candida guilliermondii* (*Pichia guilliermondii*). **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 15, p. 214-218, 2009.

YAPAR, N.; PULLUKCU, H.; AVKAN-OGUZ, V.; SAYIN-KUTLU, S.; ERTUGRUL, B.; SACAR, S.; CETIN, B.; KAYA, O. Evaluation of species distribution and risk factors of candidemia: A multicenter case-control study. **Medical Micology**, v. 49, n. 1, p. 26-31, 2010.

ZAITZ, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S. A.; RUIZ, L. R. B.; FRAMIL, V. M. S. **Compêndio de micologia médica.** 2^o ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p. 17-21.

ZAOUTIS, T. E.; GREVES, H. M.; LAUTENBACH, E.; BILKER, W. B.; COFFIN, S. E. Risk Factors for Disseminated Candidiasis in Children with Candidemia. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 23, n. 7, 2004.

ZAOUTIS, T. E.; PRASAD, P. A.; LOCALIO, A. R.; COFFIN, S. E.; BELL, L. M.; WALSH, T. J.; GROSS, R. Risk Factors and Predictors for Candidemia in Pediatric Intensive

Care Unit Patients: Implications for Prevention. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n.5, p. 38-45, 2010.

ZIBAFAR, E.; HASHEMI, S. J.; ZAINI F.; ZERAATI, H.; REZAIE, S.; KORDBACHEH, P. Inhibitory effect of farnesol on biofilm formation by *Candida tropicalis*. **DARU**, v. 17, n. 1, p. 19-23, 2009.

Anexo 1

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA SEÇÃO DE MICOLOGIA

DIVISÃO DE LEVEDURAS

Procedência:

Registro:

Observações:

1. Exame direto:

2. Crescimento em meios usuais:

Crescimento em meios com ácido graxo:

3. Microcultivo e tubo germinativo:

PM:	BL:	AR:	TG:
MV:	CL:	Outros:	

4. Ascospores e ascospores:

Positivos:

Negativos:

5. Outras Provas

- Síntese amido:
- Produção melanina:
- TTC:

6. Auxanograma

KNO₃:

PEP:

glicose:

inositol:

sacarose:

lactose:

dulcitol:

maltose:

rafinose:

celobiose:

melibiose :

trealose:

ramnose:

xilose:

7. Zimograma

glicose:

lactose:

maltose:

sacarose:

trealose:

rafinose:

Diagnóstico:

ANEXO 2



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
 Coordenadoria de Serviços de Saúde
 Unidade de Gestão Assistencial III
 HOSPITAL INFANTIL DARCY VARGAS
 Rua Seráfico de Assis Carvalho, n.º 34 - Morumbi
 São Paulo – SP – CEP : 05614-040 - Fone: (011) 3723 – 3700
 CNPJ 46.374.500/0118-03
 E-mail: hidv-dtads.expediente@saude.sp.gov.br



PARECER OFICIAL DA INSTITUIÇÃO

DO: COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA HIDV/SES

PARA: COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO INSTUTO DE CIÊNCIAS E BIOMÉDICA DA USP

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Darcy Vargas, analisou e autorizou a pesquisa “FENÓTIPO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE SANGUE E CATETER PROVENIENTES DE HOSPITAL PÚBLICO INFANTIL (2010-2011). COMPARAÇÃO DAS ESPÉCIES DE LEVEDURAS ISOLADAS NO PRESENTE ESTUDO COM AS ESPÉCIES ISOLADAS NOS ANOS DE 2009, 2008 E 2007” sob responsabilidade de VANESSA KUMMER PERINAZZO DE OLIVEIRA.

A referida pesquisa deverá ter acompanhamento desta CEP quanto à sua execução e finalização, segundo Resolução 196/96 e Resoluções Complementares CONEP/CNS/MS.

São Paulo, 10 de agosto de 2010.


 Dra. Leonete Ribamar Guimarães Ferreira
 Presidente – Comitê de Ética em Pesquisa
 UGA III – Hospital Infantil Darcy Vargas