UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós - Graduação em Farmácia

Área de Análises Clínicas

Leveduras em Trato Intestinal de População Pediátrica
Hospitalizada

Cláudio Talarico

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre

Orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Márcia de Souza Carvalho Melhem

São Paulo

2003

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

T137L Talarico, Cláudio
Leveduras em trato intestinal de população pediátrica
hospitalizada / Cláudio Talarico. -- São Paulo, 2003.
65p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Melhem, Márcia de Souza Carvalho

I. Micologia médica 2. Candidiase : Micologia médica
I. T. II. Melhem, Márcia de Souza Carvalho, orientador.

616.969 CDD

Cláudio Talarico

Leveduras em Trato Intestinal de População Pediátrica Hospitalizada

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^ª. Dra^a. Marcia Souza Carvalho Melhem
Orientador / Presidente

1º examinador

2º examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2003.

Trabalho realizado na Seção de Micologia do
Serviço de Parasitologia da Divisão de Biologia
Médica do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, SP.

Apoio Financeiro:

CAPES: (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

E sobretudo, armemo-nos de coragem para o
Trabalho, porque é na dor do presente que
Corrigimos as lutas de ontem, acendendo
Abençoada luz para o nosso grande porvir.

(Bezerra de Menezes)

Aos meus pais:

Sebastião e Elvira

De vocês recebi o dom mais precioso do universo: a vida. Por isso seria infinitamente grato, mas vocês não se contentaram em presentear-me apenas com ela; revestiram minha existência de amor, carinho e dedicação, cultivou na criança todos os valores que a transformara num adulto responsável e consciente. Abriram as portas do meu futuro, iluminaram meu caminho com a luz mais brilhante que puderam encontrar : o estudo. Sacrificaram seus sonhos em favor dos meus. Compartilho pois, com vocês, os méritos desta conquista, porque ela lhes pertence, ela é tão de vocês quanto minha. Procuro entre palavras, aquelas que gostaria que seus corações ouvissem do meu:

Obrigado, eu amo vocês!

Agradecimentos

À Profa. Dra Márcia de Souza Carvalho Melhem pelos ensinamentos, orientação, amizade, estímulo, dedicação na minha formação profissional e confiança em mim depositado.

À Profa.Dra. Maria Walderez Szeszs, pela co-orientação, apoio, incentivo a quem muito admiro.

À Profa.Sandra Regina Brasil Stolf Pukinskas, Chefe da Seção de Micologia do Instituto Adolfo Lutz, pela atenção, amizade e colaboração em nosso trabalho.

Aos integrantes e amigos da Seção de Micologia do Instituto Adolfo Lutz, Mônica Mencaroni Ferreira Peria, Elaine Cristina Corneta, Antonio José Strob, Dulcilena de Matos, Andrés Avelino Baez, Daniela Crema, Mariana Cadiolli Tamara, Fumiko Miyashita, Marilena dos Anjos Martins pelo apoio e pelo convívio.

À amiga e colega Angélica Maria Casimiro pela amizade, apoio, ensinamentos e grande incentivo.

Ao Prof.Carlos José Gomes de Oliveira, pela indicação dos hospitais onde foram coletadas as amostras para a realização deste trabalho, pela amizade.

Ao Dr.João Osório Martins Cardoso, pela autorização da execução deste trabalho nos hospitais os quais foram apresentados.

Aos colegas Vladimir Cid e Cristiane Cid , pela colaboração e desempenho na realização deste trabalho.

Ao amigo Paulo Sérgio Hernandez, pela digitação do Banco de Dados da Seção de Micologia do IAL, do qual foram retiradas informações valiosas para este trabalho.

A Dra Mitsue Baba Karasawa, farmacêutica responsável do laboratório CECON pela colaboração com discos de antifúngicos para a realização deste trabalho, pela amizade.

As amigas Izabel P.Oliveira e Ana Maria P Oliveira pelas valiosas colaborações na realização deste trabalho, pela amizade,apoio e convívio.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	I
Lista de quadros, tabelas e figuras	II
Resumo	IV
Abstract	VI
Introdução	1
• Leveduras: infecção e colonização	1
• Leveduras em trato intestinal	4
• Provas de sensibilidade a antifúngicos	9
Objetivos	11
Relevância	11
Material e Métodos	12
• Amostras	12
• Identificação e prova de sensibilidade a antifúngicos	12
• Provas de proteinase e fosfolipase	13
Organização do banco de dados e análise estatística	13
Aspectos éticos	13
Resultados	14
• Amostras	14
• Identificação das leveduras	14
• Produção de fosfolipase e proteinase	14
• Sensibilidade a Antifúngicos	15
Discussão	25
Conclusões	40
Referências Bibliográficas	41
Anexos	58

ABREVIATURAS

Anfo B	Anfotericina B
CIM	Concentração inibitória mínima
FZ	Fluconazol
IZ	Itraconazol
Ufc /mL	Unidade formadora de colônia por mL
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
PZ	Coefficiente de Atividade Enzimática
P	Produtora de enzima
FP	Fortemente produtora de enzima
N	Não produtora de enzima
µg	Micrograma
EUCAST	European Committee on antibiotic Susceptibility Testing
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards

Lista de Quadro, Tabelas e Figuras

Anexos

1-Métodos NCCLS X EUCAST.	58
2-Carta do Responsável pelo Laboratório do Hospital Menino Jesus de Guarulhos.	59
3-Carta do Responsável pelo Laboratório do Hospital Central de Guaianazes.	60
4-Carta de Aprovação no Comitê Científico da Divisão de Biologia Medica.	61
5-Formulas e Preparação de Meios de Cultura.	
Protocolo de Identificação de leveduras.	65

Figuras

1-Distribuição de 281 amostras de leveduras isoladas de trato intestinal segundo espécies.	17
2-Distribuição de 66 pacientes segundo espécies de 281 amostras de leveduras isoladas de trato intestinal.	18
3-Prova de fosfolipase fortemente positiva para 4 amostras de leveduras e amostra padrão ao centro.	21
4-Prova de proteinase fortemente positiva para 4 amostras de leveduras e amostra padrão ao centro.	21
5-Capacidade de produção da enzima fosfolipase para 60 amostras de <i>Candida não-albicans</i> de trato intestinal de população pediátrica.	22

6- Capacidade de produção da enzima proteinase para 60 amostras de <i>Candida não-albicans</i> de trato intestinal de população pediátrica.	22
7- Capacidade de produção da enzima fosfolipase em 84 amostras de <i>Candida albicans</i> de trato intestinal de população pediátrica.	23
8 - Capacidade de produção da enzima proteinase em 84 amostras de <i>Candida albicans</i> de trato intestinal de população pediátrica.	23

Tabelas

1-Distribuição de espécies de 281 leveduras isoladas de fezes de 66 pacientes pediátricos hospitalizados.	16
2-Produção de exoenzimas em 144 amostras de leveduras provenientes de fezes de população pediátrica hospitalizadas.	19
3 - Produção de exoenzimas em 144 amostras de leveduras de gênero <i>Candida</i> provenientes de fezes de população pediátrica hospitalizada.	20

Quadro I

Resultados e sensibilidade a antifúngicos pelo método EUCAST de 32 leveduras com perfil de R e/ou I para fluconazol e / ou itraconazol (IZ) obtidas pelo método de difusão em disco.	24
--	----

Resumo

Nas últimas décadas, houve aumento progressivo das infecções hospitalares por leveduras principalmente, do gênero *Candida*. A fonte de infecção pode ser endógena ou exógena, desde que esporos unicelulares de leveduras, permanecem viáveis por meses sobre superfícies bióticas ou abióticas. Diversas espécies de leveduras são encontradas em pele e mucosas de indivíduos saudáveis. Em estado saprofítico ainda, as leveduras encontram-se no trato gastrointestinal humano mas, a relação entre a presença desses microorganismos e sua patogenicidade está associada a diversos fatores predisponentes, tais como: número e variedade de sítios topográficos colonizados, uso prolongado de antibióticos, infecções associadas causadas por outros microorganismos e particularmente, distúrbios imunológicos ou metabólicos.

Leveduras do trato gastrointestinal podem ser transmitidas, via fecal-oral diretamente ou de modo indireto, de indivíduo para indivíduo. A transmissão de uma cepa em estado saprofítico para um hospedeiro suscetível, pode resultar em colonização seguida de infecção. A gravidade do quadro clínico depende de condições do hospedeiro e características do agente etiológico que engloba fatores de virulência e resistência a antifúngicos. Esses atributos são importantes em *Candida albicans* na qual, enzimas com atividade de fosfolipase e proteinase são marcadores de virulência. De outro modo, fenótipos de resistência, ocorrem, com maior frequência, em espécies não-*Candida albicans*.

Dada a possibilidade de instalação de doença endógena e a dispersão de cepas virulentas e resistentes, a partir de colonização gastrointestinal, estudos que contribuam para a determinação desses agentes constituintes da microbiota de pacientes internados, são importantes para o conhecimento da história natural das infecções nosocomiais por leveduras.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar o trato intestinal como fonte potencial de infecção hospitalar por leveduras, descrevendo as espécies prevalentes nas primeiras horas de internação e possíveis alterações temporais, quanto a fenótipo de virulência e resistência a antifúngicos. Foram analisadas 281 amostras de leveduras isoladas de 66 crianças internadas em

unidades de pediatria e semi-intensiva de hospitais públicos das cidades de São Paulo e Guarulhos, Brasil. As amostras foram isoladas de fezes coletadas nas primeiras horas de internação e durante o período de internação. A identificação das leveduras quanto a gênero e espécie foram realizadas por métodos tradicionais, analisando aspectos morfológicos e fisiológicos. A capacidade de produção de enzimas, fosfolipase e proteinase, foram verificadas conforme proposto por Price *et al.* 1982 e Ruchël *et al.*, 1982. A sensibilidade aos antifúngicos: anfotericina B (AMB), fluconazol (FZ), itraconazol (IZ), cetoconazol (CZ) e nistatina (NIS) foram analisada pela técnica de difusão por discos (CECON São Paulo, Brasil). Amostras resistentes ou com sensibilidade intermediária, foram re-avaliadas pelo método de microdiluição segundo NCCL (1997) modificado por EUCAST (2002).

As espécies isoladas foram: *Candida tropicalis* (32,7%), *C.albicans* (29,9%), *C.parapsilosis* (27,1%), *Trichosporon cutaneum* e *T.inkin* (3,2%), *Rhodotorula mucilaginosa* e *R.glutinis* (0,7%), *C.krusei* (3,6%), *C.guilliermondii* (2,1%), *C.glabrata* (0,4%) e *C.kefyr* (0,4%). A atividade enzimática foi observada na maioria das 84 amostras de *C.albicans*, sendo 96% de fosfolipase e 95% de proteinase. Entre as espécies não-*albicans* do gênero *Candida* foi verificada atividade em 97% de fosfolipase e 67% de proteinase. Amostras menos sensíveis às drogas azólicas, ou seja, amostras resistentes ou com sensibilidade dependente da dose, foram encontradas em 4,3% das 281 amostras de leveduras, sendo maior porcentagem observada em *C.krusei* (90%).

Conclui-se que existem leveduras de diversas espécies em fezes de população pediátrica hospitalizada, com fenótipos de virulência e resistência a antifúngicos. A manutenção desses fenótipos durante o período de internação pode representar fator de risco para infecção hospitalar endógena, ou ainda, fonte de dispersão de patógenos em potencial, no meio ambiente hospitalar.

Abstract

At the last decades the nosocomial infections caused by yeasts raised significantly especially by *Candida* yeasts. The infections source can be endogen or exogenous, since spores of unicellular and multicellular are kept viable for months and several yeasts species are found in skin and mucosa of healthy people. In a saprophytic state yeasts are found in the human gastrointestinal tract but the relationship between the presence of these microorganisms and their pathology is associated with several facts such as: number, variety of sites colonized, effective use of antibiotics, associated infections caused by another microorganisms and mainly disturbance in due to lack of immunity and metabolic. Yeasts in the gastrointestinal tract can be transmitted fecal-oral direct or indirectly from an individual to another. The transmission of a strain in a saprophytic state to a host can result in colony followed by infection. The infection can be serious depending on the host conditions and the etiologic agent that includes virulent factor and resistance to antifungal drugs. These attributes are important to *Candida albicans* in which enzymes with phospholipase activity are responsible for virulent factors. Resistance phenotypes, otherwise it should occur more frequently in non-*albicans* species.

Concerning the possibility of an endogen disease and the spread of virulent and resistant strains, from the gastrointestinal colony, studies that contribute to determine these agents that constitute the microbiota of patients, are important to know the natural story of nosocomial infections caused by yeasts.

This work aims at evaluating the intestinal tract as a source of hospital infections by yeasts describing the remaining species in the first hours and a possible change depending on the time that may happen to virulent phenotypic and resistance to antifungi.

Two hundred eighty one yeast samples from sixty-six children attended in pediatric and semi-intensive units in 2 public hospitals located in São Paulo and Guarulhos cities in Brazil were analyzed. The fecal samples were collected at the first hours after and during their arrival at the hospital.

To identify the yeasts according to their gender and species traditional methods were used, analyzing morphological and physiological aspects. The

ability to produce enzymes phospholipase and proteinase was verified the same way it was proposed by Price et al.1982 and Ruchel et al.1982. The sensibility to antifungals: amphotericin B (AMB), fluconazole (FZ), ketoconazole (CZ) e nistatin (NIS), was analyzed by the diffusion technical by disks (CECON São Paulo, Brazil). Resistant samples or with intermediate sensibility were confirmed by micro-dilution method according to NCCLS (1997) modified by EUCAST (2002).

The isolated species were: *Candida tropicalis* (30%), *C.parapsilosis* (27%), *C.krusei* (4%), *Trichosporon cutaneum* e *T.inkin* (3%), *Rhodotorula mucilaginosa* e *R.glutinis* (2%), *C.guilliermondii* (2%), *C.glabrata* (1%) and *C.kefyr* (1%).

Enzymatic activity was verified in most of the 84 *C.albicans* samples being 96% of phospholipase and 95% of proteinase production. Among the non-*albicans* species of *Candida* it was observed 97% of phospholipase and 67% of proteinase activity.

Less sensitive samples to azoic drugs including resistant or SDD sensibility, which depends on the achieved dose, were found in 4.3% of the 281 samples of yeast. The hugest percentage was observed in *C.krusei* (90%).

We can conclude that different yeast species occur in stools of pediatric population hospitalized, including virulent strains and antifungal resistant phenotypes. The persistent of these phenotypes in the intestinal tract during hospitalization period may represents a risk factor contributing to endogen infection, or play a role in dissemination of potential pathogens inside a nosocomial environment.

INTRODUÇÃO

Leveduras: infecção e colonização

Leveduroses são infecções causadas por leveduras que têm, cada vez mais, papel relevante na medicina, em particular, na infectologia. Sua importância deve-se, em especial, ao advento dos antibióticos, corticóides, drogas citostáticas, bem como a prática de transplantes de órgãos, implantações de próteses e outras intervenções cirúrgicas, além da maior sobrevivência de pacientes de risco (CANDIDO, 1987; RUCHEL, 1996; RAYMOND *et al.*, 2000).

As formas clínicas dessas micoses são diversas e diferentes espécies de leveduras podem causar o mesmo quadro clínico. Leveduras são seres resistentes às condições de temperatura e umidade, sendo encontrados em quase todos os ecossistemas terrestres. Leveduras são microorganismos eucariotas pertencentes ao Reino Fungi, em geral, unicelulares e que se reproduzem assexuadamente, por gemulação ou brotamento. Os esporos unicelulares, denominados conídios, podem permanecer viáveis por meses, sobre superfícies abióticas ou bióticas. A reprodução sexual, por ascósporos ou basidiósporos, também é descrita em muitas espécies. Alguns dos 100 gêneros descritos têm ainda, capacidade de formar túbulos, denominados hifas.

A capacidade de formar esses filamentos, ou filamentação está estreitamente, relacionada com a invasão de tecidos e, portanto, a patogenicidade da cepa (LACAZ *et al.*, 2002; MENDES-GIANNINI & MELHEM, 2001; KURTZMANN & FELL, 1998; LACAZ *et al.* 1998). A virulência da cepa, por sua vez, está relacionada à produção de enzimas, bem estudada na espécie *Candida albicans*, no que se refere a fosfolipase e proteinase, incluindo autores brasileiros (MAFFEI, 1996; SILVA, 1999; SZESZS, 2002). A espécie *C. albicans* é de modo geral, a mais estudada, pois, dentre as leveduroses, as provocadas por *C. albicans*, são as mais prevalentes. KOGA-ITO *et al.* (2001) estudaram a produção de fosfolipase e proteinase em amostras de *Candida albicans* isoladas de pacientes com candidose bucal e em indivíduos-controle sem a doença. Realizaram contagem de unidades formadoras de colônias de leveduras do grupo de pacientes e grupo-controle, além da identificação das espécies de *Candida*. A média de leveduras e produção dessas enzimas foi mais alta no grupo com

candidose ($3,52 \text{ ufc/mL} \pm 0,59 \text{ ufc/mL}$) do que no grupo-controle ($2,44 \text{ ufc/mL} \pm 1,19 \text{ ufc/mL}$). A maior produção das enzimas sugere maior virulência das amostras de *C.albicans* isoladas de pacientes com candidose bucal, em relação às obtidas de indivíduos-controle.

A candidíase possui variadas manifestações clínicas. A candidose cutânea envolve áreas intertriginosas da pele das mãos, virilhas e axilas e a candidíase mucocutânea, os tecidos de mucosa oral e vaginal. A forma muco-cutânea acomete indivíduos com ou sem fatores predisponentes. Entretanto, a forma candidíase mucocutânea crônica é uma das formas mais graves da doença, infectando pacientes com defeitos genéticos e metabólicos. A forma sistêmica da candidíase ocorre após a disseminação via sanguínea em indivíduos suscetíveis, com algum fator predisponente. Nesses casos pode haver invasão da levedura pós-candidemia, levando a candidíase pulmonar, nefrite, flebite supurativa, artrite, osteomelite, endoftalmite, balanite, lesões do SNC, endocardite, em que pode ocorrer obstrução de válvulas cardíacas e embolias, devidas à grande quantidade de blastoconídios e pseudo-hifas, sendo freqüente também a ocorrência de miocardite e pericardite (CALDERONE *et al.*, 2002).

Leveduras do gênero *Candida* são reconhecidas como patógenos oportunistas de maior freqüência em clínica médica humana, destacando-se também, no ambiente hospitalar por estarem relacionadas a quadros graves de infecções nosocomiais (RESENDE *et al.*; 2001). O progressivo aumento da freqüência de candidemia, ou seja, *Candida sp* causando infecção de corrente sanguínea, é observado em vários países, particularmente, em pacientes hospitalizados tratados com antibioticoterapia prolongada, terapia imunossupressiva, nutrição parenteral e pacientes expostos a procedimentos invasivos, como cateterização intravascular, hemodiálise e cirurgia abdominal (ODDS, 1979). O índice de candidemia foi de 3,43 por 10 000 pacientes internados, no estudo italiano de FARINA *et al.* (1999) e a ocorrência foi em média 25,7 dias após a data de admissão. Porém, BREGENZER *et al.* (1996) observaram que essa taxa era, de até 6,7 por 10 000 admissões, em hospital na Suíça. As taxas porém variam consideravelmente, conforme o tipo e tamanho do hospital, bem como o período do estudo (BUTLER *et al.*, 1988).

MATAR *et al.* (2003) encontraram *Candida albicans* (n=205;51,3%), como a espécie mais prevalente, seguida de *C.parapsilosis* (n=66;16,5%), *C.tropicalis* (n=56;14%), *C.glabrata* (n=39;9,8%), *C.krusei* (n=24;6%) e outras espécies (n=10;2,5%) em um grupo de 400 pacientes com infecção de corrente sanguínea por leveduras. Em nosso país, poucos são os trabalhos que descrevem com detalhe, os agentes fúngicos de fungemia. COLOMBO *et al.* (1999) estudaram 145 pacientes com infecção hospitalar, em faixa etária de 0 a 98 anos, internados em UTI (Unidade de Tratamento Intensivo), enfermaria, unidade de pediatria, oncologia e emergência, para os quais foram colhidas amostras de sangue para cultura de fungos. *Candida albicans* (37%) foi espécie mais freqüente, sendo que a taxa *Candida* não-*albicans* foi de 63%. Esse grupo incluiu as seguintes espécies: *C.parapsilosis* (25%), *C.tropicalis* (24%), *C.rugosa* (5%), *C.glabrata* (4%), *C.guilliermondii* (2%), *C.krusei* (1%), *C.lipolytica* (1%) e *C.famata* (1%).

Os achados de COLOMBO *et al.* (1999) são relevantes, pois apontam possível tendência do aumento proporcional de espécies não-*albicans* que poderia sugerir alteração importante na história natural da candidemia, quadro que sempre teve como agente principal *C.albicans*. Além disso, sabe-se que *C. albicans* tem maior sensibilidade *in vitro* e *in vivo*, à terapêutica com azóis, do que as outras espécies. Portanto, os resultados desses autores seriam esperados em hospitais que fizessem regime profilático, segundo sugeriu ODDS (1993). Entretanto, essa prática não ocorreu nas unidades hospitalares estudadas por COLOMBO *et al.* (1999) e essa tendência merece, portanto, ser objeto de outras investigações.

O risco para candidemia aumenta se houver colonização de mucosa de trato gastrointestinal, apesar dessa infecção poder ocorrer independente de colonização prévia (AISNER *et al.*, 1976; WINGARD *et al.*, 1979; WASH & MERS, 1986; MERS *et al.*, 1986; PFALLER *et al.*, 1987; KARABINIS *et al.*, 1988; WEY *et al.*, 1989; BROSS *et al.*, 1989; WILEY *et al.*, 1990; RICHET *et al.*, 1991; WINSTON *et al.*, 1993; PFALLER, 1994; VOSS *et al.*, 1994; AKOVA, 1994; PFALLER, 1995; WINGARD, 1995; PFALLER, 1996).

Leveduras em trato intestinal

O isolamento de leveduras, a partir de amostras de fezes é facilmente executados em meios de cultura usuais, como por ex. agar Sabouraud com cloranfenicol. Entretanto, para melhores resultados, recomenda-se meios presuntivos que, por reação colorimétrica, indicam a presença de colônias mistas na mesma cultura. Dentre os meios presuntivos, descritos na literatura, como: Nickerson, Biggy agar, TTC, o CHROMagar *Candida* (CHROMagar Microbiology, Paris, França) é um meio de cultura cromogênico, indicado para isolamento de colônias de *Candida spp* (ODDS & BERNAERTS, 1994).

A maior fonte endógena de infecção por *Candida sp* é o trato gastrointestinal (TGI) e, além disso, esse sítio topográfico é reservatório importante, por conter grande quantidade de esporos de *Candida sp*. Esses fatos, caracterizam o TGI como fonte potencial de dispersão ambiental de leveduras, desde que podem ser transmitidas leveduras pelas mãos de trabalhadores do hospital, médicos e enfermeiras, na manipulação do paciente (CANTÓN *et al.*, 2001). A prevalência de leveduras em pacientes hospitalizados pode ser avaliada pelos trabalhos de ENWEANI *et al.* (1994) que, examinando fezes de 257 crianças menores de 10 anos, encontraram 165 (64,2%) pacientes com leveduras e de TALWAR *et al.* (1990) que, de 854 casos com sintomas de diarreia aguda ou crônica, identificaram leveduras em 54,8% deles sendo a maioria (75%), crianças.

TALWAR *et al.* (1990) descreveram a existência de variação sazonal de diarreias associadas à presença de leveduras, em pacientes pediátricos, com pico de maior incidência nos meses de abril a agosto.

MATA *et al.* (1972) e GRACEY *et al.* (1974) concluíram que espécies de *Candida* são comuns no trato intestinal superior de crianças desnutridas e que neste sítio, podem contribuir para a patogênese da doença diarreica pelos efeitos na absorção de açúcares e água (BELL *et al.*, 1976; THELEN *et al.*, 1978). Por outro lado, o estado de desnutrição pode ser um fator predisponente para enterites por *Candida sp*, assim como, a colonização intestinal precoce em recém-nascidos.

A correlação entre idade e frequência de leveduras intestinais foi investigada por SHOME *et al.* (1976) que demonstraram em Nova Delhi, que a prevalência de *Candida sp* em fezes de crianças com gastroenterites, menores de um ano ou

entre 1 a 4 anos foi, respectivamente, 28,5% e 21,4 %, índices maiores quando comparados aos de crianças diarréicas em outras faixas etárias.

Segundo LACAZ *et al.* (2002), as leveduras encontradas no conteúdo intestinal podem exercer o papel de verdadeiros focos sensibilizadores do organismo, sendo que, durante muito tempo a diarréia branca foi associada à ação patogênica de *Candida albicans*.

Apesar de leveduras colonizarem trato gastrointestinal humano, a relação entre a presença destes microrganismos e sua patogenicidade está associada a diversos fatores, tais como: uso prolongado de antibióticos, infecções associadas por outros microrganismos, número e variedade de sítios topográficos colonizados e em especial, distúrbios imunológicos ou metabólicos (CANDIDO, 1987).

THOMAS *et al.* (1985) estudando 23 pacientes com neutropenia e monocitopenia analisaram exames histopatológicos e cultura para pesquisa de fungos. As amostras foram obtidas do trato gastrointestinal (esôfago, estômago, intestino grosso e delgado), durante a evolução da doença e no exame *pós-morte*. As análises histopatológicas apresentaram necrose celular avançada, com invasão de parede celular, presença de blastoconídios e hifas invadindo vasos sanguíneos e parede intestinal. As análises micológicas de material coletado por biópsia, apresentaram *Candida tropicalis* e *Candida albicans*. Os autores concluíram que a presença de blastoconídios e pseudo - hifas, invadindo tecidos seja, decorrente do processo inflamatório e necrótico do trato gastrointestinal e quadros menos graves, com manifestações inflamatórias localizadas no trato intestinal, como enterites *podem ocorrer* após a administração de antibióticos em consequência de altos índices de leveduras em estado de colonização, inclusive na vigência de terapia antifúngica (PONNUVEL *et al.* 1996). ENWEANI *et al.* (1994), em 165 pacientes com leveduras, verificaram 157 (95,2 %) casos diarréicos e 8 (4,8 %) não-diarréicos, sugerindo relação causa - efeito.

A associação da presença de leveduras e quadros entéricos, no entanto, não é consenso. NGAN *et al.* (1992) estudaram fezes de 83 crianças diarréicas e identificaram *Candida sp*, em apenas 4,8 % desse material. FORBES *et al.* (2000) determinaram a prevalência de leveduras entre 174 crianças hospitalizadas, de 0 a 5 anos, sendo 107 com diarréia e 67 sem diarréia. Das fezes do grupo de crianças assintomáticas foram isoladas leveduras de 26 crianças (36 %) e no

grupo de crianças sintomáticas foram obtidas de 43 (39 %) casos. Concluíram que a concentração de leveduras estava possivelmente, associada ao uso recente de antibióticos e presença de outros patógenos entéricos; não estavam associados à idade, estado nutricional ou duração da diarreia. Concluíram que não houve diferença significativa entre a taxa de ocorrência de leveduras em fezes de casos diarreicos e não-diarreicos. Do mesmo modo, PONNUVEL *et al.* (1996) analisando 175 crianças, de 0 a 5 anos com sintomas de diarreia e submetidas a tratamento com antibióticos de amplo espectro concluíram que é difícil estabelecer a implicação das leveduras como agente primário da doença. Em outro estudo, com população pediátrica menor de 2 anos, MURAHOVSKI *et al.* (1969) verificaram que 82% de 85 crianças assintomáticas e 86% e 160 crianças com diarreia albergavam leveduras e concluíram que não houve diferença significativa entre as duas populações, não conseguindo associar a presença de leveduras e diarreia.

O trabalho de TALWAR *et al.* (1990) com 854 casos com sintomas de diarreia, aguda ou crônica, sendo 640 crianças e 214 adultos, não verificou correlação com a ocorrência de leveduras, as quais, foram isoladas em apenas metade do grupo.

A hipótese da relação entre leveduras e diarreia foi analisada pela pesquisa direta de leveduras em esfregaços de fezes, após a coloração de Gram ou ao exame "a fresco" sem corante. Em pacientes com sintomatologia de diarreia, encontraram concordância entre presença de filamentos de levedura e isolamento de *Candida sp* de fezes, embora sua visualização não fosse patognomônica da doença (MURAHOVSKI *et al.* 1969). NGAN *et al.* (1992) também, ao exame direto das fezes, verificaram aspectos distintos entre crianças divididas em dois grupos: controle e diarreicos. Hifas de leveduras não foram vistas, mas, somente blastoconídios, foram encontrados no grupo-controle, enquanto no grupo de doentes foram freqüentemente, observadas hifas. Outros autores ainda valorizaram a ocorrência de filamentos de leveduras como indicativo de candidíase intestinal. (KOZINN & TASCHIDJIAN, 1962; DANNA *et al.*, 1991; GUPTA *et al.*, 1990).

Para explicar a origem das leveduras de trato gastrointestinal, alguns autores realizaram trabalhos interessantes, analisando diversas hipóteses. No trabalho realizado por MURAHOVSKI *et al.* (1969) com 245 pacientes pediátricos

concluíram que a grande maioria dos portadores de candidíase bucal apresentava *Candida sp* nas coproculturas.

BERNHARDT *et al.* (1997) verificaram se amostras de *Candida sp* em fezes eram provenientes da cavidade oral, estômago ou suco duodenal, sendo o intestino delgado ou grosso seu reservatório final. Observaram que a microbiota normal era composta por aproximadamente 10^4 ufc de leveduras por grama de fezes. Na cavidade oral o local de maior colonização por leveduras foi à superfície da língua, porém *Candida sp* pode também, ser isolada do palato e mandíbula. Analisaram, quantitativamente e qualitativamente, a existência de leveduras em 300 pacientes com dentição e cavidade bucal saudáveis. Concluíram que o gênero *Candida* foi encontrado em língua (58,5 %), palato (35 %), mandíbula superior (27 %) e inferior (19,5 %). A distribuição das espécies: *C. albicans* e outras foram respectivamente, para cada região da cavidade bucal: 32 % e 26,5 %, 25,5 % e 10,5 %, 15 % e 12 %, 11,5 % e 8,0 %.

As leveduras foram pesquisadas no suco gástrico, encontrando - se: *C. albicans* (43 %), *C. tropicalis* (12 %), *C. krusei* (3 %), *C. glabrata* (4 %), *C. parapsilosis* (1 %) e outras espécies de *Candida sp* (34 %). De fezes e suco duodenal foram isoladas 158 cepas de leveduras sendo: *C. albicans* (60,7%), *C. tropicalis* (17,7%), *C. glabrata* (9,5%) e outras espécies (8,2%). O gênero *Saccharomyces sp* foi também isolado de 3 % (suco gástrico) e 3,8 % (fezes e suco duodenal) dos 300 pacientes. Desta forma, os autores demonstraram que leveduras dos gêneros *Candida* e *Saccharomyces* podem colonizar qualquer seguimento do trato gastrintestinal.

As leveduras do trato intestinal podem ser veiculadas via fecal-oral, seja por contato direto ou indireto. A transmissão de uma cepa em estado saprofítico de um hospedeiro para outro, cujo perfil imunológico esteja seriamente comprometido, pode resultar em colonização seguida de infecção (BERNHARDT *et al.* 1977).

O quadro infeccioso pode ser localizado ou sistêmico, dependendo da capacidade de invasão, da cepa e espécie, como por exemplo *C. tropicalis*, que é mais invasiva do que *C. albicans*. (TALWAR *et al.* 1990).

Apesar de não haver consenso sobre associação entre leveduras do trato intestinal e diarreia, há certeza quanto a capacidade de adesão às células de epitélio intestinal, e de modo que de um estado prévio de colonização, as leveduras

podem invadir e produzir sérias infecções em pacientes hospitalizados (BESNARD *et al.*, 1993; BANDINI *et al.*, 1980).

Segundo BIASIOLI *et al.* (2002), a associação entre colonização de diversas espécies de leveduras na mucosa intestinal e subsequente disseminação, está diretamente, relacionada à capacidade de aderência. Os autores estudaram a capacidade de aderência analisando 23 amostras isoladas de fezes de pacientes hospitalizados. As espécies envolvidas foram: *Candida albicans* (12), *C.glabrata* (2), *C.krusei* (2), *C.parapsilosis* (2), *C.tropicalis* (2), *C.kefyr* (1), *C.colliculosa* (1) e *C.lusitaniae* (1). Concluíram que *Candida albicans* apresentou altos níveis de aderência e as outras espécies estudadas apresentaram baixos níveis de aderência. No entanto, o trato gastrointestinal talvez seja a mais importante fonte de colonização, a qual pode anteceder quadro de fungemia, por alterações da microbiota residente, entre outros fatores (SOLOMKIN *et al.*, 1996). A pressão seletiva do uso de antibacterianos pode proporcionar um aumento significativo de leveduras do trato intestinal que, em pacientes suscetíveis, predispõe à infecção de corrente sanguínea. Este fato foi descrito por STILL *et al.* (1995) em série de 233 amostras de leveduras isoladas de sangue de pacientes recém nascidos hospitalizados, com significantes níveis de imunodepressão devido a neoplasias, uso prolongado de antibióticos e AIDS no período de três anos.

As conclusões do trabalho de BREGENZER *et al.* (1996) realçam o papel, como foco inicial para candidemia, do trato intestinal, em estudo de 13 casos. Essa fonte, foi considerada a mais relevante quando comparada com: cateter, trato urinário, trato respiratório e uso endovenoso de drogas. O controle da candidemia depende de vários fatores, especialmente, ligados aos hospedeiros, mas também são importantes: o tempo decorrido desde o início da infecção até o diagnóstico, a espécie da levedura e seu perfil de resistência. Amostras resistentes que agravam e aceleram a falha terapêutica, são relatadas por muitos autores (ALVES & CURY, 1992).

Provas de sensibilidade a antifúngicos

A resistência clínica, em muitos casos, pode ser prevista pela avaliação prévia do perfil de resistência a antifúngicos em testes laboratoriais. Dentre os testes disponíveis, o mais tradicional é feito com discos impregnados com as drogas que difundem na superfície do meio de cultura, onde foi semeada a amostra de levedura. Este método de difusão por discos baseia-se no antibiograma usado para bactérias descrito por (KIRBY BAUER, 1996). Cada disco tem uma determinada concentração da droga a ser avaliada. Após incubação, em período e temperatura adequados, forma-se um halo de inibição, proporcional ao perfil de sensibilidade de amostra avaliada, frente à droga testada.

Muitos parâmetros influem na reprodutibilidade e acurácia da prova de difusão por discos. O meio de cultura, tanto sua composição quanto viscosidade, o inóculo da levedura, a natureza química da droga, capacidade de difusão, temperatura e tempo de incubação, são alguns dos fatores principais.

Outras metodologias que utilizam agar para testes de sensibilidade são: diluição, muito indicado para fungos filamentosos, deposição da droga em orifícios feitos no agar distribuído em fitas contendo várias concentrações da droga, que é depositada na superfície do agar (ALVES & CURY, 1992).

Em todas essas metodologias é fundamental o controle de qualidade interno com uma cepa-padrão cujo perfil de sensibilidade seja conhecido de modo a validar as provas. De qualquer modo, além da cepa-controle é recomendado que os resultados obtidos com essas metodologias sejam avaliados periodicamente, com um método reconhecido internacionalmente, como referência (CUENCA-ESTRELLA & RODRIGUEZ - TUDELA, 2002).

Dentre os métodos de referência para fungos, aqueles que se aplicam à leveduras apresentam melhores resultados do que os destinados a testes com fungos filamentosos. Os métodos publicados pelo subcomitê norte-americano do "National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS) foram baseados em extensivos estudos multicentros e são considerados, na atualidade (NCCLS, 1997, NCCLS 2002).

No entanto, os métodos propostos pelo NCCLS, apesar de serem considerados "*gold standard*" têm ainda, muitas limitações, tanto para crescimento adequado de algumas espécies, quanto aos critérios de interpretação dos

adequado de algumas espécies, quanto aos critérios de interpretação dos resultados obtidos (CUENCA - ESTRELLA & RODRIGUEZ - TUDELA, 2001; REX *et al.*, 2001; MOORE *et al.*, 2000). Desse modo, outros grupos surgiram na intenção de superar os problemas existentes e publicaram métodos denominados "NCCLS - like". Na Europa foi criado um subcomitê do grupo "*European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing*" (EUCAST) que têm estudado métodos modificados da referência (NCCLS), para estudar a sensibilidade de leveduras.

A sensibilidade de cepas de leveduras pode ser avaliada por um método alternativo seja em agar, seja em meio líquido, mas, sempre acompanhada de um método de referência para validar os resultados. Cepas que se mostrarem resistentes ou com sensibilidade intermediária, ou seja, que não se mostraram sensíveis, no método de triagem, devem ser reavaliadas por um método de referência (RODRIGUEZ-TUDELA *et al.*, 2002). Os métodos de referência permitem, determinar a concentração inibitória mínima (CIM) que inibe o crescimento da amostra de levedura sob estudo. O método de difusão em disco que pode ser usado como triagem, não proporcionam resultados em valores de CIM, pois as amostras são submetidas a uma determinada concentração da droga.

Os trabalhos sobre perfil de sensibilidade a antifúngicos estudaram, em sua grande maioria, cepas isoladas de micoses muco - cutâneas, sendo poucos os que analisaram cepas invasivas. Os autores relatam que valores de CIM para fluconazol, inferior ou igual a 8 µg / mL foram encontrados para cepas de *Candida albicans* classificadas como sensíveis, isoladas de pacientes com sucesso terapêutico. Valores acima ou igual a 64 µg/mL foram achados para cepas caracterizadas como resistentes pois foram obtidas de casos com falha terapêutica (REX *et al.*, 1997). Desse importante trabalho, propuseram - se os pontos de corte para cepas sensíveis e resistentes. As cepas inibidas com 16 µg/ml ou 32 µg/ml foram enquadradas como SDD, significando sensibilidade dependente da dose administrada para o paciente, do qual foi isolada a cepa (NCCLS, 2002).

As infecções graves, por cepas resistentes ou sensíveis aos antifúngicos, podem ser causadas por cepas saprófitas, de microbiota humana que sob certas condições tornam-se oportunista. *Candida albicans* é o melhor exemplo, sendo o

agente principal de infecção hospitalar endógena. Por outro lado, outras espécies de *Candida sp* encontradas também como colonizadoras do homem e animais além de existirem em muitos, outros substratos, em fontes abióticas ou na natureza são em regra, agentes de infecção.

Dadas as variadas taxas de colonização intestinal por leveduras, pela variedade de suas espécies, muitas delas resistentes a antifúngicos e a possibilidade de instalação de doença, a partir desta colonização torna-se interessante conhecer a microbiota de pacientes no momento da internação e sua monitoração durante o período da hospitalização, o que contempla os objetivos deste trabalho.

OBJETIVOS

- Avaliar o trato intestinal como potencial fonte de infecção hospitalar por leveduras
- Analisar a distribuição de espécies de leveduras em população pediátrica e descrever as espécies prevalentes, nas primeiras horas e dias de internação hospitalar.
- Verificar a capacidade de produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase das amostras do gênero *Candida*.
- Monitorar o perfil de sensibilidade das amostras e leveduras a antifúngicos, durante hospitalização.

RELEVÂNCIA

O estudo pode contribuir para avaliar a ocorrência de amostras resistentes a antifúngicos ou ainda, determinar a presença de espécies incomuns nesse substrato. No Brasil, pouco se conhece sobre as espécies presentes em trato intestinal e tampouco seu perfil de sensibilidade a antifúngicos. Muitas dessas drogas que eventualmente, podem ser usados de modo profilático em pacientes debilitados, promovendo o fenômeno de resistência adquirida. Em episódios de infecção hospitalar por leveduras, e uma vez identificado o agente causal, pode-se estimar o papel do trato intestinal como possível fonte endógena, causa de infecção cruzada e com isso facilitar o controle da infecção.

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRAS

Foram analisadas 281 amostras de leveduras isoladas de fezes de crianças internadas em unidades de pediatria, berçário, semi-Intensiva do Hospital Menino Jesus de Guarulhos e Hospital Geral de Guaianases, SP, no período de 10 meses no ano de 2001. As amostras foram isoladas de fezes, coletadas nas primeiras 24 h e durante a primeira semana de internação, como procedimento de rotina hospitalar para população de risco para infecção hospitalar. As amostras foram isoladas em meio CHROMagar *Candida* (CHROMagar Microbiology, França), à temperatura de 30° C. As amostras originais de leveduras foram repassadas à Seção de Micologia do Instituto Adolfo Lutz. A separação de colônias, morfológicamente distinta, foi repicada em tubos contendo agar Sabouraud com cloranfenicol até o início do estudo. As amostras foram congeladas à temperatura de - 20° C após a sua identificação completa, incluindo perfil de sensibilidade.

IDENTIFICAÇÃO e PROVA DE SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS

A identificação das leveduras quanto a gênero e espécie, foi realizada analisando aspectos morfológicos e fisiológicos, de acordo com FELL & KURSTZMANN, 1998. A sensibilidade aos antifúngicos por testes com discos para difusão em agar foi feita e interpretada conforme instruções do fabricante CECON (Centro de Controle e Produtos para Diagnostico LTDA, SP, Brasil). Os antifúngicos usados foram: anfotericina B (anfo B), fluconazol (FZ), itraconazol (IZ), cetoconazol (CZ) e nistatina (Nist). As cepas que se apresentaram resistentes ou com sensibilidade Intermediária, pelo teste de difusão em disco, foram submetidas ao método de microdiluição, conforme publicação M27 - A (NCCLS, 1997) modificado por CUENCA - ESTRELLA *et al.*, (2002).

Para interpretação de resultados, utilizou-se tabela do documento M27A (NCCLS, 1997). Os resultados de CIM para FZ com valores de 16µg/mL ou 32µg/mL, bem como de 0,25µg/mL-0,5µg/mL para IZ, classificam a cepa em sensibilidade dependente da dose (SDD), significando segundo o documento M27A (NCCLS, 1997) que a levedura será sensível ou resistente do ponto de

vista clínico, de acordo com a dose sérica, obtida com a quantidade administrada da droga.

A persistência de fenótipos de leveduras resistentes ou SDD a antifúngicos foi analisada por meio da comparação das amostras seqüenciais isoladas de cada paciente.

PROVAS DE PROTEINASE E FOSFOLIPASE

A capacidade de produção de enzimas, fosfolipase e proteinase, foram verificadas conforme proposto, respectivamente por PRICE *et al.* 1982 e RUCHEL *et al.*, 1982. Todas as 84 amostras de *Candida albicans* foram avaliadas quanto à produção dessas exoenzimas. Para as demais espécies do gênero *Candida* foram selecionadas amostras representativas de cada paciente. Amostras pertencentes a outros gêneros não foram avaliadas. Os meios de cultura utilizados nessas provas constam do **ANEXO 1**.

ORGANIZAÇÃO DO BANCO DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os Programas EPI - INFO (CDC, USA) e EXCEL. Foram usados para compilação de dados e confecção de tabelas e gráficos.

ASPECTOS ÉTICOS

As cepas de leveduras analisadas foram isoladas nos laboratórios dos hospitais e fazem parte de bancos de cepas. Foram cedidas para esse projeto conforme cartas do Dr. João Osório Martins Cardoso, Diretor Clínico Responsável pelos Laboratórios dos Hospitais (**Anexo 2**). As cartas de aprovação nos comitês de Ética e Científico da Divisão de Biologia Médica que rege as pesquisas realizadas no Instituto Adolfo Lutz constam do **Anexo 3**.

RESULTADOS

Amostras

Foram estudadas 281 amostras de leveduras obtidas de fezes de 66 pacientes com faixa etária entre <1 mês e 7 anos. As leveduras foram obtidas de diferentes amostras de fezes do mesmo paciente, em intervalo de 24 h a 12 dias. O maior número de amostras (n=6) foi proveniente de 1 paciente e 5 amostras de outro paciente, sete amostras foram obtidas de 7 pacientes, 3 de 29 casos e 2 amostras de 28 outros casos. Do total de amostras, 31,8% eram fezes diarrêicas e o intervalo entre as coletas variou de 1 dia (17/66 casos; 25,8%) até 4 dias (49/66 casos; 74,2%), dependendo da solicitação médica e da rotina hospitalar.

Identificação das leveduras

Entre as 281 leveduras isoladas das amostras de fezes, foram encontradas: *Candida tropicalis* (32,7%), *C.albicans* (29,9%), *C.parapsilosis* (27,1%), *C.krusei* (3,6%), *Trichosporon cutaneum* e *T.inkin* (3,2%), *Rhodotorula mucilaginosa* e *R.glutinis* (0,7%), *C.guilliermondii* (2,1%), *C.glabrata* (0,4%) e *C.kefyr* (0,4%) (**Tabela 1**). Do total de amostras, 96,1% pertenciam ao gênero *Candida sp.* A distribuição de espécies identificadas, segundo total de amostras consta da **Figura 1** e **Tabela 1** e a frequência segundo total de pacientes, está ilustrada na **Figura 2**.

Produção de fosfolipase e proteinase

De 84 amostras isoladas de *C.albicans*, foram encontradas 43 (52%) fortemente produtoras de fosfolipase e 38 (45%) de proteinase (**Figuras 3, 4, 5, 6,7e8**). Menor produção foi verificada em 38 (45%) e 42 (50%) amostras dessa mesma espécie, respectivamente, de fosfolipase e proteinase. Amostras não produtoras foram 3 (4%) e 4 (%), respectivamente em relação a essas enzimas .

A capacidade de produção de exoenzimas não foi avaliada para outros gêneros de 60 amostras de espécies não-*Candida albicans*. Nesse grupo foram encontradas 58 (97%) e 15 (25%) amostras fortemente produtoras, respectivamente, de fosfolipase e proteinase e outras 2 (3%) e 20 (33%) incapazes

de produzir essas enzimas, nas condições do teste. Ainda, foi verificado, em 25 (42%) amostras, menor produção de proteinase (**Tabela 2,3 e Figuras 5, 6, 7 e 8**).

Sensibilidade a Antifúngicos

Os testes com antifúngicos, pelo método de discos mostrou sensibilidade de 100% das 281 amostras de leveduras frente aos seguintes antifúngicos: anfotericina B, cetoconazol e nistatina.

Em 44 dessas amostras foi verificada menor sensibilidade, seja resistência ou sensibilidade intermediária, aos triazóis fluconazol e/ou itraconazol. Para esse grupo, a confirmação dos resultados foi possível somente em 32 amostras segundo o método de microdiluição. Nas demais amostras (n=12) não foram realizados testes com o método confirmatório, devido ao pouco crescimento das cepas, nas condições do experimento. Índice de concordância de 62,5% entre os 2 métodos foi encontrado, visto que 20 resultados foram concordantes e 12 discordantes.

Os resultados finais permitiram identificar 18/6,4 fenótipos de resistência a um (n=5) ou aos 2 triazóis (n=15). Para FZ houve 5 resultados de CIM $\geq$ 64 $\mu\text{g/mL}$ para amostras de: *C.krusei* (n=2), *C.parapsilosis* (n=1) e *C.tropicalis* (n=2). Dez amostras SDD (CIM = 16 $\mu\text{g/mL}$ ou 32 $\mu\text{g/mL}$) foram verificadas, sendo: *R.mucilaginosa* (n=1), *C.tropicalis* (n=2) e *C.krusei* (n=7). Para IZ os resultados, de CIM $\geq$ 1 $\mu\text{g/mL}$ foram visto frente à *C.tropicalis* (n=2) e *C.parapsilosis* (n=2) e 14 amostras foram SDD (CIM = 0,25 $\mu\text{g/mL}$ ou 0,5 $\mu\text{g/mL}$), incluindo: *C.parapsilosis* (n=2), *C.tropicalis* (n=4), *C.krusei* (n=8). Os resultados dos testes de sensibilidade constam do **Quadro 1**.

Os fenótipos de resistência foram mantidos no trato intestinal de 7/9 pacientes durante o período do estudo, e em outros 2 pacientes, houve alteração do fenótipo.

TABELA 1 - Distribuição de espécies de 281 leveduras isoladas de fezes de 66 pacientes pediátricos hospitalizados

Espécies	N	%
<i>C. tropicalis</i>	92	33
<i>C. albicans</i>	84	30
<i>C. parapsilosis</i>	76	27
<i>C. krusei</i>	10	4
<i>Trichosporon cutaneum</i>	7	2
<i>C. guilliermondii</i>	6	2
<i>Trichosporon inkin</i>	2	1
<i>C. kefir</i>	1	0
<i>R. mucilaginosa</i>	1	0
<i>R. glutinis</i>	1	0
<i>C. glabrata</i>	1	0
Total	281	100

Figura 1 . Distribuição de espécies de 281 amostras de leveduras isoladas de fezes de 66 pacientes pediátricos hospitalizados.

Figura 2 - Distribuição de 66 pacientes segundo espécies de 281 amostras de leveduras isoladas de trato intestinal.

TABELA 2. Produção de exoenzimas em 144 amostras de leveduras provenientes de fezes de população pediátrica hospitalizada.

Exoenzima	Fosfolipase		Proteinase		Total N(%)
<div> <div> Espécie </div> <div> Capacidade de Produção </div> </div>	<i>C. não-albicans</i> N(%)	<i>C. albicans</i> N(%)	<i>C. não-albicans</i> N(%)	<i>C. albicans</i> N(%)	
FP	58(97)	43(51)	15(25)	38(45)	144(100)
P	0(0)	38(45)	25(42)	42(50)	
N	2(3)	3(4)	20(33)	4(5)	
Total	60(100)	84(100)	60(100)	84(100)	

FP = Fortemente produtora

P = Produtora

N = Não produtora

Tabela 3 - Produção de exoenzimas em 144 amostras de leveduras do gênero *Candida* provenientes de fezes de população pediátrica hospitalizada

Capacidade de Produção	<i>C. albicans</i> n (%)		<i>C. parapsilosis</i> n (%)		<i>C. tropicalis</i> n (%)	
	PA	Ph	PA	Ph	PA	Ph
P	42 (50.0)	38 (45.2)	10	15	25 (55.6)	—
N	4 (4.8)	3 (3.6)	5	—	10 (22.2)	43 (95.5)
FP	38 (45.2)	43 (51.2)	—	—	10 (22.2)	2 (4.5)
Total	84 (100)	84 (100)	15 (100)	15 (100)	45 (100)	45 (100)

PA = Proteinase

Ph = Fosfolipase

P = Produtora

N = Não Produtora

FP = Fortemente Produtora

Figura 3. Prova de fosfolipase fortemente positiva para 4 amostras de levedura e amostra - padrão, ao centro.

Figura 4. Prova de proteinase fortemente positiva para 4 amostras de levedura e amostra - padrão, acima e à esquerda.

Figura: 5 Capacidade de produção da enzima fosfolipase para 60 amostras de *Candida não - albicans*.

Figura: 6 Capacidade de produção da enzima proteinase para 60 amostras de *Candida não - albicans*.

Figura: 7 Capacidade de produção da enzima fosfolipase em 84 amostras de *Candida albicans* de trato intestinal de população pediátrica.

Figura: 8 Capacidade de produção da enzima proteinase em 84 amostras de *Candida albicans* de trato intestinal de população pediátrica.

Quadro I - Resultado do perfil de sensibilidade a antifúngicos pelo método EUCAST de 32 leveduras isoladas de fezes e classificadas como R ou I, segundo método de difusão em disco.

24

	Espécie Afg (CIM)	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>C. krusei</i>	<i>T. cutaneum</i>
FLUCONAZOL	0,25			02	01			
	0,5	02	01	03			01	01
	01		02	01				
	2		01					
	04							
	08		03					
	16			01		01	02	
	32						05	
	≤ 64		01	02			02	
ITRACONAZOL	TOTAL	02	08	09	01	01	10	01
	≤ 0,015		01				02	01
	0,03		02	02	01			
	0,06	01	01	01				
	0,12	01				01		
	0,25			04			04	
	0,5		02				04	
	01		01					
	02		01					
	08			02				08
	TOTAL	02	08	09	01	01	10	01

R = Resistente
 I = Intermediária
 Afg = Antifúngico
 CIM = Concentração Inibitória Mínima em µg / mL

DISCUSSÃO

O uso de CHROMagar, na seleção de colônias de leveduras para posterior identificação da espécie e determinação de sua sensibilidade a antifúngicos, foi adequado para evidenciar colônias de cores: branca, verde, azul e rosa. Tonalidades mais claras e escuras, dentro das cores verdes, azuis e rosa foram nitidamente, observadas. Observou-se também que essa nuance de cores, modificavam-se com o passar dos dias, demonstrando a importância da leitura no período indicado pelo fabricante. Entretanto, ressalta-se que, neste trabalho, a utilização de CHROMagar teve o objetivo único de separar algumas espécies presentes simultaneamente, em uma mesma amostra biológica e não de identificação.

PFALLER *et al.* (1996) avaliaram a eficiência do CHROMagar em banco de cepas, sendo: *C.albicans* (n=14), *C.tropicalis* (n=13), *C. krusei* (n=18) e 24 amostras de outras espécies de *Candida sp*, incluindo: *C.parapsilosis*, *C.lusitaniae* e *C. lipolytica*. No total, foram estudadas 478 leveduras do gênero *Candida sp*, coletadas de 547 amostras de fezes por "swab" retal de pacientes hospitalizados em UTI neonatal (Unidade de Tratamento Intensivo). Os autores concluíram que CHROMagar *Candida* é meio de cultura seletivo e diferencial para o isolamento de leveduras do gênero *Candida* e além disso, a identificação é presuntiva para *C. albicans*. O mesmo meio foi usado por KRAUSE *et al.* (2001) para semeadura fezes de 395 crianças, permitindo isolar as seguintes espécies: *C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*, *C.glabrata* e *C.krusei*.

A experiência adquirida com este trabalho, não permite, no entanto recomendar o meio CHROMagar *Candida*, como seletivo, desde que permitiu o desenvolvimento de colônias de *Aspergillus sp* de uma amostra de fezes. Além disso, foi verificado, crescimento de bactérias em algumas amostras, apesar da adição de cloranfenicol á composição do meio.

ANSCOUGH *et al.* (1998) avaliaram, CHROMagar e API (bioMerieux, França) comparativamente, quanto à eficiência para identificação presuntiva de leveduras. No estudo com 298 cepas de leveduras de orofaringe e fezes de pacientes leucêmicos, concluíram que houve correlação entre os métodos experimentados mas, que a especificidade foi alta (100%) apenas para *Candida albicans*.

Os resultados do presente trabalho indicaram que todas as amostras identificadas como *C. albicans* apresentaram coloração verde, conforme instruções do fabricante do agar. Para *C. tropicalis*, do mesmo modo, o meio atendeu à finalidade de identificação presuntiva. A capacidade presuntiva, de CHROMagar, no entanto, não serve para outras espécies, as quais apresentaram diferentes tonalidades coloração rósea. O grande mérito desse agar é permitir a diferenciação visual de espécies distintas em uma mesma cultura. Desse modo, para amostras biológicas, ditas "contaminadas", como fezes, constitui-se em uma boa metodologia. Entretanto, a confirmação da pureza de uma colônia deve ser comprovada microscopicamente.

A capacidade de distinguir espécies do gênero *Candida* é interessante, visto a frequência variável de culturas mistas a partir de fezes. A distribuição de diferentes espécies nesse material, depende de várias condições, inclusive geográficas.

Como era esperado, foram identificados espécies e gêneros diversos nas amostras isoladas de fezes das 66 crianças analisadas na presente dissertação. MURAHOVSKI *et al.* (1969), em nosso país, descreveu situação semelhante, encontrando: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, em 245 amostras de trato intestinal de população pediátrica menor de 2 anos.

Neste trabalho, verificou-se maior frequência (96,1%) do gênero *Candida*, em concordância com os resultados da maioria dos trabalhos revisados, como o de KLINGSPOR *et al.* (1993) que avaliaram 119 crianças e verificaram que *Candida sp* foi prevalente (32 %).

Dentro desse gênero, a espécie *Candida tropicalis* foi, neste trabalho, a mais frequente (32,7%). *C. albicans* foi identificada em 29,9% das amostras, situando-se em segundo lugar. Do mesmo modo, no trabalho de SHOME *et al.* (1976) a frequência de *C. tropicalis* foi superior à de *C. albicans* em fezes de crianças menores de um ano, bem como, KLINGSPOR *et al.* (1993) que isolaram *C. albicans* em menor frequência (18,8 %) do que *C. tropicalis*.

Em estudo semelhante ao desta dissertação, ENWEANI *et al.* (1994) com resultados distintos, avaliaram fezes de 165 crianças hospitalizadas (zero a 10 anos) concluindo que a espécie mais frequente era, *C. albicans* (62,4 %). Para PAPPU-KATIKANENI *et al.* (1990) *C. albicans* foi também a mais frequente, fato observado anteriormente, em nosso país, por CANDIDO (1987) em população

infantil, portadora dessa espécie em taxa de 40%. Em outras regiões, PONNUVEL *et al.* (1996) e FORBES *et al.* (2002) identificaram também *C.albicans* em amostras fecais da maioria das crianças estudadas, respectivamente, 84 casos de 175 (48 %) e 61 de 174 (35 %) crianças colonizadas por leveduras.

Em população geral, TALWAR *et al.* (1990) analisaram 468 casos com leveduras no trato intestinal, dos quais, 75 % eram crianças e 25 % adultos, verificando as espécies predominantes: *C. albicans* (64,5 %), *C. tropicalis* (23,3%), *C. krusei* (6,8 %) e *C. glabrata* (1,6 %).

Para GRACEY *et al.* (1974) que observaram a predominância de *C.tropicalis* em amostras fecais, o achado deve-se ao estado de má nutrição da população pediátrica, afirmando que *C. albicans* é pouco freqüente em grupos bem nutridos, assim como *C. parapsilosis*. Esta hipótese não pode ser comprovada nesta dissertação, desde que não foram compilados dados clínicos das 66 crianças, das quais foram avaliadas as amostras.

C.parapsilosis (27,1%) foi a terceira espécie em prevalência, seguida de *C.krusei* (3,6%), *C.guilliermondii* (2,1%), *C.glabrata* (0,4%) e *C.kefyr* (0,4%). No trabalho com crianças hospitalizadas de ENWAEANI *et al.*(1994), entre as espécies de *Candida* não-albicans (*C.tropicalis*=32,5%; *C.glabrata*,=9,2%; *C.parapsilosis*= 5,5 %) foram encontradas também *C. kefyr* (5,3 %). *C.kefyr* tem importância clínica, entre outras, como agente de candidemia, como relatado em um paciente da série de 41 casos, estudada por BREGENZER *et al.* (1996). FARINA *et al.* (1999) que descreveram em 168 casos, adultos e pediátricos, quadros de candidemia, verificaram taxa de mortalidade de 50,6% e observaram que este índice estava associado, principalmente à infecção de corrente sanguínea por *Candida kefyr*, ou devido à *Cryptococcus neoformans* ou *Fusarium* spp, alertando para a virulência desses agentes.

PONNUVEL *et al.* (1996) encontraram espécies distintas, em fezes de 175 casos além de *C.albicans*, a saber: *C.tropicalis* (10,9 %), *C.krusei* (12,6 %), *C.parapsilosis* (4,6 %) e *C.guilliermondii* (1,7 %). No Brasil, CANDIDO (1987) também isolou *C.tropicalis* (12,9%), *C.parapsilosis* (2,9%) e *C. krusei* (1,4 %) a partir de amostras fecais.

Espécies de leveduras do gênero *Candida* e outros gêneros, juntos com outros microrganismos, podem ser colonizantes de mucosas, pele, trato digestivo, de modo transitório ou durante longos períodos, mas, quando presentes em

diferentes sítios e cultivadas repetidamente, do mesmo tipo de amostra biológica, pode indicar alteração da microbiota. O desenvolvimento demasiado de *Candida* sp, nestes sítios de colonização, pode facilitar sua invasão no tecido, somado à condição predisponente do hospedeiro. A colonização prévia endotraqueal por *Candida* sp, por exemplo, é fator de risco para candidíase sistêmica, conforme documentou ROWEN *et al.* (1994).

No entanto, o trato gastrointestinal talvez seja a mais importante fonte de colonização, a qual pode anteceder quadro de fungemia, por alterações da microbiota residente, entre outros fatores (SOLOMKIN *et al.*, 1996). A pressão seletiva do uso de antibacterianos pode proporcionar um aumento significativo de leveduras do trato intestinal que, em pacientes suscetíveis, predispõe à infecção de corrente sanguínea. Este fato foi descrito por STILL *et al.* (1995) em série de 233 amostras de leveduras isoladas de sangue de pacientes recém nascidos hospitalizados, com significantes níveis de imunodepressão devido a neoplasias, uso prolongado de antibióticos e AIDS no período de três anos.

As conclusões do trabalho de BREGENZER *et al.* (1996) realçam o papel, como foco inicial para candidemia, do trato intestinal, em estudo de 13 casos. Essa fonte, foi considerada a mais relevante quando comparada com: cateter, trato urinário, trato respiratório e uso endovenoso de drogas.

RODERO *et al.* (1997) concordam que, nas candidiases, a infecção inicia-se por um agente comensal endógeno que se converte em patógeno frente a um hospedeiro imunocomprometido. O autor considera ainda que o microrganismo mais freqüente destas infecções é *Candida albicans*, especialmente, devido ao fato desta ser a espécie predominante no trato gastrointestinal. VERDUY *et al.* (1999), também consideraram que a espécie *C. albicans* é a mais freqüente, desde que é responsável pela colonização intestinal de 80% dos pacientes hospitalizados. Realçam que essa ocorrência representa também um fator de risco exógeno para candidemia a partir de fonte de transmissão como mãos do pessoal do hospital e cateter para nutrição parenteral, contaminados com leveduras.

Candida tropicalis, por sua vez, tem maior potencial de invadir tecidos de pacientes hematológicos e receptores de medula. MENEZES *et al.* (2001) verificam que *C. tropicalis* tem capacidade em produzir fosfolipase, quando analisaram 26 amostras de leveduras isoladas de mucosa bucal, de pacientes

diabéticos. Concluíram que 67% destas apresentaram alto grau de virulência. Esta espécie tem grande habilidade em causar infecção endógena, havendo relatos de taxas de candidemia, entre 50 % e 60 % de pacientes previamente colonizados. Em casos lesão na mucosa intestinal, o risco é torna-se maior (PFALLER, 1996). A transformação de estado saprofitico para infeccioso pode ocorrer nos primeiros dias de hospitalização, e por isso, a importância do diagnóstico rápido e acurado da colonização em pacientes de risco. O tempo de colonização de *Candida tropicalis* depende, em grande parte, do uso de corticosteróide, ao contrário de *Candida albicans* que tem maior facilidade de permanecer por períodos de mais de 30 dias independente deste fator (REPENTIGNY *et al.*, 1992).

De outro modo, *Candida parapsilosis* é mais freqüente como comensal de pele e comumente, isolada de população infantil. A infecção causada por essa espécie está relacionada a uso prolongado de cateter ou sonda para alimentação parenteral que expõe o paciente continuamente, a fontes exógenas de infecção. A taxa de letalidade da candidemia é relativamente menor, em relação às outras espécies, chegando no maximo 30% (FORBES *et al.*; 2000).

A epidemiologia das infecções por *Candida glabrata* e *Candida krusei* é completamente diferente das demais espécies. Seu início ocorre principalmente, após uso profilático com antifúngicos, por ex. fluconazol, em pacientes hematológicos e não está fortemente associado ao uso de cateter e antibioticoterapia prévia. *Candida krusei* apresenta a maior taxa de letalidade seguida pela *Candida glabrata*, apesar de ser a espécie menos virulenta para animais de experimentação. A letalidade deve ser, provavelmente, pelo fenótipo resistente dessas espécies, pois *Candida krusei* é intrinsecamente resistente a fluconazol e *Candida glabrata* pode adquirir resistência, ao longo da exposição a esta droga (PFALLER, 1996).

Além do gênero *Candida sp*, neste trabalho, o gênero *Trichosporon* foi identificado em 3,2% das amostras, tendo sido encontradas a espécies *T. asahii* (n=2) e *T. cutaneum* (n=7). CANDIDO (1987) também encontrou *Trichosporon cutaneum* (*T. asahii*) e FORBES *et al.* (2000) isolaram *Trichosporon beigellii* (*T. asahii*), ambos de fezes de crianças. No entanto, no trabalho de TALWAR *et al.* (1990) o gênero *Trichosporon* foi isolado somente de adultos (2,3 %) e em nenhuma das 640 amostras de crianças.

O gênero *Trichosporon*, em particular *T. asahii* (ex: *T.beigelii*) que é a espécie mais associada à doença em humanos, pode causar infecção sistêmica grave, sob as formas: cutânea peritonite ou endocardite, esta última relacionada ao uso de cateter para diálise. Esta espécie tornou-se um importante agente patógeno em doentes severamente imunodeprimidos desde que foi demonstrada sua resistência *in vitro* à anfotericina B (WALSH *et al.* 1990). *Trichosporon asahii* foi o agente em 1,8% dos casos de fungemia em uma série de 10 anos, estudada na Itália, por FARINA *et al.* (1999).

Nesta dissertação, foram isoladas duas amostras de *Rhodotorula*, sendo *R.mucilaginosa* e *R.glutinis*. *Rhodotorula* sp, saprófita de água, ar, solo e laticínios podem ser agente causal de fungemia em pacientes sob uso de cateter intravenoso, e seu isolamento é a partir do sangue retido no cateter. Esse gênero está amplamente distribuído no ambiente hospitalar, desde que, contamina mãos, pele e secreção do trato respiratório; porém é pouco virulento com taxa de letalidade baixa (CANDIDO, 1987).

Segundo GOLDANI *et al.* (1995) *Rhodotorula* é um gênero que pode ser encontrado em fezes, e urina e pode ser agente de vários quadros infecciosos como; septicemias, endocardites, meningites, peritonites etc. Entre as oito espécies conhecidas, consideram *R.mucilaginosa* (*R.rubra*) a mais comumente, envolvida em infecções humanas. Infecções humanas por essa espécie estão associadas ao uso de cateteres intravenosos, pacientes com doenças renais crônicas ou portadores de tumores sólidos e ainda, casos graves de imunossupressão.

HSUEH *et al.* (2003) verificaram infecção de corrente sanguínea por *R.glutinis* em paciente com carcinoma nasofaríngeo relacionado ao uso de cateter venoso, fato comprovado por tipagem molecular das cepas isoladas do caso e da fonte de contaminação. Em nosso país, CANDIDO (1987) pode verificar ocorrência de outra espécie: *Rhodotorula pilimanae* além de *R. rubra* (*R.mucilaginosa*) em fezes humanas. Outras espécies emergentes, em microbiota ou como agentes de infecção, foram anteriormente, encontradas por CANDIDO (1987) que isolou *Saccharomyces cerevisiae*, *Schwanniomyces occidentalis* e *Geotrichum candidum* de amostras fecais. A autora pode ainda, identificar *C.lusitaniae* (1,4 %), espécie de grande importância na clínica médica, não pela

morbidade, mas por sua capacidade de resistência à droga de primeira escolha, para tratamento de infecções graves por fungos, a anfotericina B.

Espécies consideradas como saprófitas, estão sendo, pouco a pouco, descritas como patógenas oportunistas. Desse modo, agentes de fungemia, tais como: *Pichia anomala*, *Torulopsis inconspícua* e *Candida haemulonii*, estão descritas na literatura, inclusive por autores nacionais (MEIRA *et al.*, 1999; ARAGÃO *et al.*, 2001).

A associação de leveduras com outros quadros clínicos, além de candidemia, como, por exemplo, presença de diarreia, não está muita clara nos estudos publicados. O trabalho de ENWEANI *et al.* (1994) associou a alta percentagem de *C. albicans* isolada de pacientes diarreicos como possível causa desse quadro, dado não confirmado por PONNUVEL *et al.* (1996) que observaram maior frequência de *C. tropicalis* em crianças diarreicas.

A relevância de analisar a correlação entre a presença de leveduras e fezes diarreicas (31,8 %) no presente trabalho, deve-se ao fato desse tipo de amostra, e em consistência líquida, proveniente de crianças, especialmente menores de 2 anos, pode constituir uma grande fonte potencial de dispersão de leveduras em ambiente nosocomial. Se no material diarreico foram encontradas leveduras resistentes a antifúngicos, o risco torna-se mais preocupante, sob ponto de vista de controle de infecção hospitalar.

Candida sp, em particular *C. tropicalis*, a espécie mais prevalente neste trabalho, tem grande capacidade de filamentação, mas, *C. albicans* a supera, neste aspecto e por isso, apresenta maior patogenicidade em indivíduos de risco CANTÓN *et al.* (2001). De fato, a filamentação está relacionada à virulência do gênero *Candida* spp (LENGELER *et al.*, 2000). Entretanto, KORTING *et al.* (2003) demonstraram que, para provocar um quadro infeccioso, existe uma regulação combinada de diferentes fatores de virulência, tais como dimorfismo e produção de proteinases, em *C. albicans*. A capacidade de adesão, outra propriedade bem desenvolvida em *C. albicans*, é também um fator importante nessa dinâmica, sendo maior nesta espécie do que em *C. tropicalis* ou *C. glabrata* e favorecida pela formação de tubo germinativo que tem importante papel nesse processo (NIKAWA *et al.*, 2003).

A análise de produção de exoenzimas permitiu verificar atividade enzimática na maioria das 84 amostras de *C. albicans*, sendo 96% de fosfolipase e 95% de

proteínase. Entre as espécies não-*albicans* do gênero *Candida* foi verificada atividade em 97% de fosfolipase e 67% de proteínaase entre as 60 amostras analisadas. O estudo foi importante para avaliar o potencial virulento das cepas presentes em fezes. CHAKRABARTI *et al.* (1991) estudaram produção de proteínaase em amostras de leveduras e classificaram por local de origem e significância clínica. Encontraram diferença significativa entre as taxas de produção nas cepas com significância clínica e sem significância, enfatizando o papel dessa enzima na patogênese da infecção. Em 14 amostras de *C.albicans*, isoladas de fezes, verificaram taxa de 77,8% no primeiro grupo e de 10,5% no segundo grupo. A mesma observação ocorreu para os resultados com outras espécies não-*albicans*. A importância das proteínas foi demonstrada também para infecções por *Candida albicans* em outros sítios topográficos, tais como epitélio vaginal e mucosa oral (OLLERT, 1995; SCHALLER *et al.*, 2003).

KANTARCIOGLU *et al.* (2002) determinaram a capacidade de produção de exoenzimas em 95 amostras, incluindo várias espécies não-*C. albicans*. Neste grupo, verificaram 62,1% de atividade de fosfolipase e 78,9% de proteínaase, enquanto para *C.albicans* 93,3% mostraram capacidade de fosfolipase e 95% de proteínaase. Algumas amostras de *C.glabrata* mostraram o mesmo perfil de *C.albicans* quanto à fosfolipase e *C.kefyr* mostrou produção para ambas as exoenzimas, sendo em algumas cepas, semelhante à de *C.albicans*.

As espécies emergentes, tanto quanto as não emergentes, têm habilidade em produzir enzimas hidrolíticas, considerado importante fator de patogenicidade. As principais enzimas de virulência, produzidas por leveduras do gênero *Candida*, são as proteínas que hidrolisam ligações peptídicas, e as fosfolipases que hidrolisam fosfolípidos.

Os trabalhos que avaliaram capacidade de produção de exoenzimas em leveduras de origem intestinal são raros, porém KRAUSE *et al.* (2001) verificaram que todas as amostras de *C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*, *C.glabrata* e *C.krusei*, isoladas de fezes, mostraram atividade proteolítica. SILVA *et al.* (1999) estudaram a produção de fosfolipase e proteínaase em amostras de *Candida albicans* isoladas de pacientes com candidose bucal e em indivíduos controle sem doença. A produção de fosfolipase e proteínaase foi maior no grupo com candidose, em relação ao grupo controle.

CANDIDO *et al.* (2001) avaliaram, quanto à produção dessas exoenzimas, 34 amostras de leveduras do gênero *Candida*, isoladas da cavidade bucal de pacientes com lesões características de candidose. As espécies envolvidas foram: *Candida albicans* (24), *C.tropicalis* (5), *C.glabrata* (3), *C.parapsilosis* (1) e outras *Candida spp* (1). Concluíram que *Candida albicans* apresentou maior atividade enzimática, fosfolipase e proteinase, em relação às outras espécies estudadas. No presente trabalho, de outro modo, apenas 51% de *C.albicans* foi altamente produtora de fosfolipase, enquanto 97% das outras espécies apresentaram essa atividade. Para proteinase, porém, a espécie que mostrou maior porcentagem de amostras fortemente produtoras foi *C.albicans* (45%), quando comparada às outras espécies (25%).

MATSUMOTO *et al* (2001) estudaram a produção de proteinase e fosfolipase de 80 amostras de leveduras do gênero *Candida*, isoladas de 59 culturas de sangue e 21 culturas de cateter intravascular de crianças hospitalizadas. As espécies envolvidas foram: *Candida parapsilosis* (35.0%), *C.albicans* (20,0%), *C.tropicalis* (13,75%), *C.glabrata* (13,75), *C.guilliermondii* (8,75%) e *C.krusei* (2,5%). Ao contrário do encontrado na presente dissertação, os autores concluíram que em todas as espécies de *Candida spp* houve forte atividade de proteinase e baixa atividade de fosfolipase e que apenas 3% de espécies não-*albicans* e 4% de *C.albicans* não foram capazes de mostrar atividade fosfolipásica, nas condições do experimento. Para proteinase, a ausência de produção foi verificada para 20 (33%) amostras de espécies não-*albicans*, mas em apenas 4 (5%) de *C.albicans*.

Desse modo, os resultados encontrados alertam para o potencial de virulência do grupo de 144 amostras avaliadas quanto à produção de exoenzimas, desde que fosfolipase tem importante papel na invasão e destruição de membrana celular hospedeira e proteinases são responsáveis pela capacidade de acidificação de tecidos (KANTARCIOGLU *et al*; 2002). Desta forma há grande importância em determinar a atividade da proteinase e fosfolipase em leveduras do gênero *Candida*.

DOSTAL *et al.* (2003) verificou, por método alternativo com hemoglobina adicionada ao agar, a produção de proteinase em todas as 48 cepas estudadas de *C.tropicalis*, isoladas de diversos sítios topográficos.

Rhodotorula rubra, conforme relatou MAYSER *et al.* (1996) pode superar a capacidade de *C.albicans* na produção de proteinase. Desde que este gênero é raramente agente de doença em humanos e animais, não apresenta capacidade de filamentação, cresce pobremente a 37°C e tem baixa capacidade de aderência, a produção dessa exoenzima deve ter importância fundamental para sua virulência.

OLLERT *et al.* (1995) verificaram correlação positiva entre atividade de proteinase e resistência a antifúngicos. Em pacientes HIV positivos, amostras de *C.albicans* causadoras de candidíase bucal e com alta produção dessa enzima foram menos sensíveis aos antifúngicos azólicos. Porém, os autores relatam que são necessários outros estudos que comprovem esse achado.

Desde há décadas, investigadores dedicam-se ao estudo da sensibilidade de amostras de leveduras aos antifúngicos (TOALA *et al.*, 1970), seja por método de diluição ou difusão. Na literatura consultada não foram encontrados estudos sobre sensibilidade a antifúngicos de leveduras isoladas de fezes por método de difusão por disco e, por isso, os dados deste trabalho serão comparados com os autores que utilizaram a metodologia para cepas isoladas de outros tipos de amostras biológicas, tais como: sangue, urina, cavidade bucal, secreção do trato respiratório e genital.

Os maiores estudos internacionais sobre a sensibilidade de amostras de leveduras causadoras de fungemia, são trabalhos de PFALLER *et al.* Dos quais 2 publicados no mesmo ano (1998) e PFALLER *et al.*, 2000. Os autores encontraram maior índice de resistência aos azóis em *Candida* não-*albicans*. No primeiro estudo relataram resistência ao fluconazol (8,7%) e itraconazol (36,7%) entre as 46 amostras de *C.glabrata*. Todas as 6 amostras de *C.krusei* foram resistentes ao fluconazol, e 66,6% ao itraconazol. Por outro lado, *C.albicans* foi altamente (>99%) sensível aos azóis. Nos estudos seguintes, chegaram às mesmas conclusões, mas, notaram que as cepas da América Latina e Canadá eram, em geral, mais sensíveis aos azóis, em relação às cepas norte-americanas.

A determinação do perfil de sensibilidade das 281 amostras analisadas neste trabalho permitiu verificar que todas, independentes do gênero e espécie, foram sensíveis á anfotericina B, cetoconazol e nistatina, pelo método de difusão por disco. Resistência a anfotericina B é, dificilmente, demonstrada *in vitro* e do mesmo modo, são raros os casos descritos de associação com resistência *in vivo*

(CONLY *et al.* 1990; McClenny *et al.* 2002; RODERO *et al.* 2002; NGUYEN *et al.* 1998; HOPFER, 1992; JAKAB *et al.*, 1990; NOLTE *et al.* 1997). Os experimentos com resultados de resistência de leveduras à anfo B referem-se a *Candida lusitanae* e *Trichosporon sp*, porém mesmo para este gênero, existem relatos de falta de correlação clínico-laboratorial, com cepa sensível isolada de paciente com falha terapêutica (WALSH *et al.*, 1990). De modo contrário, para outras drogas como cetoconazol, desde 1980 é relatada ocorrência de amostras resistentes de *C.albicans*. Posteriormente, cepas de *C.rugosa* foram descritas como de menor sensibilidade, espécie não encontrada neste estudo (DUBÉ *et al.*, 1994).

Os testes de sensibilidade feitos no método de triagem por difusão em disco e confirmados pelo de referência europeu, EUCAST (**Quadro 1**), mostraram que para FZ houve 5 amostras resistentes (CIM ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$) incluindo *C.krusei* (n=2), *C.parapsilosis* (n=1) e *C.tropicalis* (n=2). Dez amostras SDD (CIM = 16 $\mu\text{g/mL}$ ou 32 $\mu\text{g/mL}$) foram verificadas, sendo: *R.mucilaginosa* (n=1), *C.tropicalis* (n=2) e *C.krusei* (n=7) .

Para IZ os resultados, obtidos indicaram a existência de 4 amostras resistente (CIM ≥ 1 $\mu\text{g/mL}$) de *C.tropicalis* (n=2) e *C.parapsilosis* (n=2) e 14 amostras SDD (CIM = 0,25 $\mu\text{g/mL}$ ou 0,5 $\mu\text{g/mL}$), incluindo: *C.parapsilosis* (n=2), *C.tropicalis* (n=4) e *C.krusei* (n=8).

Em 15 amostras resistentes a IZ, observou-se que houve resistência cruzada com FZ, ou seja, todos os fenótipos resistentes para FZ eram também resistentes para IZ. De modo contrário, nem todos os fenótipos resistentes para IZ eram para FZ. Esse fenômeno foi bem estudado por MARTINEZ-SUAREZ & RODRIGUEZ - TUDELA (1995), no estudo concluíram que 101 amostras resistentes a várias drogas azólicas eram sempre primariamente, resistentes a FZ.

RODERO *et al.* (1997), de modo similar demonstram cepas de sangue resistente em 09 pacientes pediátrico hospitalizados, com media de idade de 2 anos. As cepas foram submetidas ao micrométodo em meio líquido, com base no método M27P, publicado pelo NCCLS (1992). As espécies envolvidas foram: *Candida albicans* (49,3%), *C.parapsilosis* (28,2%), *C.tropicalis* (17,7%), *Trichosporon spp*, *C.krusei*, *C.glabrata*, *C.guilliermondii*, *Pichia anomala* e *Malassezia furfur* (4,8%). Ao teste de sensibilidade, 24% dos pacientes estudados apresentaram cepas resistentes a fluconazol e 17% destas, também resistentes a

itraconazol. Concluíram que a alta percentagem de resistência a itraconazol deve-se a exposição dos pacientes a este antifúngico que ocasionou reação cruzada com fluconazol, visto que ambos são drogas triazólicas.

O fenômeno de resistência cruzada entre FZ e os outros azóis, que não IZ, ainda carece de maiores estudos e não há consenso sobre a hipótese de ser uma regra geral (MARTINEZ-SUAREZ & RODRIGUEZ - TUDELA).

No Brasil, COLOMBO *et al.* (2002) analisando sensibilidade a FZ de 1784 leveduras, diferindo dos achados da presente dissertação, encontraram maior sensibilidade em *C.parapsilosis* (99 %), seguida de *C.tropicalis* (97,8 %), *C.albicans* (96%), *C.guilliermondii* (95,6%) e *C.glabrata* (84%), não encontrando nenhuma amostra de *C.krusei* sensível. Os discos usados pelos autores foram obtidos de Becton Dickinson, Sparks, MD, (USA).

Resultados semelhantes aos encontrados nesse trabalho, para *C.albicans*, *C.parapsilosis* e *C.tropicalis* foram relatados por MEIS *et al.* (2000). Os autores analisaram sensibilidade a FZ (discos AB BIODISK, Suécia) de 20.900 cepas de *Candida sp*, isoladas em 26 países de diversas partes do mundo, incluindo 90 do Brasil. Verificaram 98% de cepas sensíveis em *Candida albicans*, 94% em *C.parapsilosis*, 90% em *C.tropicalis*, 81,5% em *C.guilliermondii*, 67,1% em *C.glabrata* e 26,2 % em amostras de *C. krusei*.

Os resultados deste trabalho indicam que 2,6% das amostras de *C.parapsilosis* apresentaram baixa sensibilidade sendo apenas 1/de76 (1,3%), identificada como resistente ao FZ. Portanto a grande maioria dessa espécie foi sensível a este azol (97,4%). Essa cepa e outra foram resistentes ao IZ (CIM=1,0 ug/mL e 2 ug/mL). Duas outras cepas foram SDD para IZ (2, %), totalizando 4% de cepas com baixa sensibilidade ao itraconazol.

Em relação ao encontro de 1 cepa de *C.krusei* sensível ao FZ não seria esperado encontrá-la, pois, esta espécie é intrinsecamente, resistente ao FZ (CUENCA - ESTRELA & RODRIGUEZ - TUDELA, 2002; BARRY & BROWN, 1996). Porém, estes achados confirmam os encontrados por MEIS *et al.* (2000) que também observaram resultados “in vitro” de CIM abaixo do considerado para cepas resistentes.

Neste trabalho, dentre as 10 amostras de *C.krusei*, isoladas e identificadas como resistentes pelo método de disco, 9 (90%) de fato tiveram seu perfil de resistência confirmado no teste padrão, indicando o mérito do teste de triagem.

Alerta esta taxa, para o perigo de dispersão de leveduras resistentes, existentes no conteúdo intestinal de população pediátrica internada, no meio ambiente hospitalar.

C.tropicalis foi identificada em 92 amostras, sendo 2 consideradas R (CIM $\geq$ 64 ug/mL), e outra classificada como SDD para fluconazol. Duas dessas amostras foram confirmadas como sendo altamente, resistentes ao IZ (CIM=2 ug/mL) e duas outras SDD para este azol.

C. albicans, a mais ubíqua das leveduras pode ser resistente a fluconazol, com vários mecanismos diversos de resistência (PEREA *et al.*, 2001). Os resultados encontrados confirmam os achados de literatura, que confirmam que a espécie *C.albicans* que é a mais sensível aos antifúngicos, não sendo encontrada nenhuma cepa resistente ou SDD, pelo método de referência. Neste caso, o método de disco forneceu um resultado falso visto que indicou 2 (2,4%) amostras resistentes entre as 84 cepas isoladas. Segundo o método do disco, uma das amostras era multiresistente aos triazóis FZ e IZ e outra apenas ao FZ, dado não confirmado pelo método-padrão.

O papel de *C.glabrata* como importante patógeno, com reconhecida resistência adquirida a fluconazol, associado a candidemia em população pediátrica, mais do que em população de adulto, vem reforçar a necessidade da identificação dessa espécie em amostra biológica (PFALLER & DIEKEMA, 2002). Entre as espécies não-*albicans*, a única amostra de *C.glabrata* isolada neste trabalho, foi sensível a todos os antifúngicos, identificados, mas, de modo incorreto, foi classificada como tendo sensibilidade intermediária no método de disco, ao fluconazol.

Quanto aos outros gêneros identificados neste trabalho, apenas uma amostra de *Rhodotorula mucilaginosa* mostrou-se SDD ao FZ, não o sendo para itraconazol. O método de disco foi eficaz para detectar a resistência desta amostra ao FZ, mas falhou ao indicar falsa resistência ao IZ na mesma amostra. Não foram encontrados, segundo literatura consultada, estudos com este gênero, pela metodologia usada nesta dissertação.

Em relação ao gênero *Trichosporon*, o teste com FZ frente à uma amostra de *T.cutaneum* resultou em CIM de 8 μ g/mL, que é o valor limite para enquadrar uma cepa como sensível. Talvez esse *breakpoint*, deva ser diferente para outros gêneros de leveduras que não *Candida* spp. A carência de estudos

clínicos que possam avaliar os valores de CIM e a evolução clínica de casos infectados com *Trichosporon* não permite que se conclua, em definitivo, que essa amostra seja mesmo sensível. No método de disco ela foi classificada como intermediária para fluconazol e itraconazol. Para IZ os resultados dos 2 métodos foram discordantes, sendo que a amostra foi considerada sensível a este triazol, no teste confirmatório.

O estudo da sensibilidade é de grande interesse, sabendo-se que todas essas espécies sejam emergentes ou não, são potenciais agentes de candidemia que é a infecção fúngica prevalente em pacientes hospitalizados e está associada à alta letalidade.

A análise dos resultados de sensibilidade a antifúngicos, obtidos com o método de difusão por disco, corrobora os dados de outros autores que consideram-no como adequado para triagem de cepas resistentes ao FZ. De modo geral, ele indica porcentagem maior de cepas resistentes, do que se verifica no método de referência. Nesse trabalho, a concordância entre os 2 métodos foi de 62,5%; entretanto, as 12 amostras resistentes pelo método de disco e que não puderam ser submetidas à microdiluição, poderiam ter seu perfil de sensibilidade confirmado, ou não, alterando desse modo, esse índice. As 15 amostras sensíveis ao FZ, pelo método de disco, apresentaram o mesmo perfil no método de microdiluição, confirmando achados da literatura de alta eficiência do disco (100%) para indicar cepas sensíveis a fluconazol.

Para BARRY & BROWN (1996) a mesma correlação para FZ, atingiu taxa de 97 %. Porém, um método de triagem para detecção de resistência, deve preferencialmente, dar resultado falso positivo do que falso negativo, para não deixar de identificar cepas resistentes. Para BARRY & BROWN (1996) os resultados obtidos pelo método de disco com FZ para *C. albicans*, não necessitam ser confirmados no caso de cepas classificadas como sensíveis.

A avaliação do fenótipo de leveduras, quanto ao seu perfil de sensibilidade as drogas, foi realizado por metodologia que emprega discos sobre agar. Outro método bastante difundido é a difusão a partir de fitas (E-Test). Este e o método de discos impregnados com antifúngicos, segundo MATAR *et al.* (2003), vêm na atualidade gerando interesse de muitos pesquisadores, devido a sua simplicidade de execução e altos níveis de reprodutibilidade. Entretanto, esses métodos precisam ter um controle estrito de qualidade, desde que não são métodos de

referência. Desse modo, verificação periódica de seus resultados, especialmente, no que se refere a resultados de cepas com menor sensibilidade devem ser confirmados por metodologia aceita como referência.

MATAR *et al.* (2003) avaliaram leveduras, provenientes de sangue pelos métodos: Etest, difusão por discos e microdiluição e demonstraram haver reprodutibilidade entre os 3 métodos.

PFALLER *et al.* (2003) estudaram a sensibilidade a antifúngicos de 1586 amostras de *Candida* sp isoladas do sangue obtido de 61 centros hospitalares, sendo: 20 norte-americanos, 8 latino-americanos, 19 europeus, 5 africanos e 6 Asiáticos; determinado por microdiluição, difusão em disco e Etest. As espécies envolvidas foram: *Candida albicans* (916), *C. glabrata* (235), *C. parapsilosis* (198), *C. tropicalis* (150), *C. krusei* (43) e *C. lusitanae*. Concluíram que comparados os valores de CIM por microdiluição e por Etest e os valores dos halos obtidos por difusão em disco, houve reprodutibilidade entre os métodos estudados.

BARRY *et al.* (2002) publicaram uma revisão da literatura sobre a correlação entre métodos de disco (BBL, USA) e microdiluição, entre outros, pelo estudo de 495 amostras de leveduras mantidas em micoteca. Encontraram 97 % de correlação entre os resultados de cepas sensíveis, intermediárias, resistentes e SDD. Entretanto, encontraram 5 resultados falsos positivos para cepas resistentes, não confirmados pelo método de referência (microdiluição). Recomendaram uso de azul de metileno e agar Muller Hinton, além da leitura em 24 h de incubação, para melhor acurácia do teste. Concluíram que o método de disco com fluconazol é um excelente método de triagem de cepas resistentes.

Neste trabalho demonstrou-se a presença de diferentes gêneros e espécies de leveduras no trato intestinal de população pediátrica, com diferentes perfis de sensibilidade a antifúngicos e fenótipos de resistência a triazólicos. Pode - se inferir que o trato intestinal é um reservatório contendo agentes que representam risco potencial para infecção nosocomial em pacientes hospitalizados, especialmente, sob a forma de candidemia.

Conclusões

- 1) As espécies de 281 amostras de leveduras, isoladas de amostras de fezes de 66 pacientes pediátricos hospitalizados, incluíram agentes etiológicos clássicos e emergentes, a saber: *Candida tropicalis* (32,7%), *C.albicans* (29,9%), *C.parapsilosis* (27,1%), *C.krusei* (3,6%), *Trichosporon cutaneum* e *T.inkin* (3,2%), *Rhodotorula mucilaginosa* e *R.glutinis* (0,7%), *C.guilliermondii* (2,1%), *C.glabrata* (0,4%) e *C.kefyr* (0,4%).
- 2) As amostras foram sensíveis, em sua totalidade, à anfotericina B, cetoconazol e nistatina, mas fenótipos de resistência aos triazóis, fluconazol e itraconazol, foram encontrados em *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*, *C.krusei* e *Rhodotorula mucilaginosa*.
- 3) A extensa maioria das amostras foi fortemente, produtora de exoenzimas, tanto fosfolipase quanto proteinase.
- 4) Os fenótipos com baixa sensibilidade aos triazóis foram pouco freqüentes (7,1%), porém, apresentam também características de virulência e, portanto, potencial para produzir infecções endógenas ou exógenas, em população com fatores predisponentes para micoses oportunistas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AINSCOUGH, S; Kibbler, C, C. An evaluation of the cost - effectiveness of using CHROMagar for Yeast identification in a routine microbiology laboratory **J.Méd.Microbiol**, Edinburgh, v.74, p. 623 - 628, 1998.
- ALSNER, J. *Torulopsis glabrata* infections in patients with cancer increasing Incidence and relationship to colonization. **Am. J. Med**, New York, v. 61, p. 23 - 28, 1976.
- ALVES, S. H. & CURY, E. Sensibilidade de leveduras do gênero *Candida*, isoladas de pacientes com câncer , a antifúngicos polienos. **REV. INST. MÉD. Tropic** , São Paulo, v. 34, p. 251 - 4, 1992.
- AKOVA, M. Efficacy of fluconazole in the treatment of upper gastrointestinal Candidiasis in neutropenic patients with cancer: factors influencing the outcome. **Clin. Infect. Dis**, Chicago, v.18, p. 298 - 304, and 1994.
- BANDINI, G ; GUARDIGLI , R ; SANTORO , A ; CASANOVA , S ; TURA, S.Unexpected Presentation of Deep Candidiasis in a Recipiente of a Mismatched Bone Marrow Transplant. **Acta Haemtol**, Basel, v.75, p. 116 - 119, 1986.
- BALEY, E.J; KLIEGMAN, M. R ; BOXERBAUM , B ; FANAROFF , A . A . Fungal Colonization in the Low Birth Weight Infant. **Pediatrics**, Evaston, v. 78 , n . 2 , p.225-232,1986.

De acordo com a norma NBR 6023/2000 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT).As abreviações dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI) 1994 .

BARRY, L, A; BROWN, D, S. Fluconazole disk diffusion procedure for determining susceptibility of *Candida* species. **J. Clin. Microbiol**, Washigton, v.34, n.9, p. 2154 - 2157, 1996.

BARRY, L, A; PFALLER, M.A; RENNIE, R.P; FUCHS, P.C; BROWN, S.D.Precision and accuracy of fluconazole susceptibility testing by broth microdilution, Etest and disk diffusion methods. **Antimicrob. Agents. Chemother**, Washington, v.46, n.6, p. 1781 - 1784, 2002.

BELL, G.R; TURNER, K.J; GRACEY.M; SUNOTO, M.D; SUHARJONO, M.D.Serum and small intestinal immunoglobulin levels in undernourished children. **Am. J. Clin. Nutrit**, Bethesda, v. 29, p. 392 - 397, 1976.

BERNHARDT, H, KNOKE, M; Mycological Aspects of Gastrointestinal Microflora. **Scand.J.Gastroenterol**, Oxford, V.32, n. 222, p .102 - 106, 1997.

BESNARD, M; HARTMANN, O; COUANET, V.D; RBERT, M.C; BRUGIERES, L; LEMERLE, J. Systemic *Candida* infection in pediatric BM auto transplantation: clinical signs, autocom and prognosis. **Bone Marrow Transplant**, Villejuif, and v.11. P, 465 – 470, 1993.

BIASOLI, S.M; TOSELLO, E.M; MAGARÓ, M.H. Adherence of *Candida* strains isolated from the human gastrointestinal tract. **Mycoses**, Berlin, v.45, p.465-469, 2002.

BOLIVAR, R. Candidiasis of the Gastrointestinal Tract. **Raven Press**, New York; p. 181 - 202, 1985.

BROSS, J. Risk factors for nosocomial candidemia: a case control study in adults without leukemia. **Am. J. Med**, New York, v, 87, p 614 - 620, 1989.

BREGENZER, T; ECKTEIN, E; ZIMMERLI, W; FREI, R. Clinical aspects and prognosis of Candidemia, a 6-year retrospective study. **chweiz.Med. Wochenschr**, v.26, n.43, p.1829-1833, 1996.

BUTLER, M, K; BAKER, J, C. Candida : An Increasingly Important Pathogen in the Nursery. **Pediatr. Clin. North. Am**, New York, v.35, n.3, p.543-563, 1999.

CALDERONI, A. R. Candida and Candidosis. **Ed. Calderoni**. Washington, 2002.

CANTON, E; VIUDES, A; PERMÁN, J. Infection systemic nosocomial por leveduras, **Rev. Iberoam. Micol**, Bilbao, V. 18, p 51 - 55, 2001.

CANTON, E; PERMAN, E; VIUDES, A; QUINDOS, G; GOBERNADO, M; ESPINEL-INGROFF, A. Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream Candida species. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis**, New York, v. 45, n.3, p 203 - 206, 2003.

CANDIDO, R. C. Isolamento de leveduras de fezes de crianças. São Paulo 1987. [Dissertação de Mestrado-Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo]

CANDIDO, C.R, AZEVEDO, V.R; KOMESU, C.M. Enzimotipagem de espécies do gênero Cândida isolada da cavidade bucal. **Rev. Socied. Brás. Méd. Tropic**, São Paulo, v.33, n.5, p.437-442, 2000.

CHAKRABARTI, A; NAYAK, N; TALWAR, P. In vitro Proteinase Production by Candida species. **Mycopathologia**, Hague, v.114, p.163-168, 1991.

CHRETIEN J. H, Garagusi F. Current Management of Fungal **Clin. North. Is**, New York, p.675 - 87, 1982.

- COLE, T, G, HALAWA, A, A, ANAÏSSIE, J, E. The Role of the Gastrointestinal Tract in Hematogenous Candidiasis From the Laboratory to the Bedside. **Clin. Infect. Dis**, Chicago, v. 22,n. 2, p. 73 - 88, 1996.
- COLOMBO, L, A.NUCCI, M;SALOMÃO, R.High Rate of Non-albicans Candidemia in Brazilian Tertiary Care Hospitals, **Diagn. Microbiol.Infec. Dis**, New York, V. 34, p. 281 - 286, 1999.
- COLOMBO, A.L; BRANCHINI, L.M.M; GEIGER, D; SCHIMIDT, A.L; PIGNATARI, A.C; FISCHMAN, O. Gastrointestinal Translocations a possible Source of Candidemia In An AIDS Patient. **Rev.Inst.Medic.Tropic. São Paulo**, v. 38, p 197 - 200, 1996.
- COLOMBO, A.L; BRANCHINI, L.M.M; GEIGER, D; FISCHMAN, O; Fluconazole susceptibility of Brazilian Candida isolates assessed by a disk diffusion method, **Braz. J. Infec.Dis**, Salvador, v.6, n. 3, p. 118 - 123, 2002.
- CONLY , J ; RENNIE , R ; JONHOSON , J ; FARAH , S ; HELLMAN , L . Disseminated Candidiasis Due to Amphotericina B-Resistant *Candida albicans*.**J.Infect.Dis**,Chicago,v.165,p.761-763,1992.
- CUENCA, E, M; TUDELA, R, L, J. Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos em los estudios de sensibilidad?, **Rev. Iberoam. Micol**, Bilbal, v.19, p. 133 - 138, 2002.
- CUENCA, E, M; TUDELA, R, L, J. Present status of the detection of antifungal resistance: the perspective from both sides of the ocean. **Clin.Microbiol. Infec**, Oxford, v.7, n. 2, p. 46 - 53, 2001.

DANNA, L.P; URBAN, C; BERLLIN, E; RAHAL, J.J. Role of *Candida* in pathogenesis of antibiotic - associated diarrhoea in elderly inpatients, **Lancet**, London, v. 337, p. 511 - 514, 1991.

DUBÉ, M, P; HESELTINI, P.N; RINALD, M.G; EVANS, S; ZAWACKI, B. Fungemia and Colonization with nystatin - resistant *Candida rugosa* in a burn unit. **Clin. Infect. Dis**, Chicago, v. 18, n.1, p. 77 - 82, 1994.

DOSTÁL, J; HAMAL, P; PAVLICKOVÁ, L; SOUCEK, M; RUMIL, T; PICHOVA, I. Simple Method for Screening *Candida* Species Isolates for the Presence of Secreted Proteinases: a Tool for the Prediction of Successful Inhibitory Treatment. **J.Clin.Infect.Microbiol**, Washington, v.41, n.2, p.712-716, 2003.

ENWEANI, IB, JOKPEYBO, M. Prevalence of *Candida* Species in Nigerian Children with Diarrhoea, **J. Diarrhoeal. Dis. Res**, Dhaka, v. 12, n. 2, p. 133 - 135, 1994.

FARINA, C; VAILATI, F; MANISCO, A; GOGGIO, A. Fungemia survey: a 10-year experience in Bergamo, Italy. **Mycoses**, Berlin, v.42, p.543-548, 1999.

FORBES, L; PESCI, P.C; WARD, P. B. Faecal candida and Diarrhoea. **Arc. Dis. Child**, Perth, v. 84, p 328 - 331, 2001.

GELFAND, S.M. *Candida tropicalis*. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol**, Memphis, v. 10, n. 6, p. 280 - 282, 1989.

GOLDANI, Z, L; CRAVEN, E.D; SUGAR, M.A. Central venous catheter infection with *Rhodotorula minuta* in patient with AIDS taking suppressive doses of fluconazole. **J.Medic.Veter.Micol**, Oxford, v.33, p.267-270, 1995

GRACEY, M; DELYS, B; STONE, E; SUHARJONO, M.D; SUNOTO, M.D. Isolation of *Candida* species from the gastrointestinal tract in malnourished children. **Am. J. Clin. Nitric**, Bethesda, v. 27, p. 345 - 349, 1974.

GUPTA, P.T; EHRIN, P.T; EHRINPREIS, N.M. *Candida* Associated Diarrhea in Hospitalized Patients. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 98, p. 780 - 785, 1990.

HSUESH, R, P; TENG, J, L; HO, W.S; LUH, T.K. Catheter-Related Sepsis Due *Rhodotorula glutinis*. **J.Clin.Microbiol**, Washington, v.41, n.2, p.857-859, 2003.

HOPFER, L, R. Amphotericin B- Resistant *Candida albicans*. **J.Infect.Dis**, Chicago, v.166, p.1196-1197,1992.

JAKAB, K; KELEMEN, E; PRINZ,G;TOROK,I. Amphotericin-resistant invasive hepatosplenic Candidiasis controlled by fluconazole. **Lancet**, London, v.335, p.473-474, 1990.

KARABINIS, A. Risk factors for candidemia in cancer patients: a case - control study. **J.Clin. Microbiol**, Washington, v. 26, p. 429 - 432, 1988.

KANTARCIOGLU, S.A; YUCEL, A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains, **Mycoses**, Berlin, v.45, p.160-165, 2002.

KLINGSPOR, L; STITZING, G; JOHANSEN, K; MURTAZA, A; HOLMBERG, K. Infantile diarrhoea and malnutrition associated with *Candida* in a developing community. **Mycoses**, Berlin, v. 36, p. 19 - 24, 1993.

KIRBY,A,W,B; SHERRIS,J,C; TURK,M. Antibiotic Susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am.J.Clin.Path**, Baltimore, v.45, p.493-6, 1996.

KOGA-ITO, C; RESENDE, M. A; NASCIMENTO, L.V; ANDREATA, L.S; VIDOTTO, V. Fatores de virulência em amostras de *Candida albicans* isoladas de pacientes com candidose bucal e indivíduos controle. **III Congresso Brasileiro de Micologia**, Águas de Lindóia, São Paulo, Agosto, 2001.

KOZINN, P.J; TASCHDJIAN, C.L. Enteric candidiasis. Diagnosis and clinical Considerations. **Pediatrics**, Evaston, v. 30, p. 71 - 85, 1962.

KORTING, H; BERNHARD, H; OBERBAUER, S; JANUSCHKE, E; HAMM, G; ALBRECHT, A; BORELLI, C; SCHALLER, M. Reduced Expression of the hyfhal-indepemdent *Candida albicans* proteinase genes SAP 1 and SAP3 in the efg1 mutant is associated with attenuated virulence during infection of oral epithelium. **J. Med. Microbiol**, New York, v. 52, p. 623-632, 2003.

KRAUSE, R; SCHWAB, E; BACHHIESL, D; DAXBOCK, F; WENISCH, C; KREJS, J.G; REISINGER, C.E. Role of Candida in Antibiotic-Associated Diarrhea. **J. Infect. Dis**, Chicago, v. 184, p. 1065-1069, 2001.

KURTZMAN, C, P; FELL. J. W. **The Yeasts A Taxonomic Study**, 40ª Editions, 1998.

LACAZ, S, C; PORTO, E; VACARRI, H, E; MELO, T, N. **Guia para Identificação: Fungos, Actinomicetos, Algas de Interesse Medico**. Ed. Sarvier, São Paulo, 1998.

LACAZ, S; C. **Tratado de Micologia Medica**, Ed. Sarvier, São Paulo, 2002.

LENGELER,K; DAVIDSON; SOUZA,C; HARASHIMA,T; SHEN, C.W; XUEWEN, C.W; WANG,P; WAUGH,M; HEITMAN, J. Signal Transduction Cascades Regulating Fungal development and Virulence. **Microbiol.Molec.Biol.Reviews**, v.64, n.quatro, p.746-785,2000.

McCLENNY, B, N; FEI, H; BARON, J, E; GALES, C, A; HOUSTON,A; HOLLIS,J,R; PFALLER,A,M. Change in Colony Morphology of *Candida lusitanae* in Association with development of Amphotericin B Resistance. **Antimicrobial.Agents. Chemother**, Washington, v.46, n.5, p.1325-1328, 2002.

MATA, J.L; JIMÉNEZ,F; CÓRDON,M; ROSALES,R; PRERA,R; SCHNEIDER, E.R; VITERI, F. Gastrintestinal flora of children with protein-calorie malnutrition. **Am. J. Clin. Nutrit**, Bethesda, v 25, p .118 - 1126, 1972.

MATAR, J.M; ZEICHNER, O.L; PAETZNICK, L.V; RODRIGUES, R.J; CHEN, E; REX, H.J. Correlation between E-Test, Disk Diffusion, and Micro dilution Methods for Antifungal Susceptibility Testing of Fluconazole and Voriconazole. **Antimicrobial.Agents.Chemother**, Washington, v.47, n.5, p.1647-1651, 2003.

MAFFEI, L, M. C. Amostras de *Candida albicans* isoladas de gestantes: fatores de Virulência, sensibilidade, á antifúngicos, tipagem fenotípica e genotípica. São Paulo. 1996. [Tese Doutorado-Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo].

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

MAYSER, P; LAABS, S; HEUER, U.K; GRUNDER, K. Detection of extra cellular phospholipase activity in *Candida albicans* and *Rhodotorula rubra*. **Mycopathologia**, Hague, v.135, p.149-155, 1996.

MOORE, C.B. Antifungal drug resistance in *Aspergillus*. **J. Infect.Dis**, Chicago, V. 41, p. 203 - 220, 2000.

MENDES-GIANNINI, J.M; MELHEM, C.S.M; FERREIRA, A.W; AVILA, L.M. Diagnostico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. São Paulo, 2ª Edição, ED.Guanabara-Koogan, c.33, p.334,2001.

MENEZES,K,L; FREIRE,C,C; FLORENCIO,M,R,V; CUNHA,F, A; MURTA, A, G. Frequência e Fatores de Virulência de *Candida* sp na Mucosa bucal de pacientes diabéticos do Serviço de Endocrinologia do Hospital Universitário Walter Cantidio-Fortaleza- Ceará.III **Congresso Brasileiro de Micologia**, Águas de Lindóia, São Paulo, Agosto, 2001.

MERZ, W. G. Increased incidence of fungemia caused by *Candida krusei*. **J.Clin. Microbiol**,Washington, v. 24, p. 581 - 584, 1986.

MEIS, J. A .Global evolution of the susceptibility of *Candida* species to fluconazole by disk diffusion. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis**, New York, v. 36, p. 215 - 223, 2000.

MEIRA, MCMC; MELHEM, MSC; TALARICO,C; PERIA, MMF; PUKINSKAS, SRBS; BARRETO, RL; PEREIRA. Distribuição e Perfil de Suscetibilidade a Fármacos de Ação Antifúngica em Amostras de Sangue de Infecções Hospitalares.XI **Congresso Brasileiro de Infectologia**. São Paulo, Agosto, 1999.

MURAHOVSKI, J; TRABULSI, L. R; LACAZ, C.S. Investigao sobre a prevalncia da *Candida albicans* nas fezes de crianas e sua participao na diarreia do lactente. **REV.Paul. Md.SP**, So Paulo, v. 76, p. 1 - 18, 1969.

National Committee for Clinical Laboratory Standards Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. **M27 - A National Committee for Clinical Laboratory Standards**, Vilanova, USA, 1997.

NGAN, K; KHANH, G.N; TUONG, V.C; QUY, P.P; ANH, N.D. Persistent diarrhea in Vietnamese children: a preliminary report. **Acta Pediatric**, Hani, Suppl. 381 p. 124 - 6, 1992.

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

NIKAWA, H; EGUSA, H; NISHIMURA, K; MAKIHIRA, S; ISHIDA, M; FURUKAWA, M; HAMADA, T. A novel technique to evaluate the adhesion of *Candida* species to gingival epithelial cells. **Mycoses**, Berlin, v.46, p.384- 389, 2003.

NOLTE, F; T, PARKINSON; FALCONER, J, D; DIX, S; JANIS, W; GILMORE, C; GELLER, R; WINGARD, R, J. Isolation and Characterization of Fluconazole and amphotericin B-Resistant *Candida albicans* from Blood of Two Patients with Leukemia. **Antimicrob.Agents.Chemother**, Washington, p.196-199, 1997.

NUCCI, M; COLOMBO, L.A; SILVEIRA, F; RICHTMANN, R; SALOMO, R; BRANCHINI, L.M; SPECTOR, N. Risk Factors for Death in Patients with Candidemia. **Infect.Control.Hosp.Epidemiol**, Chicago, v.19, p.846-850, 1998.

ODDS, F. C. **Candida and candidosis**, Baltimore, University Park Press, 1979.

ODDS, F. C; BERNAERTS, R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important Candida species. **J. Clin. Microbiol**, Washington, v .32, p. 1923 - 1929, 1994.

OLLERT, M.W; WEND, C; GORLICH, M; MCMULLANVOGEL, C.G; ZEPELIN, M.B.V; VOGEL, W; KORTING, C.H.Increased Expression of Candida albicans Secretory Proteinase, a putative Virulence Factor, in Isolates from Human Immunodeficiency Virus-Positive Patients.**J.Clin.Microbiol**, Washington, v.33, n.10, p.2543-2449, 1995.

PAPPU, K. D. L, RAO, K.P.P; BANISTER, E. Gastrintestinal Colonization with yeast species and Candida Septicemia in Very Low Birth Weight Infants. **Mycoses**, Berlin, v. 33, n.1, p. 20 - 23, 1990.

PERMÁM, J; CANTON, E; ORERO, A; VIUDES, A; FRASQUET, J; GOBERNADO, M. Estudio multicentrico sobre la epidemiología de las candidemias en España.**Rev.Iberoam.Micol**, Bilbao, v.19, p.30-35,2002.

PFALLER, M. A; HOUSTON, A; COFFMANN, S. Application of CHROMagar Candida for Rapid Screening of Clinical Specimens for Candida albicans, Candida tropicalis, Candida krusei, and Candida (Torulopsis) glabrata. **J. Clin. Microbiol**, Washington, v.34, n.1, p. 58 - 61, 1996.

PFALLER, M. A. Nosocomial Candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. **Clin. Infect. Dis**, Chicago, v. 22, n.2, p. 89 - 94, 1996.

PFALLER, M. A. Epidemiology and control of fungal infections. **Clin. Infect. Dis**, Chicago, v. 19, n. 1, p. 8 - 13, and 1994.

PFALLER, M. A. Epidemiology of Candidiasis. **J. Hosp. Infect**, Chicago, n.30, p. 329 - 338, 1995.

PFALLER, M. A; CABEZUDO, I; KOONTZ, F; BALE, M. Predictive value of surveillance cultures for systemic infection due to *Candida albicans* species. **Eur. J. Clin. Microbiol**, Wiesbaden, v. 6, p. 628 - 633, 1987.

PFALLER, M. A; DIEKEMA, D. J. Role of sentinel surveillance of Candidemia: trends in species distribution and antifungal susceptibility. **J.Clin. Microbiol**, Washington, v.40, n.10, p. 3551 - 3557, 2002.

PFALLER, M.A; DIEKEMA, D.J; MESSER, S.A; BOYKEN, L; HOLLIS, J.R. Activities of Fluconazole and Voriconazole against 1,586 Recent Clinical Isolates of *Candida* Species Determined by Broth Microdilution, Disk Diffusion, and Etest Methods: Report from the ARTEMIS Global antifungal Susceptibility Program, 2001. **J.Clin.Microbiol**, Washington, v.41, n.4, and p.1440-1446.

PRICE, M.F; WILKINSON, I.D; GENTRY, L.O. Plate methods for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, Edinburgh, v.20, p.15-20, 1982.

PONNUVEL, K. M; MENON, T; SANKARANAYANAN, V.S. Role of *Candida* in indirect pathogenesis of antibiotics associated diarrhoea in infants. **Mycopathologia**, Hague, v. 135, p. 145 - 147, 1996.

PEREAS, S, J. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azoles antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high - level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus - infected patients. **Antimicrob. Agents. Chemother**, Washington, v. 45, p. 2676 - 2684, 2001.

RAYMOND, J; AUJARD, Y. Nosocomial Infections in Pediatric Patients: A European, Multicenter Prospective Study. **Infect.Control.Hosp. Epidemiol**, Chicago, v.21, n.4, p.260-263, 2000.

REPENTIGNY, L., Gastrointestinal Colonization and Systemic Dissemination by *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in Intact and Immunocompromised Mice. **Infect. Immun**, Washington, P. 4907 - 4914, 1992.

RESENDE, M. A; KOGA-ITO, C.Y; ANDREATA, L.S; CARMO, F.H.S. Susceptibilidade a antifúngicos em amostras de *Candida* isolados de pacientes idosos através do método de NCCLS.III **Congresso Brasileiro de Micologia**, Águas de Lindóia, São Paulo, p.78, 2001.

REX, J.H. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. **Clin.Infect. Microbiol.Infect**, Oxford, v. 14, p. 643 - 658, 2001.

REX, J.H. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro - in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. **Clin. Infect. Dis**, Chicago, v. 24, n.2, p. 235 - 247, 1997.

RICHET, H.M. Risk factors for candidemia in patients with acute lymphocyte leukemia. **Review. Infect. Dis**, Chicago, v. 13, p. 211 - 215, 1991.

RODRÍGUEZ, T. A. J. L; RODERO, L; CUENCA, E. M; CÓDOBA, S. **Manual do Curso "Determinação de Resistência a Antifúngicos no Laboratório"**. , São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, 2002.

RODERO,L; BOUTUREIRA,M; DEMKURA,H; BURKETT, A; FERNANDEZ,C;
 LOSSO,M; RUEDA, H.J; MOTCELLI, A; VITALE,R; CANTEROS, C.
 Infecciones por levaduras: agentes causales y su resistència a antifúngicos em
 pacientes pediátricos hospitalizados y en adultos HIV positivos.
Rev.Arg.Microbiol, Buenos Aires, v.29, p.7-15,1997.

RODERO,L; HOCHENFELLNER,F; DEMKURA,H; PEREDA,R; CORDOBA,S;
 CANTEROS,C; RIAL, J.M; DAVEL, G. Trasmision nosocomial de *Candida*
albicans en recién nacidos.**Rev. Arg. Micol**, Buenos Aires, v.32, p.179-184,
 2000.

ROWEN, J; RENCH, A, M; KOZINETS, A, C; ADMS, M, J; BAKER, J, C.
 Endotracheal Colonization with *Candida* enhances risk of Systemic candidiasis in
 very low birth weight neonates. **J. Pediatrics**, St.Louis, v.124, n.5, p.789-
 794,1994.

RUCHEL,R;TEGELER,R;TROST,M.A.Comparison of secretory proteinase from
 different strains of *Candida albicans*. **Sabouraudia**, Edinburgh, v.20, p.233-
 234,1982.

RUCHEL,R.Mycotic Infections in the Immunocompromised patient. **Rev.Iberoam.**
Micol, Bilbao, v.13, Suppl 20-24,1996.

SANDFORD, G. R; MERZ, G.W; WINGARD, J.R; CHARACHE, P; SARAL, R.The
 Value of Fungal Surveillance Cultures as Predictors of Systemic Fungal
 Infections. **J. Infec. Dis**, Chicago, v. 42, n. 4, p. 503 - 509, and 1980.

- SCHALLER, M; BEIN, M; KORTING, C.H; BAUR, S; HAMM, G; MONOD, M; BEINHAEUER, S; HUBE, B. The Secreted Aspartyl Proteinases Sap 1 and Sap 2 Cause Tissue Damage in an In vitro Model of Vaginal Candidiasis Based on Reconstituted Human Vaginal Epithelium. **Infect.Immun**, Washington, v.71, n.6, p.3227-3234.
- SHOME, S. K.; Singha, P; Gugnani, H. C. Prevalence and role of Candida in acute gastroenteritis. **Mycopathologia**, Hague, v. 19,p. 451 - 457, 1976.
- SILVA, R, R, S. Variabilidade fenotípica e genotípica de amostras de *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com AIDS.São Paulo. 1999.[Tese Doutorado-Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].
- SOLOMKIN, J.Timing of Treatment for Nonneutropenic Patients Colonized with Candida. **Am.J.Surg**,New York, v.172, n.6A, p.44S-48S, 1996.
- STILL, J.J; LAW, E.J; BELCHER, E.K; SPENCER, A.S. A Comparison of Susceptibility to five antifungal agents of yeast cultures from burns patients. **Burns**, Great Britain, v.21, n.3, p.167-170, 1995.
- SUAREZ, M. V. J; TUDELA, R. L. J. Patterns of in vitro activity of itraconazole and Imidazole antifungal agents against Candida albicans with decreased susceptibility to fluconazole from Spain. **Antimicrob. Agents. Chemother**, Washington, v.39, n.7, p. 512 - 1516, 1995.
- SZESZS, W.M. Perfil Protéico de cepas de Candida albicans Geneticamente Diferentes: Relação com fatores de virulência: (in vivo) Inoculação Experimental (in vitro) Adesão e Exoenzimas.São Paulo. 2002.[Tese Doutorado-Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].

- TALWAR, P.C; CHAWLA, S; METHA, S; WALIA, B.N.S; KUMAR, L; CHUGH, K.S.
Fungal diarrhoea: Association of different fungi and seasonal variation in their incidence. **Mycopathologia**, Hague, v. 110, p. 101 - 105, 1990.
- THELEN, P., BURKE, V., GRACEY, M. Effects of intestinal micro - organism UN fluid and electrolyte transport in the transport in the jejunum of the rat. **J. Med. Microbiol**, New York, v. 11, p. 463 - 470, 1978.
- THOMAS, J; MERZ, M.D; William, G. Pathologic Features en the Human Alimentary Tract Associated with invasiveness of Candida Tropicalis. **Am.J.Clin. Pathol**, Baltimore, v.85, n.4, p. 498 - 502, 1986.
- TOALA,P;SCHROEDER,A; DALY,A,K;FINLAND,M. Candida at Boston City Hospital, **Arch. Intern. Med**,Chicago, v.126, 983- 989,1970.
- VOSS, A; HOLLIS, R.J; PFALLER, M.A; WENZEL, R.P; DOEBBELING, B.N.Investigation of the sequence of colonization and candidemia in mononeutropenic patients. **J. Clin. Microbiol**, Washington, v. 32, p. 957 - 980, 1994.
- VERDUYN, M.F; MEIS, F.G.M.J; VOSS, A.NosocomialFungal Infections: Candidemia.**Diagn.Microbiol.Infect.Dis**, New Yourk, v.34, p.213-220, 1999.
- WALSH, T. J; MERZ, W. G. Pathologic features in the human alimentary tract associated with invasiveness of Candida tropicalis. **Am. J. Pathol**, Baltimore, v. 85, p. 498 - 502, 1986.
- WALSH, T. G; MERS, W.G.New evidence that Candida albicans possesses additional ATP - biding cassette MDR - like genes: implications for antifungal azoles resistance. **J.Med. Veter. Mycol**,Oxford, V. 35,n.2, p. 133 - 7, 1997.

- WEY, S, B. Risk factor for hospital - acquired candidemia: a matched case - control study. **Arc. Inter. Med**, Chicago, v. 149, p. 2349 - 2353, 1989.
- WILEY, J, M. *et al.* Invasive fungal disease in pediatric acute leukemia patients with fever and neutropenia during induction chemotherapy: a multivariate analysis of risk factors. **J. Clin. Oncol**, New York, V. 8, p. 280 - 286, 1990.
- WINGARD, J. R. Importance of Candida species other *C. albicans* as pathogens in oncology patients, **Clin. Infect. Dis**, Chicago, v. 20, p.115 - 125, 1995.
- WINGARD, J. R. Candida tropicalis: a major pathogen in immunocompromised patients. **Ann. Intern. Med**, Monte Carlo, v. 91, p.539 - 543, 1979.
- WINSTON, D. J. Fluconazole prophylaxis of fungal infections in patients with acute leukemia: results of randomized placebo-controlled, double-blind, multicenter trial. **Ann. Intern. Med**, Monte Carlo, v. 118, p. 495 - 503, 1993.

ANEXO I

Metodologias para testes de sensibilidade de leveduras a antifúngicos

	M27A (*)	EUCAST(**)
Metodologia	Macrodiluição em caldo, 1 ml Microdiluição em caldo, 0,2 ml	Microdiluição em caldo, 0,2 ml
Medio	RPMI 1640 com 0,165 M MOPS, pH7	RPMI 1640 - 2% glucosa com 0,165 M MOPS, pH7
Inóculo	0,5 - 2,5 x 10 ³ ufc / ml	0,5 - 2,5 x 10 ³ ufc / ml
Temperatura de incubação	35 °C	35 °C
Tempo de incubação	<i>Candida</i> , 48 horas	<i>Candida</i> , 24 horas
Determinação da CMI	Leitura: visual Anfotericina B: tubo ópticamente claro Azoles e 5 – fluorocitosina: redução de 80% na turbidez em comparação com o controle de crescimento	Leitura: espectrofotométrica AnfotericinaB: diminuição da densidade óptica (DO) em 90% comparado com a DO do controle de crescimento Azoles e 5 - fluorocitosina: redução de 50%

(*) M27A (NCCLS, 1997)

(**) Cuenca-Estrella *et al.* (2002).

A U T O R I Z A Ç Ã O

Autorizo o BIOMÉDICO Sr. CLÁUDIO TALARICO, portador da cédula de Identidade RG nº 12.111.634-7 SSP/SP, e do C.R.B.M. nº 5305, a utilizar as Cepas de Leveduras do Laboratório deste Hospital, para fins da Pesquisa do Projeto **LEVEDURAS EM TRATO INTESTINAL DE POPULAÇÃO PEDIÁTRICA HOSPITALIZADA**.

Informo que as referidas Cepas seriam desprezadas caso não fossem usadas para esta finalidade.

Atenciosamente

DR. JOÃO OSÓRIO MARTINS CARDOSO

CRM: 77327

HOSPITAL E PRONTO SOCORRO COMUNITÁRIO VILA IOLANDA S/C LTDA 60

HOSPITAL CENTRAL DE GUAIANAZES

AUTORIZAÇÃO

Autorizo o Biomédico Sr. Cláudio Talarico , portador da cédula de identidade RG 12.111.634-7 SSP/SP, e do C.R.B.M. 5305, a utilizar as cepas de levedura do laboratório deste hospital , para fins da pesquisa do projeto . **LEVEDURAS EM TRATO INTESTINAL DE POPULAÇÃO PEDIÁTRICA HOSPITALAR**".

Informo que as referidas Cepas seriam desprezadas caso não fossem usadas para esta finalidade.

Atenciosamente

D^r. João Osório Cardoso

CRM 77327

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DOS INSTITUTOS DE PESQUISA
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

São Paulo, 13 de novembro de 2003

Ilmo(a) Sr(a).

MARCIA DE SOUZA CARVALHO MELHEM

Coordenador(a) do Projeto de Pesquisa

LEVEDURAS EM TRATO INTESTINAL DE POPULAÇÃO PEDIÁTRICA
HOSPITALIZADA

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (CEPIAL), em reunião apresentou o PARECER, enquadrando o referido projeto na categoria *APROVADO*, de acordo com a Resolução 196/96 sobre Pesquisas Envolvendo Seres Humanos / CNS / MS, Brasília, 1996.

Atenciosamente,

Julia Maria Martins de Souza Felipe

Coordenadora
CEPIAL

5-FÓRMULAS E PREPARAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA

Agar Sabouraud + Cloranfenicol

Dextrose	20g
Peptona	10g
Agar	15g
Água destilada	1000ml
Álcool 95°C	100ml
Cloranfenicol	100mg

Agar Fubá + Tween 80

Fubá (amarelo)	62,58g
Agar	19g
Água destilada	1500ml
Tween 80	15ml

Agar Uréia de Christensen

Peptona	1g
Glicose	1g
Cloreto de Sódio	5g
Fosfato de Potássio Monobásico	2g
Fenol Vermelho	12g
Agar	20g
Água Destilada	1000ml

Meio para Prova de Assimilação de Carbono (C)

Sulfato de Amônia	5g
Fosfato de Potássio monobásico	1g
Sulfato de Magnésio	0,5g
Agar	20g
Água	1000ml

Meio para prova de Assimilação de Nitrogênio (N)

Dextrose	20g
Fosfato de Potássio monobásico	1g
Sulfato de Magnésio	0,58g
Agar	20g
Água destilada	1000ml

Meio para Prova de fermentação de Carboidratos

Peptona	2,5g
Extrato de Levedura	2,5g
Água destilada	100ml
Solução de Açúcares:	
Açúcar	6g
Água destilada	100ml

CHROMagar Candida®

CHROMagar Candida® Desidratado	47,7g
Água destilada	1000ml

Proteinase

Utilizou-se o procedimento descrito por RUCHEL *et al.*

Meio Base

Àgar (Difco)	18,0g
Água destilada	900ml

Este meio foi esterilizado através de autoclavação a 120°C por 15 minutos.

Meio de Albumina

"Yeast carbon base" (Difco)	11,7g
albumina bovina fração V (Sigma)	2,0g
Protovit (Roche)	2,5ml
Água destilada	100ml

Fosfolipase

Realizada segundo a técnica descrita por PRICE *et al.* (1982)

Meio de emulsão de ovo

Gema de ovo	80g
Solução fisiológica	80ml

Meio Agar Fosfolipase

Peptona (Difco)	10g
Glicose	20g
Cloreto de Sódio	57,30g
Cloreto de Cálcio	0,55g
Agar	20g
Agua destilada	1000ml

Agar Casitone

Casitona	9g
Extrato de Levedura	5g
Citrato Trisodico	1g
Fosfato Monobásico de Sodio	1g
Fosfato Dibasico de Sodio	1g
Glicose	10g
Agar	20g
Água destilada	1000ml

Meio RPMI 1640 Com Tampão Mops

Meio RPMI 1640	10,4g
Tampão MOPS	34,53g

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DOS INSTITUTOS DE PESQUISA
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
SERVIÇO DE PARASITOLOGIA
SEÇÃO DE MICOLOGIA

65

PROTOCOLO DE IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS 2003

Nome: _____ N°/ano _____

Material Biológico _____ Data: ____/____/____ Resp: _____

PROCEDIMENTOS

Exame direto: Data: ____/____/____ Resp: _____

"a fresco" _____

Coloração de Gram: _____

Coloração de Giemsa: _____

Semeadura em () A.S. () A.B.H.I. () MYCOSEL () CALDO

Data: ____/____/____ Resp: _____

Provas de Identificação:

DESENHO

		P.M.() clam. () M.V.() artr. ()

REAÇÃO COM AZUL B DIAZÔNIO – DBB Realizado em: ____/____/____ Resp: _____

() () ()

Leitura em: ____/____/____ Resp: _____

CRESCIMENTO EM MEIO LIVRE DE VITAMINAS - Realizado em: ____/____/____ Resp: _____

() () ()

Leitura em: ____/____/____ Resp: _____

Assimilação fontes de C e N Realizado em: ____/____/____ Resp: _____ Leitura em: ____/____/____ Resp: _____

1ª Repetição: Realizado em: ____/____/____ Resp: _____ Leitura em: ____/____/____ Resp: _____

2ª Repetição: Realizado em: ____/____/____ Resp: _____ Leitura em: ____/____/____ Resp: _____

1- GLICOSE () () ()	11- MELEZITOSE () () ()	21- METANOL () () ()	31- D- GLUCONATE () () ()
2- GALACTOSE () () ()	12- INULINA () () ()	22- ETHANOL () () ()	32- DL-LACTATE () () ()
3- SORBOSE () () ()	13- AMIDO () () ()	23- GLYCEROL () () ()	33- SUCCINATE () () ()
4- SACAROSE () () ()	14- XYLOSE () () ()	24- ERYTHRITOL () () ()	34- CITRATO () () ()
5- MALTOSE () () ()	15- L- ARABINOSE () () ()	25- RIBITOL () () ()	35- INOSITOL () () ()
6- CELOBIOSE () () ()	16- D- ARABNOSE () () ()	26- GALACTITOL () () ()	36- HEXADECANO () () ()
7- TREALOSE () () ()	17- D- RIBOSE () () ()	27- D MANNITOL () () ()	37- NITRATO () () ()
8- LACTOSE () () ()	18- L- RAMINOSE () () ()	28- D-GLUCITOL () () ()	38- PEPTONA () () ()
9- MELIBIOSE () () ()	19- D- GLUCOSAMINE () () ()	29- αMETHYL-D-GLUCOSIDE () () ()	
10- RAFINOSE () () ()	20- N ACETYL-D-GLUCOSAMINE () () ()	30- SALICINA () () ()	

Fermentação de Fontes de Carbono Data: ____/____/____ Resp: _____ Leitura ____/____/____ Resp: _____

Glicose () Galactose () Maltose () Trealose () Celobiose () Lactose () Sacarose () Rafinose () Melibiose ()

Crescimento em Caldo GEP: Data: ____/____/____ Leitura em: ____/____/____ Resp: _____

Película () base estreita () base larga () ilhotas () Leitura em: ____/____/____ Resp: _____

Uréia de Christensen pos.() neg.() Data: ____/____/____ Leitura em: ____/____/____ Resp: _____

Crescimento 25° () 30° () 37° () Data: ____/____/____ Leitura em: ____/____/____ Resp: _____

RESULTADO

Data ____/____/____ Resp: _____