

GISELE MADEIRA DUBOC DE ALMEIDA

***Rhodotorula* spp. isoladas de hemocultura no Hospital
das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de
São Paulo: características clínicas e microbiológicas**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Nascimento Burattini

São Paulo

2005

GISELE MADEIRA DUBOC DE ALMEIDA

***Rhodotorula* spp. isoladas de hemocultura no Hospital
das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de
São Paulo: características clínicas e microbiológicas**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Nascimento Burattini

São Paulo

2005

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Neuza e Paulo (*in memoriam*), com carinho e gratidão.

Para Frank e Isabella, todo meu amor.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	xi
SUMMARY	xi
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Características microbiológicas de <i>Rhodotorula</i> spp.	6
1.2. <i>Rhodotorula</i> e o meio ambiente	9
1.3. Estudos de virulência em modelos animais	11
1.4. Infecções da corrente sanguínea causadas por <i>Rhodotorula</i> spp.	11
1.5. Teste de sensibilidade <i>in vitro</i> a drogas antifúngicas	17
1.6. Aplicação dos métodos moleculares na avaliação de isolados fúngicos	24
1.7. Justificativa	27
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivos Principais	29
2.2. Objetivos Secundários	29
3. MÉTODOS	31
3.1. Local	31
3.2. Desenho do estudo	32
3.3. Identificação dos pacientes	32
3.4. Identificação das cepas viáveis para avaliação microbiológica e molecular	33
3.5. Critérios de exclusão	33
3.6. Microbiologia	34

3.6.1. Coleta e processamento das hemoculturas.....	34
3.6.2. Identificação das cepas	34
3.6.3. Teste de sensibilidade <i>in vitro</i> a drogas antifúngicas.....	35
3.7. Tipagem Molecular	41
3.7.1. Eletroforese em campo pulsado.....	41
3.8. Variáveis estudadas e definições utilizadas	42
3.8.1. Variáveis demográficas.....	42
3.8.2. Variáveis relacionadas ao quadro clínico-laboratorial.....	42
3.8.3. Variáveis relacionadas a procedimentos invasivos.....	45
3.8.4. Variáveis relacionadas à terapêutica prévia	46
3.8.5. Outras variáveis e definições	48
3.8.6. Período de acompanhamento.....	49
3.9. Análise dos dados.....	49
3.9.1. Coleta dos dados	49
3.9.2. Banco de dados	50
4. RESULTADOS.....	52
4.1. Variáveis estudadas.....	53
4.1.1. Variáveis demográficas.....	53
4.1.2. Variáveis relacionadas ao quadro clínico-laboratorial.....	54
4.1.3. Variáveis relacionadas a procedimentos invasivos.....	60
4.1.4. Variáveis relacionadas à terapêutica prévia	60
4.1.5. Classificação do episódio de hemocultura positiva para <i>Rhodotorula</i>	61
4.1.6. Outras infecções	62
4.1.7. Hemoculturas positivas	63
4.1.8. Período de acompanhamento	63

4.1.8.1. Cateter venoso central.....	63
4.1.8.2. Tratamento antifúngico	65
4.1.8.3. Evolução clínica.....	65
4.2. Microbiologia.....	70
4.2.1. Identificação das espécies de <i>Rhodotorula</i>	70
4.2.2. Teste de sensibilidade <i>in vitro</i> a drogas antifúngicas.....	73
4.3. Biologia molecular	75
4.3.1. Eletroforese em campo pulsado.....	75
5. DISCUSSÃO.....	79
6. CONCLUSÕES	108
7. REFERÊNCIAS.....	112

Apêndice

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC: “American Type Culture Collection” (Coleção Americana de Tipagem de Culturas)

APACHE: “Acute Physiology and Chronic Health Evaluation”

CDC: “Center for Disease Control and Prevention” (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)

DNA: “Deoxyribonucleic acid” (Ácido desoxirribonucleico)

EUCAST: “European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing” (Comitê Europeu para Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana)

Mb: Megabases

MIC: “Minimal Inhibitory Concentration” (Concentração Inibitória Mínima)

NCCLS: “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (Comitê Nacional para Padronização de Laboratórios Clínicos)

PFGE: “Pulsed Field Gel Electrophoresis” (Eletroforese em campo pulsado)

PM: Peso molecular

RAPD: “Randomly Amplified Polymorphic DNA” (amplificação aleatória de segmentos de DNA)

RPM: Rotações por minuto

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Características macroscópicas de <i>Rhodotorula</i> sp.....	7
FIGURA 2. Características microscópicas de <i>Rhodotorula</i> sp.....	7
FIGURA 3. Esquema de distribuição das soluções de antifúngicos em placas para teste de sensibilidade.....	37
FIGURA 4. Distribuição anual dos 25 pacientes no momento da hemocultura positiva para <i>Rhodotorula</i> spp. segundo a localização nas unidades hospitalares (enfermeira ou hospital-dia) no HC-FMUSP de janeiro de 1996 a dezembro de 2004.....	55
FIGURA 5. Eletroforese em campo pulsado de nove cepas de <i>R. mucilaginosa</i> isoladas de hemocultura – HC-FMUSP – janeiro de 1996 a dezembro 2004.....	77

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - Resumo dos principais resultados publicados sobre a atividade *in vitro* de diferentes antifúngicos e *Rhodotorula* spp..... 23
- TABELA 2 - Total de fungos isolados de hemocultura e distribuição anual de *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Pichia anomala*, *Rhodotorula* spp., outras leveduras e fungos filamentosos no HC-FMUSP de janeiro de 1996 a dezembro de 2004 52
- TABELA 3 - Distribuição dos pacientes com hemocultura positiva para *Rhodotorula* spp. segundo a idade e o sexo – HC-FMUSP – janeiro de 1996 a dezembro de 2004..... 54
- TABELA 4 - Características demográficas, doença de base e transplante de medula óssea dos 25 pacientes com hemocultura positiva para *Rhodotorula* spp. – HC-FMUSP – janeiro de 1996 a dezembro de 2004..... 57
- TABELA 5 - Características clínicas dos 25 pacientes com hemocultura positiva para *Rhodotorula* spp. – HC-FMUSP – janeiro de 1996 a dezembro de 2004... 59
- TABELA 6 - Resumo dos 25 pacientes com hemocultura positiva para *Rhodotorula* spp. HC-FMUSP – janeiro de 1996 a dezembro de 2004..... 69
- TABELA 7 - Características macromorfológicas, degradação da uréia e crescimento a 37 °C de 20 cepas de *R. mucilaginosa* isoladas de hemocultura – HC-FMUSP – janeiro de 1996 a dezembro de 2004..... 71
- TABELA 8 - Identificação de 20 cepas de *Rhodotorula* isoladas de hemocultura de acordo com método utilizado – HC-FMUSP – janeiro de 1996 a dezembro de 2004..... 72

TABELA 9 - Atividade <i>in vitro</i> de drogas antifúngicas frente a 20 cepas de <i>R. mucilaginosa</i> isoladas de hemocultura no HC-FMUSP de janeiro de 1996 a dezembro de 2004	74
TABELA 10 - Distribuição das concentrações inibitórias mínimas encontradas em 20 cepas de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> isoladas de hemocultura no HC-FMUSP de janeiro de 1996 a dezembro de 2004.....	75
TABELA 11 - Distribuição do perfil genotípico de nove cepas de <i>R. mucilaginosa</i> isoladas de hemocultura de acordo com paciente, unidade de internação, data do isolamento, número da cepa e número da coluna da eletroforese em campo pulsado - HC-FMUSP – janeiro de 1996 a dezembro de 2004.....	76

RESUMO

Almeida GMD. *Rhodotorula* spp. isoladas de hemocultura no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo: características clínicas e microbiológicas [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2005.

INTRODUÇÃO: Nos últimos anos, um número crescente de infecções causadas por fungos incomuns tem sido relatado na literatura, principalmente na crescente população de pacientes imunossuprimidos. Embora infrequente, leveduras do gênero *Rhodotorula* podem causar infecção da corrente sanguínea (ICS), particularmente na presença de imunossupressão e/ou cateter venoso central (CVC). **OBJETIVOS:** Verificar a ocorrência de *Rhodotorula* spp. isoladas de hemocultura na Seção de Microbiologia do HC-FMUSP no período de janeiro de 1996 a dezembro de 2004; caracterizar clinicamente os pacientes identificados e avaliar as cepas quanto a aspectos microbiológicos e moleculares. **MÉTODOS:** Foi realizado um estudo observacional descritivo retrospectivo. Os pacientes identificados foram caracterizados de acordo com variáveis clínicas de interesse. Comparou-se o desempenho na identificação das espécies isoladas de dois métodos comerciais, Vitek e API 20C AUX, com os resultados de método convencional de assimilação de carboidratos e nitrato. A atividade *in vitro* de fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B frente a 20 cepas de *Rhodotorula* foi também determinada, de acordo com as recomendações do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* e *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing*, ambos baseados no método de microdiluição em caldo. O perfil genotípico dos isolados foi estudado através da eletroforese em campo pulsado. **RESULTADOS:** *Rhodotorula* spp. foram isoladas de hemoculturas de 28 pacientes e, embora infrequente, foi um dos gêneros não-*Candida* não-*Cryptococcus* mais prevalentes. Foram incluídos no estudo 25 pacientes, 76% do sexo masculino, com média de idade de $36,3 \pm 22,0$ anos. A maioria deles apresentava doença de base (96%), mais notadamente neoplasia hematológica. O transplante de medula óssea foi realizado em 40% dos pacientes, sendo do tipo autólogo em 70% dos casos. Apenas 36% dos pacientes encontravam-se internados no momento da hemocultura positiva. A maioria dos pacientes utilizava CVC (88%), principalmente de longa permanência (91%). Aproximadamente metade dos pacientes estava sob uso de antibioticoterapia parenteral, corticosteróides, quimioterápicos ou outras drogas imunossupressoras. Neutropenia foi observada em três pacientes e uso de fluconazol prévio em um paciente. O episódio foi classificado como ICS em 80% dos casos. Destes, 89,5% retiraram CVC entre 1 e 37 dias após hemocultura positiva e 88% receberam antifúngico sistêmico, sendo anfotericina B a droga mais utilizada. A mortalidade geral observada foi de 21%. Das 20 cepas avaliadas, 20% e 5% foram erroneamente identificadas como *R. glutinis* pelos sistemas Vitek e API 20C AUX, respectivamente. O método convencional identificou todas as cepas como *R. mucilaginosa*. A anfotericina B demonstrou boa atividade *in vitro*, enquanto, itraconazol e voriconazol demonstraram atividade *in vitro* variável, contrastando com os resultados uniformemente limitados observados para fluconazol. Observou-se boa concordância entre os dois métodos avaliados. A cariotipagem eletroforética exibiu três perfis diferentes. **CONCLUSÃO:** Embora infrequente, *Rhodotorula* isolada de hemocultura representou ICS na maioria dos casos. A distribuição temporo-espacial dos casos não sugeriu a ocorrência de surto. Anfotericina B foi o antifúngico mais utilizado, com boa atividade *in vitro* para todas as cepas, contrastando com a limitada atividade *in vitro* observada para fluconazol.

SUMMARY

Almeida GMD. ***Rhodotorula* spp. isolated from blood cultures in Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo: clinical and microbiological aspects.** [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2005.

INTRODUCTION: The emergence of less common but medically important fungal pathogens has been increasingly reported in the last decade. Although infrequent, bloodstream infections (BSI) due to *Rhodotorula* species might occur, especially in the presence of immunosuppression and/or central venous catheters. **PURPOSE:** To describe the occurrence of *Rhodotorula* species isolated from blood cultures from January 1996 to December 2004, clinically characterizing affected patients. The strains were subjected to microbiological and molecular studies. **METHODS:** A retrospective observational study was conducted. Records from the microbiology laboratory served to identify patients with positive blood cultures. Medical charts of all patients identified were reviewed for selected clinical parameters. The strains were identified using two commercially available systems (Vitek and API 20C AUX), and by conventional methods. The *in vitro* activity of fluconazole, itraconazole, voriconazole and amphotericin B against 20 strains of *Rhodotorula* were determined according to the recommendations of the *National Committee for Clinical Laboratory Standards* and the *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing* for broth microdilution method. Genotypic profiles were evaluated by pulsed-field gel electrophoresis. **RESULTS:** During the study period *Rhodotorula* spp. were isolated from 28 patients. Although infrequent, it was one of the most common non-*Candida* non-*Cryptococcus* yeasts isolated from blood cultures. Twenty five patients were included in this study, 76% were male and the median age was 36,3 +/- 22,0 years. A large majority (96%) of patients had underlying diseases, most prominently hematological cancer. Ten (40%) patients had undergone bone marrow transplants, 70% of these transplants were autologous. Only 36% of the patients were hospitalized in different units at the time of index blood culture. The majority of patients (88%) had a central venous catheter, mainly long-term type. (91%). Approximately half of the patients were receiving parenteral antibiotic therapy, corticosteroids, chemotherapy or immunosuppressive therapy. Neutropenia was observed in only three patients. Only one patient was undergoing prior treatment with fluconazole. BSI was identified in 80% of the cases. Of these patients 89.5% had removed their CVC 1 to 37 days after index blood culture and 88% had received systemic antifungal therapy. Amphotericin B was the most commonly used drug. General mortality was observed in 21% of the cases. All 20 strains were identified as *R. mucilaginosa* by conventional methods and misidentification of the species as *R. glutinis* was observed in 20% and 5% with the Vitek and the API 20C AUX, respectively. Amphotericin B demonstrated good *in vitro* activity against *Rhodotorula*. Itraconazole and voriconazole showed variable activity, whereas fluconazole displayed uniformly limited activity. We observed good agreement with results obtained with two independent methods. Electrophoretic karyotyping demonstrated three different genetic profiles. **CONCLUSION.** Although infrequent, *Rhodotorula* isolated from blood cultures represent BSI in the majority of the cases. The distinct temporal distribution of the affected patients was not suggestive of an outbreak. Amphotericin B was the most commonly used antifungal. It demonstrated good *in vitro* activity against all strains, whereas fluconazole had limited *in vitro* activity.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os fungos habitam o planeta há pelo menos 300 milhões de anos e representam exemplos de organismos bem sucedidos na cadeia evolutiva dos seres vivos, com ampla distribuição na natureza onde desempenham importante papel como decompositores de matéria orgânica.

Das mais de 200.000 espécies de fungos descritas, cerca de 200 foram comprovadamente associadas a infecções em humanos causando desde quadros cutâneos superficiais localizados até infecções sistêmicas potencialmente fatais (Schell, 1995; Lacaz et al., 2002).

Até recentemente, o homem moderno esteve mais familiarizado com os aspectos positivos dos fungos tais como a utilização de leveduras na fabricação de pães, cerveja e champanhe, além da sintetização do primeiro antibiótico a partir do fungo filamentosso *Penicillium notatum* (Greenberg, 2001).

Os textos de livros de Patologia dedicavam pouco espaço a infecções fúngicas até a primeira metade do século XX, restringindo as discussões a infecções adquiridas no ambiente e infecções superficiais de pele e membranas mucosas (Greenberg, 2001). Nas décadas de 50 e 60, nos relatos da literatura predominavam artigos sobre infecções cutâneas e micoses sistêmicas, particularmente causadas por fungos dimórficos. Já na década de 70, um número maior de artigos sobre infecções fúngicas invasivas, principalmente causadas por *Aspegillus* spp., foi publicado (Prystowsky et al., 1976; Winston et al., 1977; Edwards et al., Winston et al., 1979).

Entretanto, a partir de 1980 observou-se um aumento significativo na incidência das infecções fúngicas tanto adquiridas na comunidade como no ambiente hospitalar

renovando o interesse e a importância da Micologia Médica. A morbidade e mortalidade associada a estas infecções podem ser substanciais (Beck-Sague et al., 1993; Fridkin e Jarvis, 1996; Patel e Paya, 1997; Krcmery et al., 1999; Kontoyannis e Bodey, 2002; Gudlaugsson et al., 2003; Pfaller e Wenzel, 2003).

Inúmeros fatores contribuíram para o aumento da incidência das infecções fúngicas, como: a) aumento da população de pacientes imunossuprimidos tais como pacientes com aids, oncológicos e diabéticos entre outros; b) avanços diagnósticos e terapêuticos da prática médica moderna, com a utilização de novas e agressivas estratégias no cuidado clínico e cirúrgico de pacientes, incluindo sistemas de suporte de vida, quimioterapia citotóxica e uso de antimicrobianos de amplo espectro; c) o advento do transplante de órgãos e medula óssea; e, d) o aumento da população de idosos (Anaisse et al., 1989; Diamond, 1991; Beck-Sague et al., 1993; Morrisson et al., 1994; Fridkin e Jarvis, 1996; Pfaller e Wenzel, 2003).

Embora a maioria das infecções fúngicas associadas à assistência à saúde sejam causadas por espécies de *Candida* e *Aspergillus*, um número significativo de infecções causadas por fungos menos frequentes tem sido relatado na literatura, muitos deles tradicionalmente considerados de baixa virulência e, cujo isolamento em materiais clínicos era frequentemente interpretado como contaminação ambiental ou colonização inócua. Estes fungos têm recebido a denominação de “emergentes” (Vartivarian et al., 1993, Hazen, 1995; Perfect e Schell, 1996; Groll e Walsh, 2001; Fleming et al., 2002; Walsh et al., 2004; Pfaller e Diekema; 2004).

Nos Estados Unidos, cerca de 11% das infecções fúngicas nosocomiais foram causadas por espécies não-*Candida* não-*Aspergillus* entre 1980 e 1990 (Beck-Sague et al., 1993; Fridkin e Jarvis, 1996). Kremery (1999) mencionou uma prevalência de 20%

de leveduras não-*Candida* associadas à fungemia em pacientes com leucemia. Entre 1993 e 1998, Kovacicová et al. (2001) reportaram um aumento na incidência de leveduras não-*Candida* isoladas de hemocultura de $\approx 5\%$ para 20%.

Mais recentemente, um estudo populacional multicêntrico de vigilância das infecções fúngicas invasivas em pacientes transplantados, mostrou que 30% das infecções observadas em transplantados de medula óssea e 11% em transplantados de órgãos sólidos foram causadas por outros fungos não-*Candida* não-*Aspergillus*, excluindo-se casos de criptococose e micoses endêmicas nos pacientes transplantados de órgãos sólidos (Pappas et al., 2003).

Os fatores associados às infecções causadas pelos fungos ditos “emergentes” incluem o aumento do número de pacientes sob risco para infecções fúngicas como pacientes oncológicos, transplantados e prematuros entre outros, maior sobrevivência de pacientes graves, além de uma maior preocupação por parte dos microbiologistas clínicos e dos médicos assistentes na valorização do isolamento destes fungos (Vartivarian et al., 1993; Pfaller e Diekema, 2004). A utilização de fluconazol em esquema terapêutico ou profilático também foi aventada como um possível fator de risco para algumas destas infecções (Goldani et al., 1995; Krcmery et al., 1998; Kovacicová et al., 2001; Kontoyannis et al., 2004).

Entre os fungos considerados “emergentes” destacam-se os fungos filamentosos pigmentados (feo-hifomicetos), os não pigmentados (hialo-hifomicetos), dentre os quais, particularmente as espécies de *Fusarium*, *Acremonium* e *Scedosporium*; os zigomicetos e leveduras não-*Candida* não-*Cryptococcus* tais como, *Trichosporon* spp., *Malassezia* spp., *Pichia anomala* e *Rhodotorula* spp. (Hazen, 1995; Perfect e Schell, 1996; Pfaller e Diekema, 2004).

Entretanto, dado o alto comprometimento do sistema imunológico verificado atualmente em inúmeros pacientes, é possível afirmar que não existe uma espécie fúngica uniformemente “não patogênica” e que estamos testemunhando o que Ajello* (1971) *apud* Schell (1996) descreveu há mais de 30 anos como “a ponta do iceberg da micologia médica”.

As infecções causadas por estes fungos variam desde quadros mais localizados envolvendo a pele, seios paranasais, pulmões a infecções disseminadas e, dada a baixa frequência com que ocorrem, têm suas características clínicas, terapêuticas e epidemiológicas ainda pouco conhecidas.

As espécies de *Rhodotorula* têm sido raramente associadas a infecções em humanos, com poucos casos documentados de endocardite, meningite, ventriculite, peritonite, infecção de prótese, infecções oculares e da corrente sanguínea (Eisemberg et al., 1983; Donald et al., 1988; Marinova et al., 1994; Gyaurgieva et al., 1996; Ahmed et al., 1998; Cutrona et al., 2002; Bawazeer et al., 2003; Maeder et al., 2003).

Infecção da corrente sanguínea é a forma mais frequentemente descrita na literatura. Nos últimos 40 anos, cerca de 60 casos - a maioria nos anos 90 - de infecção da corrente sanguínea por *Rhodotorula* spp. foram descritos, tendo 23 deles ocorrido em uma única instituição. A ocorrência desta infecção tem sido associada a pacientes imunossuprimidos, presença de cateter venoso central e neutropenia, embora seja importante ressaltar que não há até o momento estudo adequado à elucidação dos fatores de riscos para fungemia por *Rhodotorula* (Kiehn et al., 1992; Samonis et al., 2001; Anatoliotaki et al., 2003; Zaas et al., 2003; Pasqualotto et al., 2005).

* Ajello L: The medical mycology iceberg. HSM, *Health Reports*. 1971; 86:437.

A seguir estão descritas as principais características do gênero *Rhodotorula* e maiores detalhes podem ser consultados em livros de referência (Kwon-Chung e Bennet, 1992; Kurtzman e Fell, 2000; de Hoog et al., 2000; Lacaz et al., 2002).

1.1. Características microbiológicas de *Rhodotorula* spp.

As leveduras do gênero *Rhodotorula* constituem um grupo heterogêneo de fungos pertencentes à família *Sporidiobolaceae*, ordem *Sporidiales*. As colônias são detectáveis visualmente após 24 a 48 horas de incubação, geralmente exibindo aspecto liso e/ou mucoso, e pigmento carotenóide típico, variando de cor amarelada a avermelhada (FIGURA 1). A temperatura máxima de crescimento varia de 25 °C a 37 °C (Kwon-Chung e Bennett, 1992; Fell e Statzell-Tallman, 2000; de Hoog et al., 2000).

Do ponto de vista bioquímico, não fermentam carboidratos e produzem a enzima urease. O gênero *Rhodotorula* partilha ainda algumas características com o gênero *Cryptococcus*, diferindo-se deste por não assimilar inositol, além da pigmentação característica (Fell e Statzell-Tallman, 2000).

As características microscópicas do gênero incluem: células leveduriformes ovais, esferoidais ou alongadas com brotamento polar ou multilateral; ausência ou formação rudimentar de pseudo-hifa ou hifa e ausência de balistoconídio. Esta última característica a diferencia de outras leveduras do gênero *Sporobolomyces* que exibem pigmentação avermelhada. Algumas espécies podem ainda apresentar-se capsuladas (FIGURA 2).



FIGURA 1. Características macroscópicas de *Rhodotorula* sp.

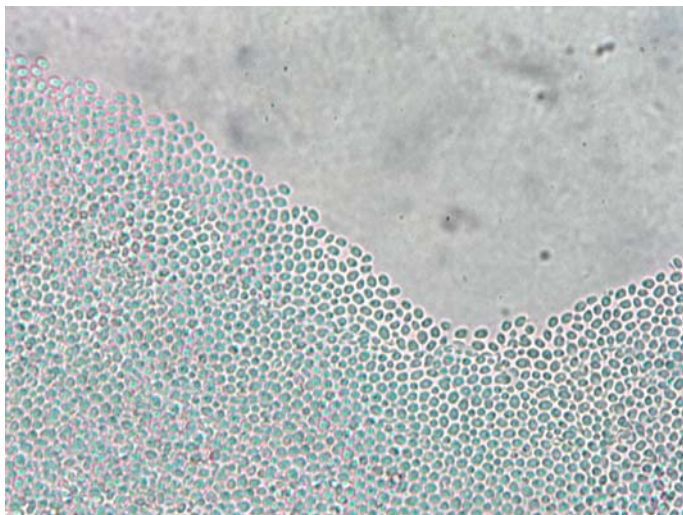


FIGURA 2. Características microscópicas de *Rhodotorula* sp.

O gênero *Rhodotorula* inclui trinta e quatro espécies sendo que apenas três têm sido relacionadas a infecções no homem: *R. mucilaginosa*, *R. glutinis* e *R. minuta*. A diferença entre estas espécies reside no perfil de assimilação de carboidratos e nitrato (Warren e Hazen, 1999; Fell e Statzell-Tallman, 2000).

R. mucilaginosa, nomenclatura atual de espécies previamente designadas *R. rubra* (Fell e Statzell-Tallman, 2000) é a espécie mais frequentemente implicada nas diferentes infecções descritas no homem, seguida de *R. glutinis*. Além da diferença no perfil de assimilação de carboidratos, o teste de assimilação de nitrato auxilia na distinção entre estas espécies sendo positivo apenas para *R. glutinis*.

R. mucilaginosa possui uma longa lista de sinônimos provavelmente devido a variabilidade entre as cepas na utilização de carboidratos. Algumas destas variações podem representar espécies diferentes, uma possibilidade que os estudos de sequenciamento de nucleotídeos devem responder nos próximos anos, possivelmente eliminando alguns dos problemas taxonômicos do gênero *Rhodotorula*.

A identificação correta do gênero e espécie de um fungo é requisito importante para o conhecimento epidemiológico das diferentes infecções fúngicas além de auxiliar na escolha terapêutica, uma vez que alguns fungos apresentam resistência intrínseca aos diferentes antifúngicos disponíveis.

As leveduras são identificadas pelas características macroscópicas e microscópicas da colônia além do perfil bioquímico. O método convencional de assimilação de carboidratos é considerado como referência na identificação das leveduras. Entretanto, é um método trabalhoso com tempo longo de liberação de resultados, inadequado para a rotina de laboratórios de micologia clínica. A miniaturização de testes bioquímicos contendo açúcares-chave e outras provas de identificação representou um avanço para laboratórios de microbiologia clínica, permitindo a identificação das diferentes leveduras em tempos menores (Warren e Hazen, 1999; Freydiere et al., 2001).

Atualmente, inúmeros sistemas comerciais alternativos estão disponíveis para utilização na rotina, tanto métodos manuais como sistemas semi-automatizados, substituindo a utilização do método clássico de rotina.

Cada sistema tem desempenho distinto dos demais e nenhum deles tem 100% de concordância com o método clássico. O banco de dados contendo o perfil de assimilação dos sistemas comerciais difere eventualmente daqueles publicados em livros de referência.

O método manual API 20C AUX e o sistema semi-automatizado Vitek, ambos da bioMérieux (França), constituem exemplos de sistemas comerciais comumente utilizados. O primeiro contém 20 galerias com diferentes carboidratos e os resultados são interpretados visualmente após 48 e 72 horas de incubação, comparando-se a turbidez do crescimento observado com o controle negativo. O segundo utiliza um cartão de identificação contendo 30 poços. Destes, 26 correspondem a diferentes caldos bioquímicos, sendo que quatro poços são utilizados como controle negativo. A mudança de cor é detectada espectrofotometricamente após 24-48 horas de incubação.

1.2. *Rhodotorula* e o meio ambiente

As espécies de *Rhodotorula* são freqüentemente isoladas do solo, água, ar, suco de frutas, laticínios e outros substratos comumente encontrados no ambiente humano tais como cortinas de chuveiro e escovas de dente (Kwon-Chung e Bennett, 1992; Warren e Hazen, 1999).

Vários autores descrevem o isolamento deste fungo em diferentes ecossistemas incluindo locais com condições pouco favoráveis, tais como as profundezas do Mar

Báltico (Ekendahl et al., 2003), lago da Patagônia de alta altitude (Libkind et al., 2004), solo e vegetação da Antártica (Pavlova, 2001) e ambientes aquáticos hipersalinos de alta temperatura como Mar Morto (Israel), Lago Enriquillo (Republica Dominicana) e Great Salt Lake (Estados Unidos) (Butinar et al., 2003).

Em relação ao ambiente hospitalar, *Rhodotorula* foi a levedura mais isolada em diferentes áreas de hospital venezuelano, particularmente na Unidade de Terapia Intensiva (Centeno e Machado, 2004). Casos de pseudo-surto envolvendo a contaminação de equipamento broncoscópico foram relatados na literatura (Hoffman et al., 1989; Withlock et al., 1992; Hagan et al., 1995). Outros relatos incluem contaminação de soluções, quimioterápicos e possível fonte comum de casos de peritonite em pacientes sob diálise peritoneal (Louria et al., 1967; Pien et al., 1980; Eiseberg et al., 1983). Também foi isolada de reservatório de água de ambiente hospitalar e da comunidade (Arvanitidou et al., 1999).

No Brasil, estudos ambientais documentaram a presença de *Rhodotorula* em frutas tropicais (Trindade et al., 2002), plantação de cana de açúcar (de Azeredo et al., 1998) solo amazônico (Mok et al., 1984), em camarões e nas águas da baía de Sepetiba no Rio de Janeiro (Pagnocca et al., 1989). Também foi isolada em ambiente hospitalar na cidade de Recife (de Barros et al., 1990).

No homem, pode colonizar a pele, unha, trato respiratório, genito-urinário e gastrintestinal (Jennings e Benett, 1972; Rose et al., 1977; Ahearn et al., 1966; Khatib et al., 2001; Oyeka e Ugwu, 2002; Nowakowska et al., 2004).

Mais recentemente, em estudo de prevalência de fungos isolados das mãos de estudantes de medicina no Chile, *Rhodotorula mucilaginosa* foi a levedura mais freqüentemente isolada seguida de *Candida parapsilosis* (Silva et al., 2003).

1.3. Estudos de virulência em modelos animais

Estudos realizados em modelos animais demonstraram que leveduras do gênero *Rhodotorula* têm baixa capacidade de persistir e se multiplicar em tecidos de camundongos infectados, mesmo naqueles tratados com corticosteróides, quando comparadas a *Candida* spp. (Louria et al., 1967). Outro estudo demonstrou ainda que, na presença de disseminação, a levedura é prontamente digerida e inativada pelos leucócitos polimorfonucleares (Louria et al., 1960).

1.4. Infecções da corrente sanguínea causadas por *Rhodotorula* spp.

Apenas 13 casos de fungemia por *Rhodotorula* spp. foram relatados entre 1960 e 1990, com um desfecho fatal comprovado em paciente com endocardite bacteriana que evoluiu a óbito sem utilização prévia de antifúngico. Em todos os casos, exceto um, os pacientes apresentavam doenças de base, incluindo câncer, endocardite, doença pulmonar e aids, assim como presença de cateter vascular. A espécie mais prevalente foi *R. mucilaginosa* e a fonte provável da fungemia foi relacionada ao cateter (Louria et al., 1960; Kiehn et al., 1992; Goldani et al., 1995).

Em 1991, Leibovitz et al. relatam mais um caso de fungemia por *R. minuta* em criança de 6 anos com aids e presença de cateter venoso central, que foi a óbito sem recebimento de terapêutica antifúngica e sem remoção de cateter central. O óbito foi considerado como provavelmente relacionado à infecção fúngica.

Braun e Kaufman (1992) reportaram outro caso de fungemia por *R. mucilaginosa* associada à presença de cateter venoso central em uma criança de 2 anos, portadora de

leucemia linfoblástica aguda, que foi submetida apenas a remoção do cateter venoso central, sem uso de antifúngico sistêmico e com boa evolução. Ainda em 1992, Kiehn et al. publicaram 23 de casos de infecção relacionada a cateter central por *Rhodotorula* spp. ocorridos em um grande centro oncológico americano de 1985 a 1989 - a maior casuística da literatura até o momento - relatando um aumento substancial do isolamento desta levedura quando comparado a controles históricos. A grande maioria dos pacientes apresentava doença de base, sendo neoplasia a mais prevalente, além de aids e síndrome do intestino curto. Dois pacientes estavam neutropênicos no momento do isolamento fúngico. O tempo médio de inserção do cateter antes da ocorrência de fungemia foi de 9.3 meses, variando de 1 a 22 meses. Neste estudo, 13 pacientes receberam antifúngicos sistêmicos associados à remoção de cateter, cinco receberam apenas terapêutica antifúngica e cinco pacientes tiveram somente o cateter central removido. Apenas um caso apresentou hemocultura periférica positiva concomitantemente a hemocultura coletada via cateter. A espécie mais prevalente foi *R. mucilaginosa*, isolada em 96% dos casos. Nenhum paciente morreu e nenhum experimentou recorrência de infecção.

Em 1994, Marinova et al. reportaram um caso de fungemia por *Rhodotorula* sp. em um garoto de 13 anos com sinusite complicada com empiema e meningite bacteriana, submetido a procedimento neurocirúrgico para drenagem de empiema subdural, evoluindo com fungemia no décimo dia pós-operatório. A presença de cateter central, cirurgia e uso de imunossupressor foram os principais fatores associados ao desenvolvimento da infecção. O paciente foi inicialmente tratado com miconazol além da retirada de cateter central. O antifúngico foi posteriormente substituído por flucitosina, duas gramas ao dia por três semanas. Não houve relato de recaída durante o período de seguimento realizado por 5 meses.

Ainda neste ano, Sheu et al. (1994) relatam caso de fungemia por *R. glutinis* em paciente com leucemia mielóide aguda não neutropênico, com cateter venoso central e recorrência de infecção, com isolamento fúngico em hemocultura após 5 dias de terapêutica com fluconazol endovenoso, sendo necessário substituição por anfotericina B deoxicolato e retirada de cateter central.

Em 1995, Goldani et al. alertaram para a possibilidade de ocorrência de fungos incomuns em pacientes imunossuprimidos com cateter central, sob utilização de doses terapêuticas ou profiláticas de fluconazol. Descreveram um caso de infecção relacionada a cateter central, inserido 6 meses antes da ocorrência de fungemia por *Rhodotorula minuta* em paciente com aids e doença renal avançada, em uso há trinta dias de 100 mg de fluconazol por dia, devido a episódio de candidíase esofágica. O paciente foi tratado com anfotericina B deoxicolato, 455 mg de dose total, sem remoção de cateter e sem nenhum sinal de recaída após 3 meses de seguimento.

Nos dois anos seguintes, mais dois casos foram publicados: um paciente com leucemia aguda, neutropênico, e outro paciente com aids, com contagem de linfócitos CD4=157 células/mm³. Ambos possuíam cateter venoso central de longa duração e foram submetidos à terapêutica antifúngica com anfotericina B deoxicolato e anfotericina B complexo lipídico, respectivamente. Somente o paciente com aids teve o cateter central removido após 3 dias de uso sistêmico de antifúngico e persistência de febre com hemocultura periférica positiva. Nenhum paciente apresentou recaída ou evoluiu para óbito (Fanci et al., 1997; Lui et al., 1998).

No ano de 2000, Kiraz publica ocorrência de fungemia por *R. mucilaginosa* em paciente com linfoma não-Hodgkin sob quimioterapia, com cateter de longa duração, que evoluiu com neutropenia febril severa e utilização apenas de fluconazol profilático.

Após 7 dias houve clareamento da infecção de corrente sanguínea, concomitante a resolução da neutropenia, sem relato de retirada do dispositivo intravascular ou mudança da terapêutica antifúngica.

O primeiro relato de fungemia transitória por *R. mucilaginosa* em paciente com tumor sólido foi descrito por Samonis et al. em 2001. Tratava-se de paciente com adenocarcinoma avançado de cólon, sob quimioterapia, sem utilização de cateter central, em uso de antibiótico oral duas semanas antes da detecção de fungemia, por exacerbação de doença pulmonar crônica. Evoluiu com neutropenia febril e mucosite severa, resolvidos após 48 horas de admissão hospitalar. Não foi instituída nenhuma terapêutica antifúngica e o trato gastrointestinal foi considerado como fonte provável da fungemia.

Ainda em 2001, Petrocheilou-Paschou et al. relataram outro caso de fungemia por *R. mucilaginosa* em paciente com linfoma não-Hodgkin, sob utilização de fluconazol profilático (200 mg por dia) e ciprofloxacina. No primeiro dia pós-transplante de medula óssea o paciente evoluiu com neutropenia e febril após três dias. Foi iniciado anfotericina B lipossomal após hemocultura positiva para levedura. Após 72 horas de terapêutica, o paciente persistiu febril a despeito de resolução de neutropenia. O cateter venoso central foi então removido e o paciente evoluiu afebril, sem outras intercorrências.

Hsueh et al. (2003) descrevem outro caso de fungemia por *R. glutinis* em paciente com carcinoma de nasofaringe, não neutropênico, após realização de “flush” em cateter central de longa duração. Inicialmente não foi valorizado isolamento fúngico. Somente após recorrência de febre e múltiplos isolamentos em hemocultura foi iniciado tratamento com fluconazol 200 mg por dia. Foi aumentada a dose do antifúngico

utilizado devido à persistência da febre, tendo o paciente evoluído afebril. O cateter venoso central foi removido após 17 dias do início do tratamento.

Ainda em 2003, a segunda maior série de casos foi publicada por Zaas et al., com 10 casos de fungemia por *Rhodotorula* spp. ocorridos em hospital terciário norte-americano no período de 1992 a 2001. Entretanto, não há uma descrição mais detalhada sobre variáveis clínicas de interesse e tratamento como no estudo publicado por Kiehn et al. em 1992. As espécies isoladas foram *R. mucilaginosa* e *R. glutinis*, em oito e dois casos respectivamente. Todos os pacientes, exceto um, apresentavam alguma doença de base como cardiopatia congênita, aids, neoplasia e doença intestinal crônica, um caso de transplante pulmonar e outro de medula óssea. Todos também utilizavam cateter venoso central e apenas dois estavam neutropênicos. Cinco pacientes estavam em uso de nutrição parenteral. Informação sobre a retirada de cateter venoso central foi obtida em nove pacientes, sendo que apenas três não retiraram cateter, mas receberam antifúngico sistêmico: fluconazol seguido de anfotericina B deoxicolato (um caso) e anfotericina B deoxicolato (dois casos). Dentre os seis pacientes que retiraram cateter central, três foram tratados com fluconazol endovenoso; um com anfotericina B complexo lipossomal e outro com anfotericina B deoxicolato e apenas um não recebeu terapêutica antifúngica. Não há dados sobre tempo de tratamento ou dose. Não houve relato de recorrência ou óbito.

Também em 2003, um caso de fungemia recorrente associada a cateter em um período de um ano, foi relatado em paciente com artrite reumatóide juvenil e síndrome do intestino curto, sob utilização prolongada de nutrição parenteral. No primeiro episódio, o cateter central foi removido e o paciente tratado com fluconazol endovenoso 400 mg/dia, por duas semanas, sendo inserido novo cateter de longa duração. Após 11

meses, houve novo episódio de fungemia, sem evidência de endocardite e o cateter central foi retirado. O paciente foi tratado com sucesso com anfotericina lipossomal por duas semanas (Lo Re et al., 2003).

Na América Latina, Silva et al.* (1989) *apud* Colombo et al. (1997), relataram cinco casos de fungemia por *Rhodotorula*.

No Brasil, Nucci et al. (1995) em estudo prospectivo de infecções fúngicas em pacientes neutropênicos, mencionaram a ocorrência de um caso de infecção por *R. mucilaginosa*. Colombo et al. (1997) descreveram o primeiro caso de fungemia por *R. glutinis* em um paciente de 11 anos com recaída de leucemia linfóide aguda, neutropênico febril e com cateter de longa duração inserido há seis meses da admissão hospitalar, sob quimioterapia e antibioticoterapia de amplo espectro. O paciente evoluiu a óbito, a despeito da utilização de anfotericina B deoxicolato 0,5-1 mg/kg com isolamento de outros patógenos em hemocultura, sangramento e choque cardiogênico. Em 2000, Costa et al. citaram dois casos de fungemia por *Rhodotorula* sp. em estudo prospectivo de fungemia nosocomial no HC-FMUSP. Em 2005, Pasqualloto et al. descreveram mais três casos de fungemia por *Rhodotorula* sp. em crianças com câncer e neutropenia pós-quimioterapia. Todas receberam tratamento com anfotericina B, apenas uma não removeu cateter central e todas sobreviveram ao episódio.

* Silva J, Laborda RR, Almedro G, Salim R. *Rhodotorula glutinis* y *Rhodotorula rubra*: Agestes de micosis oportunistas en el hombre. *Boletín Micológico*. 1989; 4: 171.

Pode-se observar nos diferentes estudos publicados, uma grande diversidade quanto à modalidade terapêutica utilizada, uso de antifúngico sistêmico (dose total e duração) e remoção ou não de cateter central com desfechos variados em termos de clareamento de infecção.

Não há até o momento uma recomendação definitiva para tratamento destas infecções, mas a utilização de anfotericina B associada à remoção de cateter venoso é recomendada por alguns autores para prevenir ocorrência de infecção mais grave (Samonis et al., 2001; Petrocheilou-Paschou et al., 2001; Lo Re et al., 2003).

1.5. Teste de sensibilidade *in vitro* a drogas antifúngicas

O aumento na incidência das infecções fúngicas, a expansão do arsenal terapêutico antifúngico e a possibilidade de emergência de resistência a diferentes drogas reforçaram a necessidade de desenvolvimento de um teste de sensibilidade aos antifúngicos que tivesse aplicabilidade clínica (Pfaller et al., 1997; Rex et al., 2001).

Estudos prévios demonstraram uma variação de até 512 vezes nos resultados das concentrações inibitórias mínimas quando os laboratórios empregaram um protocolo único não padronizado e de até 50.000 vezes quando utilizaram metodologia arbitrária para o teste (Calhoun et al., 1986; Galgiani et al., 1987).

Esforços foram realizados para superar os problemas de variabilidade intralaboratorial e interlaboratorial e, após quase duas décadas de pesquisa, o *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) aprovou em 1997, padronização para teste de sensibilidade a antifúngicos pelo método de diluição em caldo para leveduras *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans*, documento M27-A. Em

2002, com o documento M27-A2 (NCCLS, 2002), sugestões para implementações no procedimento do teste foram incluídas, além de interpretações dos resultados e intervalos de concentrações para novas drogas antifúngicas, como voriconazol e caspofungina.

Embora tenha representado avanço considerável, algumas limitações relacionadas às condições do teste e às correlações *in vivo* - *in vitro* dos pontos de corte sugeridos para diferentes combinações de droga-microrganismo ainda persistem. Neste momento, a combinação droga-levedura com maior correlação *in vivo* - *in vitro* é fluconazol e *Candida* (Rex et al., 2001; Rex e Pfaller, 2002).

Apesar das limitações, a padronização proposta pelo NCCLS é considerada o método de referência para os testes de sensibilidade aos antifúngicos, devido à boa reprodutibilidade intralaboratorial e interlaboratorial (Rex et al., 2001; Cuenca-Estrella e Rodriguez-Tudela, 2001).

O grupo europeu para teste de sensibilidade aos antifúngicos, *European Committee for Antimicrobial Testing* (EUCAST) propôs algumas modificações no teste de sensibilidade aos antifúngicos para leveduras em relação ao método de referência do NCCLS, como a adição de 2% de glicose ao meio de cultura utilizado, um inóculo maior e determinação das concentrações inibitórias mínimas com uso de espectrofotômetro (Cuenca-Estrella et al., 2001; Rodriguez –Tudela et al., 2001).

Cuenca-Estrella et al. (2001, 2002) demonstraram uma boa concordância entre os métodos NCCLS (1997, 2002) e EUCAST (2002), variando entre 92% e 96,8%, dependendo da combinação droga-levedura, além de reprodutibilidade interlaboratorial (Cuenca-Estrella et al., 2003).

Atualmente existem dois testes disponíveis comercialmente para avaliação da sensibilidade aos antifúngicos, com boa correlação geral com o método de referência: o Etest[®] (AB Biodisk, Suécia) e o Sensititre[®] YeastOne[®] (Trek Diagnostic Systems, EUA). O primeiro é um método de gradiente de difusão de concentração de droga em meio sólido e o segundo, um método de microdiluição colorimétrico. Estes métodos são mais adequados para a rotina de laboratórios clínicos devido a facilidade de execução, embora dificuldades para determinação das concentrações inibitórias mínimas também tenham sido observadas (Colombo et al., 1995; Espinel-Ingroff et al., 1999; Chryssanthou, 2001; Morace et al., 2002).

Os resultados obtidos nos testes de sensibilidade *in vitro*, caracterizando padrões de concentrações inibitórias mínimas aos diferentes antifúngicos, também constituem uma informação valiosa para a caracterização microbiológica de fungos menos comuns.

Não há padronização específica do teste de sensibilidade para leveduras do gênero *Rhodotorula*, mas devido a características partilhadas com o gênero *Cryptococcus*, ambos heterobasidiomicetos, têm sido testadas através do protocolo proposto pelo NCCLS para *Cryptococcus neoformans* (Espinel-Ingroff, 1998; Barchiesi et al., 2000; Zaas et al., 2003; Diekema et al., 2005).

Embora existam poucos trabalhos publicados sobre o perfil de sensibilidade aos antifúngicos para espécies de *Rhodotorula* utilizando metodologia padronizada, concentração inibitória mínima elevada para fluconazol já foi observada por diferentes autores, mesmo aqueles que utilizaram outras metodologias (Kiehn et al., 1992; Goldani et al., 1995; Kiraz et al., 2000).

Espinel-Ingroff (1998) avaliou cinco cepas de *R. mucilaginosa* através do método de microdiluição em caldo de acordo com as recomendações do NCCLS de 1997. As

concentrações mínimas que inibiram 50% (MIC₅₀) dos isolados e os correspondentes intervalos de variação foram de 2 µg/mL (0,25 - 4 µg/mL) para itraconazol, 4 µg/mL (0,25 - 4 µg/mL) para voriconazol e > 64 µg/mL (0,5 - > 64 µg/mL) para fluconazol, respectivamente.

Galan-Sanchez et al. (1999) estudaram 35 cepas de *Rhodotorula* spp. isoladas de pele, cabelo, unhas, urina e escarro. O teste de sensibilidade utilizado foi o sistema comercial colorimétrico Sensititre[®] YeastOne[®] (Trek Diagnostic Systems, EUA) com determinação da concentração inibitória mínima após 72 horas de incubação a 35 °C. Para flucitosina, o intervalo de concentração inibitória mínima obtido foi de 0,064 -0,25 µg/mL, para anfotericina de 0,125 - 0,5 µg/mL, para itraconazol de 0,25-1 µg/mL e para fluconazol de 32 - > 256 µg/mL.

Barchiesi et al. (2000) avaliaram a atividade *in vitro* de diferentes antifúngicos frente a sete cepas de *R. mucilaginosa* isoladas de diferentes amostras clínicas. Foi utilizado o método de microdiluição em caldo de acordo com o NCCLS (1997), com determinação de concentração inibitória mínima após 72 horas de incubação a 35 °C, considerando a diluição que inibiu 80% do crescimento em relação ao controle. Os valores encontrados foram 2 - > 4 µg/mL (MIC₅₀ 1µg/mL) para itraconazol, 2 - > 4 µg/mL (MIC₅₀ 2 µg/mL) para voriconazol, e ≥ 64 µg/mL (MIC₅₀ > 64 µg/mL) para fluconazol.

Petrocheilou-Pachou et al. (2001) encontraram os seguintes valores de concentração inibitória mínima para cepa de *R. mucilaginosa* isolada de sangue: anfotericina B – 0,25 µg/mL, flucitosina – 0,06 µg/mL, itraconazol – 1 µg/mL e fluconazol > 256 µg/mL. Foi utilizado o sistema comercial Sensititre[®] YeastOne[®] (Trek Diagnostic Systems, EUA) com determinação da concentração inibitória mínima após 72 horas de incubação a

37°C. Ainda neste ano e utilizando este sistema comercial, Garcia-Martos et al. (2001) avaliaram seis cepas de *Rhodotorula* spp. isoladas de amostras clínicas, com determinação da concentração inibitória mínima após 24-48 horas de incubação a 35 °C, cujos resultados foram os seguintes: anfotericina B = 0,125 – 0,5 µg/mL, fluconazol = 64 - > 256 µg/mL, itraconazol = 0,03 - 0,5 µg/mL e flucitosina = 0,06 - 0,25 µg/mL.

Zaas et al. (2003) avaliaram 10 cepas de *Rhodotorula* spp. (duas *R. glutinis* e oito *R. mucilaginosa*) isoladas de sangue utilizando metodologia padronizada (macrodiluição em caldo) de acordo com as recomendações do NCCLS M27-A (NCCLS, 1997). O seguinte perfil de sensibilidade aos diferentes antifúngicos foi encontrado, considerando 100% de inibição para anfotericina B e 80% para as outras drogas: anfotericina B = 0,25 - 1 µg/mL; flucitosina = 0,125 - 0,25 µg/mL; fluconazole = 32 - > 64 µg/mL; itraconazole = 0,5 - 4,0 µg/mL; voriconazole = 1 - > 8 µg/mL; posaconazole = 0,5-2 µg/mL; caspofungina = 16 - > 16 µg/mL e micafungina > 16 µg/mL. Não houve variação maior ou menor do que uma diluição nos resultados obtidos entre as duas espécies para as drogas testadas.

Ainda em 2003, Hsueh et al. relataram um caso de fungemia recorrente por *R. glutinis* e realizaram teste de sensibilidade aos antifúngicos utilizando metodologia recomendada pelo NCCLS (1997) e Etest[®] (AB Biodisk, Suécia), com determinação da concentração inibitória mínima após 48 horas de incubação a 37 °C. Os valores encontrados foram 0,125 µg/mL para anfotericina, 8 µg/mL para itraconazol e > 256 µg/mL para fluconazol, sendo os resultados idênticos em ambas as metodologias.

Nos últimos dois anos foram publicados outros trabalhos sobre a atividade *in vitro* de drogas antifúngicas e leveduras do gênero *Rhodotorula*, com maior número de cepas

avaliadas (Preney et al., 2003; Serena et al., 2004, Gomez-Lopez et al., 2005, Diekema et al., 2005).

Preney et al. (2003) e Serena et al. (2004) não especificaram o sítio de isolamento da levedura e não precisaram o tempo de incubação utilizado para determinação de concentração inibitória mínima.

Gomez-Lopez et al. (2005) utilizaram as recomendações sugeridas pelo EUCAST (2002), entretanto com incubação a 30 °C, agitação de placas e determinação de concentração inibitória mínima após 48 horas de incubação. Foram avaliadas 29 cepas isoladas de diferentes materiais clínicos, sendo 12 provenientes de sangue. Apenas quatro cepas foram identificadas como *R. glutinis*.

Diekema et al. (2005) avaliaram 69 cepas de *Rhodotorula* spp., a maioria proveniente de amostras clínicas, sendo 28 isoladas de sangue, a maior casuística da literatura até o momento. O método utilizado foi microdiluição em caldo de acordo com o documento M27-A2 (NCCLS, 2002) e as concentrações inibitórias mínimas determinadas visualmente após 72 horas de incubação, sem agitação das placas.

Os principais resultados destes estudos estão ilustrados na TABELA 1, além dos dois maiores trabalhos publicados previamente.

TABELA 1 - Resumo dos principais resultados publicados sobre a atividade *in vitro* de diferentes antifúngicos e *Rhodotorula* spp.

Referência	Método	Espécie (n)	Antifúngico	MIC (µg/mL)
Galan –Sanchez et al., 1999	Sensititre [®] YeastOne [®]	<i>R. mucilaginosa</i> (14) <i>R. glutinis</i> (13) <i>R. minuta</i> (6)	Anfotericina B	0,125-0,5
			Flucitosina	0,06-0,25
			Fluconazol	32- > 256
			Itraconazol	0,25-1
			Cetoconazol	0,125-0,25
Zaas et al., 2003	M27-A	<i>R. mucilaginosa</i> (8) <i>R. glutinis</i> (2)	Anfotericina B	0,25-1
			Flucitosina	0,125-0,25
			Fluconazol	32- > 64
			Itraconazol	0,5-4
			Voriconazol	1- > 8
Preney et al., 2003	Etest [®]	<i>R. mucilaginosa</i> (21) <i>R. glutinis</i> (9)	Fluconazol	≥ 256
			Itraconazol	3 - ≥ 32
Serena et al., 2004	M27-A2	<i>R. glutinis</i> (10)	Anfotericina B	0,125-0,5
			Fluconazol	> 128
			Itraconazol	1-16
			Voriconazol	1-8
			Ravuconazol	0,06-0,5
Gomez - Lopez et al., 2005	EUCAST	<i>R. mucilaginosa</i> (25) <i>R. glutinis</i> (4)*	Anfotericina B	0,03-8
			Flucitosina	0,06-> 64
			Fluconazol	8- > 64
			Itraconazol	0,06- > 8
			Voriconazol	0,25-8
			Ravuconazol	0,03-8
			Itraconazol *	0,12 - ≥ 8
Diekema et al., 2005	M27-A2	<i>R. mucilaginosa</i> (24) <i>R. glutinis</i> (29)	Anfotericina B	0,5-2
			Flucitosina	≤ 0,06-0,5
			Caspofungina	8-16
			Fluconazol	32 ≥ 64
			Itraconazol	0,5-16
			Posaconazol	0,5-16
			Ravuconazol	≤ 0,06-2
			Voriconazol	0,25-2

NOTA: * Intervalo de concentração inibitória mínima de itraconazol para *R. glutinis*

1.6. Aplicação dos métodos moleculares na avaliação de isolados fúngicos

Nas últimas duas décadas observou-se um avanço significativo nas técnicas moleculares, com inúmeras aplicações em diferentes áreas da ciência.

O desenvolvimento dos métodos de tipagem de DNA para infecções fúngicas foi motivado em parte, pelo aumento destas infecções ocorrido nos últimos anos e pela necessidade de elucidar questões epidemiológicas em um cenário específico, como por exemplo, a investigação de surtos.

Atualmente, os estudos epidemiológicos de patógenos nosocomiais requerem a identificação ao nível de espécie e subtipos sempre que possível, para melhor caracterização dos processos infecciosos e modos de transmissão (Pfaller, 2000). Neste sentido, os métodos de tipagem molecular têm sido muito utilizados, uma vez que os métodos fenotípicos empregados na rotina laboratorial, carecem de poder discriminatório adequado para propósitos epidemiológicos.

Os métodos de tipagem molecular constituem uma ferramenta útil para avaliar o grau de relação genética de isolados de uma mesma espécie e identificar possíveis fontes de infecção e surtos. Além disso, pode-se avaliar se uma infecção representa uma recidiva ou re-infecção e monitorizar a emergência de cepas resistentes a drogas antifúngicas (Pfaller, 2000; Soll, 2000).

De forma geral, se os isolados são classificados como diferentes por pelo menos um método molecular de tipagem, pode-se assumir que representem subtipos diferentes. Se os isolados são classificados como iguais, pode-se assumir a ocorrência de infecção

cruzada ou que os pacientes foram expostos a uma fonte comum de infecção (Pfaller, 2000).

A análise filogenética molecular baseada no sequenciamento de genes constitui outro exemplo de aplicação dos métodos moleculares no campo da micologia. Os esquemas de classificação de um fungo devem ir além dos testes fenotípicos tradicionalmente utilizados na rotina do laboratório clínico (Soll, 2000; McGinnis e Nunn, 2003).

Essa análise molecular é utilizada para determinar o parentesco de um microorganismo e inseri-lo num fluxograma de descendência evolucionária. É parte implícita de sistematização e agrupamento de microrganismos em uma hierarquia taxonômica baseada em inter-relações filogenéticas propostas.

O sequenciamento genético tem permitido a identificação e reclassificação de fungos distintos previamente classificados como filogeneticamente relacionados. Além do valor intelectual do conhecimento das inter-relações filogenéticas, existem outras aplicações destas informações na micologia médica (McGinnis e Nunn, 2003). Entre elas, a possibilidade de escolha do antifúngico adequado no tratamento de infecções fúngicas causadas por microrganismos pouco comuns, uma vez que foi demonstrada uma relação entre sensibilidade a antifúngicos e filogenia (McGinnis, Passarelli; 1998). O conhecimento da identidade do fungo e sua relação filogenética com outros fungos podem assim auxiliar na escolha adequada de terapêutica.

Embora a disponibilização das técnicas de tipagem de DNA propiciaram uma ferramenta útil para avaliar o grau de relação genética de isolados de uma mesma espécie e identificar possíveis fontes de infecção, os diferentes métodos apresentam vantagens e limitações dependendo do cenário em que são aplicados.

A digestão de moléculas de DNA por enzimas de restrição (Restriction Enzyme Assay- REA), a amplificação aleatória de segmentos de DNA (Randomly Amplified Polymorphic DNA- RAPD), a análise de cromossomos intactos (cariótipo eletroforético) através da eletroforese em campo pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis-PFGE) são métodos freqüentemente utilizados na caracterização genotípica de fungos. Todos estes métodos têm em comum a análise de moléculas intactas ou digeridas de DNA ou fragmentos de DNA amplificados, visualizadas como bandas em géis de agarose após a corrida eletroforética.

Com o desenvolvimento da cariotipagem eletroforética, fragmentos de cromossomo do genoma das leveduras puderam ser prontamente separados em gel de agarose. As células são expostas a enzimas para quebrar a parede celular e então embebidas em blocos de agarose. Detergentes e proteases são adicionados e as células são incubadas para remoção de membranas e proteínas digeridas. O gel de agarose protege as moléculas de DNA. Os fragmentos cromossômicos de DNA são separados de acordo com o tamanho, decorrente da alteração periódica do campo elétrico. Este método permite a comparação de DNA cromossômico com perfis bem mais simples do que aqueles gerados por enzimas de restrição, constituindo um método útil na identificação de surtos de microrganismos. O poder discriminatório do teste foi aumentado com a incorporação de endonucleases antes da corrida eletroforética (Soll, 2000).

Entretanto, apesar do avanço da biologia molecular, poucos estudos foram publicados abordando a caracterização molecular de espécies de *Rhodotorula*, sendo que apenas dois envolveram tipagem molecular de isolados clínicos.

Hsueh et al. (2003) compararam cepa de *R. glutinis* isolada de hemocultura coletada de cateter central e de sangue periférico, durante mesmo episódio de fungemia ocorrido

em paciente oncológico, através da técnica de RAPD utilizando três primers: M13, OPH-15, e OPH-19.

Saracli et al. (2004) publicaram o primeiro trabalho de genotipagem utilizando eletroforese em campo pulsado e RAPD em cepas de *Rhodotorula mucilaginosa*. Seis isolados clínicos foram avaliados: cinco cepas isoladas de sangue, representando três instituições diferentes, e uma cepa isolada de secreção prostática. As cinco amostras sanguíneas revelaram o mesmo genótipo pelos dois métodos, PFGE e RAPD. A amostra urológica foi considerada diferente das outras. Entretanto, o autor não comenta quais os foram os critérios utilizados para determinação dos genótipos. Ambos os métodos foram reprodutíveis.

1.7. Justificativa

A ocorrência de infecções causadas por fungos incomuns, dentre os quais *Rhodotorula* spp., tem sido cada vez mais relatada, especialmente na crescente população de pacientes imunossuprimidos. Familiaridade com os aspectos microbiológicos, epidemiológicos e opções terapêuticas são necessários para o manuseio adequado das infecções causadas por estes microrganismos.

Além disso, a aplicação de métodos moleculares na caracterização destes agentes pode auxiliar na investigação de futuros surtos nosocomiais.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Principais

Relatar a ocorrência de *Rhodotorula* spp. em pacientes acompanhados no Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) entre janeiro de 1996 e dezembro de 2004:

2.1.1. Caracterizar clinicamente os pacientes acompanhados no HC-FMUSP que apresentaram hemocultura positiva para *Rhodotorula* spp.;

2.1.2. Identificar as espécies de *Rhodotorula* isoladas de hemocultura;

2.1.3. Determinar as concentrações inibitórias mínimas (MIC) de fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B frente às cepas de *Rhodotorula* spp. isoladas de hemocultura empregando-se método padronizado baseado na microdiluição em caldo.

2.2. Objetivos Secundários

2.2.1. Comparar o desempenho de dois diferentes métodos comerciais para identificação das espécies de *Rhodotorula*.

2.2.2. Comparar os resultados dos dois métodos de teste de sensibilidade aos antifúngicos.

2.2.3. Caracterizar as cepas isoladas de *Rhodotorula* spp. do ponto de vista molecular.

MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1. Local

O estudo foi realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) entre janeiro de 1996 e dezembro de 2004.

O HC-FMUSP é um hospital público universitário, de complexidade terciária, localizado na região central da cidade de São Paulo e que atende, em sua grande maioria, pacientes conveniados ao Sistema Único de Saúde (SUS), com uma pequena parcela de pacientes com convênios privados.

O complexo HC-FMUSP é formado por seis institutos e dois hospitais auxiliares possuindo cerca de 2.200 leitos propiciando assistência à saúde a uma população diversa, incluindo pacientes transplantados de órgão sólido e medula óssea, entre outros pacientes imunossuprimidos.

O Instituto Central do HC-FMUSP (ICHC-FMUSP) é o maior deles, com aproximadamente 950 leitos divididos em 18 enfermarias clínicas e 13 cirúrgicas de diversas especialidades; cinco unidades de pronto atendimento (PA); duas unidades de transplante de órgão sólido (renal e hepático); uma unidade de transplante de medula óssea; 15 unidades de terapia intensiva (UTI) e um berçário. Possui ainda um prédio anexo, Prédio de Ambulatórios (PAMB), onde estão localizadas duas unidades de hospital-dia: o ambulatório do transplante de medula óssea (ATMO) e ambulatório de quimioterapia (AQTDH).

O Instituto do Coração (INCOR) possui cerca de 460 leitos, realizando entre outros procedimentos, transplante de pulmão e medula óssea. O Instituto da Criança (ICR) possui cerca de 120 leitos.

3.2. Desenho do estudo

Realizou-se um estudo epidemiológico observacional, retrospectivo, do tipo série de casos, no qual foram descritos pacientes acompanhados no complexo HC-FMUSP com isolamento de *Rhodotorula* spp. de hemocultura no período de janeiro de 1996 a dezembro de 2004.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do HC-FMUSP.

3.3. Identificação dos pacientes

A identificação dos pacientes que apresentaram hemocultura positiva para leveduras do gênero *Rhodotorula* durante o período avaliado foi realizada através do banco de dados do sistema de informação laboratorial - HCLAB - e de registros internos do Setor de Micologia da Seção de Microbiologia da Divisão de Laboratório Central (DLC).

A partir desta listagem, os prontuários dos pacientes identificados foram revisados nas Divisões de Arquivo Médico dos respectivos Institutos. Informações adicionais também foram obtidas a partir de registros internos arquivados nas

diferentes clínicas, nas Comissões de Infecção Hospitalar, no HCLAB e no sistema informatizado de gerenciamento hospitalar (SIGH).

3.4. Identificação das cepas viáveis para avaliação microbiológica e molecular

O Setor de Micologia da Seção de Microbiologia da DLC constituiu um banco de cepas em janeiro de 1996 com o intuito de armazenar isolados de hemocultura e de outros sítios estéreis, para suporte a estudos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais.

Após a identificação dos pacientes que apresentaram hemocultura positiva para *Rhodotorula* spp. no período estudado, verificou-se a presença, viabilidade e pureza destas leveduras no Banco de Cepas do Setor de Micologia para inclusão no estudo de avaliação microbiológica e molecular.

3.5. Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os pacientes dos quais não foi possível obter as informações necessárias à descrição clínica dos casos, segundo as variáveis de interesse descritas abaixo.

3.6. Microbiologia

3.6.1. Coleta e processamento das hemoculturas

As hemoculturas foram coletadas a critério clínico do médico assistente e processadas no sistema automatizado Bactec 9240™ (Becton Dickinson, EUA) utilizando-se os frascos Bactec™ Plus + Aerobic/F, Plus + Anaerobic/F e PEDS-Plus/F, conforme rotina da Seção de Microbiologia da DLC do HC-FMUSP.

Os frascos de hemocultura permaneceram incubados a 35 °C, sob agitação e monitorização contínua por 5 dias. As amostras positivas foram submetidas à coloração de Gram e semeadas nos meios de ágar sangue, ágar chocolate e ágar MacConkey. Nos casos onde a coloração de Gram revelou presença de levedura na amostra, o ágar Sabouraud também foi utilizado.

3.6.2. Identificação das cepas

As cepas isoladas foram inicialmente avaliadas de acordo com a rotina laboratorial e identificadas através do sistema automatizado Vitek (bioMérieux, EUA), cartão YBC, de acordo com as recomendações do fabricante. Provas bioquímicas adicionais e estudo micromorfológico foram realizados conforme necessário.

As cepas de *Rhodotorula*, armazenadas no banco de cepas do Setor de Micologia em ágar infusão cérebro-coração (OXOID, EUA) contendo 20% de

glicerol, a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, foram repicadas em ágar batata (OXOID, EUA) e CRHOMagar™ Candida (CRHOMagar Company, França) para verificação de pureza e viabilidade.

Os isolados viáveis e puros foram submetidos à reidentificação através do sistema manual de identificação de leveduras API 20C AUX (bioMérieux, EUA), além do sistema Vitek (bioMérieux, EUA). Os resultados discordantes entre as duas metodologias, Vitek e API 20C AUX, foram repetidos.

Todas as cepas também foram avaliadas quanto a aspectos macroscópicos da colônia, produção de urease, crescimento a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e ausência de pseudo-hifa e balistoconídio no estudo micromorfológico em ágar fubá (OXOID, EUA).

Paralelamente, todas as cepas foram enviadas ao Laboratório de Micologia do Instituto Adolfo Lutz para realização de prova convencional de assimilação de carboidratos e nitrato de acordo com Wickerham e Burton (1948). Os seguintes carboidratos foram avaliados: galactose, sacarose, maltose, celobiose, trealose, lactose, melibiose, melezitose, xilose, ramanose, eritritol, galactitol, inositol e peptona.

3.6.3. Teste de sensibilidade *in vitro* a drogas antifúngicas

O teste de sensibilidade aos antifúngicos foi realizado no Laboratório de Micologia do Instituto Adolfo Lutz, de acordo com as recomendações do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), documento M27-A2 (NCCLS, 2002) - considerado como método de referência - e também, segundo o documento E. Dis. 7.1 (EUCAST, 2002); ambos através do método de microdiluição em caldo.

Drogas antifúngicas

As cepas de *Rhodotorula* foram avaliadas quanto ao perfil de sensibilidade frente às seguintes drogas antifúngicas: anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol.

Os sais puros dos antifúngicos fluconazol e voriconazol (Pfizer INC, EUA), itraconazol (Janssen Pharmaceutica, EUA) e anfotericina B (Bristol-Myers Squibb, EUA), foram obtidos comercialmente ou através de doações dos respectivos laboratórios fabricantes.

Para preparo das soluções-mãe, as drogas foram diluídas em água (fluconazol) ou dimetil sulfóxido (anfotericina B, itraconazol e voriconazol) em concentrações 10 a 100 vezes maiores do que a maior concentração desejada para o teste final e armazenadas a -70 °C por um período máximo de 6 meses.

A concentração desejada da droga no preparo da solução-mãe foi obtida empregando-se a fórmula:

$$\text{Volume (mL)} = \frac{\text{peso (mg)} \times \text{potência do antifúngico } (\mu\text{g/mg})}{\text{concentração desejada } (\mu\text{g/mg)}}$$

Preparação das placas de microdiluição

Microplacas de fundo plano, contendo 96 orifícios, previamente esterilizadas, foram preparadas para cada antifúngico de acordo com as recomendações adotadas (NCCLS, 2002). Uma solução de trabalho foi obtida a partir da solução-mãe (diluição 1:5), com diluições seriadas das drogas em meio de RPMI 1640 (Sigma,

EUA) estéril e tamponado com ácido morfolinepropanesulfônico (MOPS), preparadas de forma a alcançar uma concentração final 2 vezes maior que a concentração desejada para o teste de sensibilidade.

Alíquotas de 100 μ l das concentrações finais obtidas foram dispensadas nos orifícios das colunas 2 a 11 das placas, de tal forma que a coluna dois contivesse a concentração mais alta do antifúngico e a 11, a mais baixa (Figura 3). Após a adição de 100 μ l do inóculo (ver descrição abaixo) nos orifícios, foram obtidas as concentrações desejadas para cada antifúngico, com intervalos de: 64 μ g/mL - 0,125 μ g/mL para fluconazol e de 8 μ g/mL - 0,016 μ g/mL para itraconazol, voriconazol e anfotericina B.

As placas confeccionadas foram devidamente etiquetadas, seladas com película estéril, tampadas e armazenadas, por um período máximo de 6 meses, a temperatura de -70°C até o momento do uso. As placas contendo as soluções de anfotericina B foram embaladas com papel de alumínio, ao abrigo da luz.

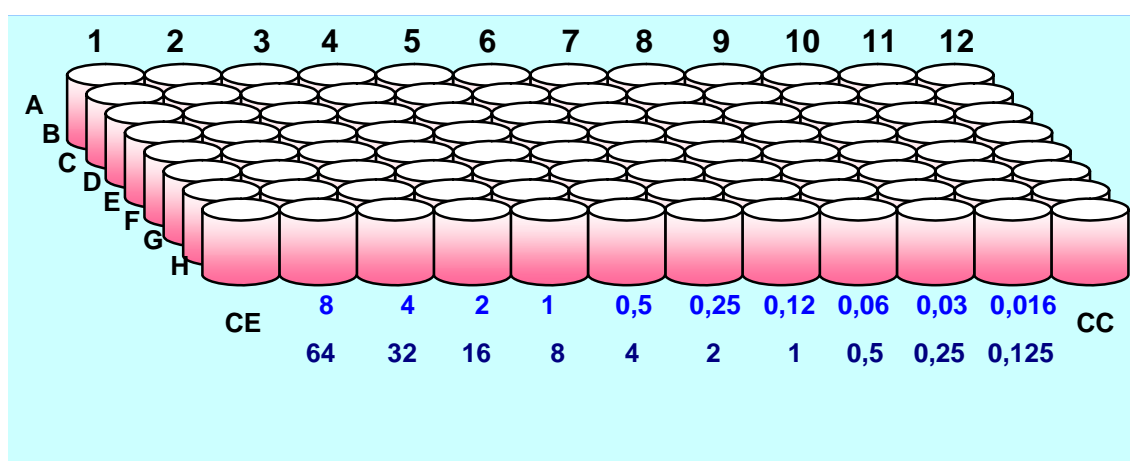


FIGURA 3. Esquema de distribuição das soluções de antifúngicos em placas de microtitulação para teste de sensibilidade

As colunas um e 12 não receberam diluições de antifúngicos, ficando reservadas para os controles de crescimento (CC) e esterilidade (CE), conforme descrição abaixo.

Preparação do Inóculo

O inóculo foi preparado de acordo com as recomendações do NCCLS, 2002. Resumidamente, as cepas disponíveis foram repicadas em ágar Sabouraud e incubadas por 24-48 horas a 35°C para garantir pureza e viabilidade. Aproximadamente cinco colônias, medindo cerca de 1 mm de diâmetro, foram ressuspensas em 5 mL de solução salina estéril a 0,85%. A suspensão foi agitada vigorosamente e sua densidade ótica ajustada (por diluição) para o padrão 0,5 da escala de McFarland, determinada com a utilização de um turbidímetro (Hach Company, EUA). A concentração do inóculo assim preparado corresponde a $1-5 \times 10^6$ células de levedura por mL. A escala de MacFarland empregada foi obtida comercialmente (OXOID, EUA) e utilizada de acordo com as recomendações do fabricante.

A seguir, foi realizada uma diluição 1:50 seguida de outra diluição 1:20 em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS, sem bicarbonato e com L-glutamina (Sigma, EUA), obtendo-se o inóculo desejado de $1-5 \times 10^3$ células por mL. Com a adição de 100 µl do inóculo de cada cepa aos orifícios de cada fileira (A - F) das colunas 2 a 11 das microplacas previamente preparadas - contendo diferentes concentrações do antifúngico a ser testado - as concentrações finais desejadas do inóculo ($0,5 - 2,5 \times 10^3$ UFC/mL) e do antifúngico foram obtidas. As fileiras G e H foram reservadas para as cepas padrão para o controle de qualidade.

O controle de crescimento (CC) foi verificado nos orifícios da coluna 12, nos quais 100 µL do inóculo foram adicionados a 100 µL de meio RPMI 1640 (Sigma, EUA), livre de antifúngico (Figura 3).

O controle de esterilidade (CE) do meio de cultura foi verificado em todos os orifícios da coluna 1, nos quais foram adicionados somente 200 µL de meio RPMI 1640 (Sigma, EUA), utilizado na preparação do inóculo, livre de antifúngicos e de leveduras (Figura 3).

Modificações realizadas para adequação ao protocolo EUCAST

As principais modificações realizadas para adequação ao protocolo EUCAST (2002) em relação aos procedimentos descritos acima - segundo as recomendações do NCCLS (2002) - foram relacionadas ao meio de crescimento utilizado e ao preparo do inóculo. O meio de crescimento utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma, EUA) tamponado com MOPS acrescido de 2% de glicose. Na preparação do inóculo, após ajuste inicial da densidade do mesmo para o padrão 0,5 na escala de MacFarland, realizou-se uma diluição 1:10 em meio de RPMI 1640 tamponado contendo 2% de glicose. Desta forma, a concentração final do inóculo preparado continha aproximadamente $1-5 \times 10^5$ células por mL, correspondendo a 100 vezes o inóculo obtido de acordo com o protocolo NCCLS (2002).

Condições de incubação e leitura para determinação das concentrações inibitórias mínimas

As microplacas devidamente inoculadas foram incubadas a 35 °C, sem agitação e as concentrações inibitórias mínimas (MIC) foram determinadas por espectrofotometria a 530 nm (Titertek Multiskan, Suécia) utilizando-se os seguintes critérios: menor concentração de antifúngico que produziu 50% ou mais de inibição de crescimento, quando comparado ao poço controle, para fluconazol, itraconazol e voriconazol; e inibição de 90% para anfotericina B.

Para as cepas controle, as concentrações inibitórias mínimas foram determinadas após 24 horas de incubação (EUCAST, 2002), e após 24 e 48 horas de incubação (NCCLS, 2002).

Foram determinadas ainda as concentrações inibitórias mínimas nas quais 50% (MIC₅₀) e 90% (MIC₉₀) de todas as cepas testadas foram inibidas por cada antifúngico após 72 horas de incubação. O valor modal (mais frequentemente encontrado) e o intervalo de variação das concentrações inibitórias mínimas de cada antifúngico estudado foram também determinados.

Controle de qualidade

O controle de qualidade foi garantido através da utilização das cepas-padrão recomendadas pelo NCCLS, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258, inoculadas nas fileiras G e H de cada placa de microdiluição utilizada nos testes de sensibilidade aos antifúngicos.

3.7. Tipagem Molecular

3.7.1 Eletroforese em campo pulsado

A extração do DNA e a cariotipagem eletroforética das cepas de *Rhodotorula* foram realizadas no Laboratório de Investigação Médica 54 (LIM 54) do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da FMUSP, segundo protocolo proposto por Saracli et al. (2003) com algumas modificações.

De forma sumarizada, após o crescimento da levedura em caldo YEPD por 24 horas, as células foram lavadas com solução salina estéril (solução de cloreto de sódio a 0,9%). Posteriormente foram também lavadas com solução-tampão e tratadas com 250 mg/mL de enzima lítica de *Trichoderma harzianum* (Sigma, EUA, L1412). Ao sedimento de células leveduriformes foi adicionada agarose *low melting* a 2% e a suspensão foi transferida para moldes, os quais foram tratados com 1mg/mL de proteinase K (Invitrogen Life Technologies, EUA). A corrida eletroforética foi realizada em gel de agarose a 1,2% em campo pulsado no equipamento CHEF-DR II (BIO-RAD, EUA). Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio a 0,5 µL/mL e fotografado, sob luz ultravioleta, no fototransiluminador (Kodak Gel Logic 100 Imaging System, EUA).

Como marcador de peso molecular, foi utilizado o DNA cromossômico de *Saccharomyces cerevisiae* (BIO-RAD, EUA) em todas as corridas eletroforéticas, que fornece 15 bandas entre os pesos moleculares 225 e 2200 quilobases (kb).

Como controle foi utilizada uma cepa de *Rhodotorula minuta*, não isolada de sangue, proveniente da micoteca do Instituto Adolfo Lutz.

Após a corrida eletroforética, o perfil de cada isolado foi determinado de acordo com o número e peso molecular das bandas. Classificaram-se os isolados como iguais, quando o número e posição das bandas no gel em relação à origem de aplicação eram idênticos ou como diferentes, quando se diferiram pelo número e/ou posição da banda (Tenover et al., 1995).

3.8. Variáveis estudadas e definições utilizadas

As variáveis e definições adotadas estão descritas abaixo. Quando o dado referente à determinada variável não foi encontrado considerou-se como ignorado.

3.8.1. Variáveis demográficas

Idade: avaliada em anos.

Sexo: classificado como masculino e feminino.

3.8.2. Variáveis relacionadas ao quadro clínico-laboratorial

Unidade de atendimento: unidade de internação ou unidade ambulatorial onde o paciente se encontrava na data da hemocultura positiva.

Doença de base: categorizada de acordo com diagnóstico descrito em prontuário

médico:

- Leucemia
- Linfoma
- Tumor de órgão sólido
- Transplante de órgão sólido
- Transplante de medula óssea
- Grande Queimado
- Aids
- Prematuridade
- Doença cerebrovascular
- Diabetes mellitus
- Hepatopatia
- Cardiopatia
- Outras

Transplante de Medula Óssea: foi considerado o tempo entre o transplante de medula óssea e o isolamento de *Rhodotorula* sp. em hemocultura (em dias) e o tipo de transplante de medula óssea realizado, de acordo com:

- **Autólogo:** transplante realizado com medula óssea do próprio paciente (Burt et al., 1996).
- **Alogênico:** transplante realizado com medula óssea de doador aparentado ou não (Burt et al., 1996).

Comorbidades: foram consideradas as patologias com descrição em prontuário, adicionalmente ao diagnóstico de base, como por exemplo:

- Hipertensão arterial sistêmica
- Diabetes mellitus
- Doença vascular periférica
- Outras

Tempo de internação: período de internação em dias, do primeiro dia de internação hospitalar até a data da primeira hemocultura positiva para *Rhodotorula* sp.

APACHE II: O índice APACHE II (*acute physiology and chronic health evaluation*, Knaus et al., 1985) foi utilizado para classificar os pacientes em função do comprometimento de seu estado clínico. O APACHE II foi calculado preferencialmente no dia da hemocultura positiva para *Rhodotorula* sp. independentemente da localização do paciente (UTI, enfermaria ou ambulatório). Na ausência de dados referentes a sinais vitais, exames laboratoriais ou avaliação na Escala de Glasgow, valores disponíveis 48 horas antes ou depois da hemocultura positiva foram considerados. Foi assumida pontuação zero para os valores faltantes. A temperatura axilar foi considerada, acrescida de um grau para cálculo do APACHE II uma vez que temperatura retal não era disponível. O APACHE II não foi calculado para indivíduos menores de 15 anos e na ausência de dados disponíveis no período considerado.

Neutropenia: contagem de neutrófilos inferior a 500 células por milímetro cúbico de sangue periférico. Neutropenia grave foi considerada quando o número de neutrófilos foi inferior a 100 células/mm³. O período (em dias) de neutropenia foi avaliado nas duas semanas que precederam o isolamento de *Rhodotorula* sp. de hemocultura.

Diarréia: eliminação de fezes líquida e/ou pastosas, associada ao aumento do número de evacuações (duas ou mais evacuações por dia), duas semanas antes do isolamento fúngico.

Mucosite: considerada quando houve registro da mesma pelo médico assistente nas duas semanas que precederam o isolamento fúngico.

Cirurgia: foram considerados somente os procedimentos cirúrgicos descritos no prontuário e categorizados como:

- Grande porte:

Abdominal.
Torácica
Neurológica
Ortopédica
Ginecológica

- Cirurgia laparoscópica.
- Procedimento cirúrgico:

Dissecção venosa
Drenagem de tórax
Drenagem abdominal
Outros

3.8.3. Variáveis relacionadas a procedimentos invasivos

Sonda nasogástrica e/ou nasoenteral: considerado o uso de sonda nasogástrica e/ou nasoenteral e o período de utilização (em dias) até a primeira hemocultura positiva para *Rhodotorula* sp.

Ventilação mecânica invasiva: considerado o uso de ventilação mecânica através de tubo orotraqueal, nasotraqueal ou traqueostomia, e tempo de utilização (em dias), até a primeira hemocultura positiva para *Rhodotorula* sp.

Cateter venoso central: considerado o uso de cateter intravascular, o tipo de cateter (de curta ou longa duração), o número de lumens e o tempo de utilização (em dias) até a primeira hemocultura positiva para *Rhodotorula* sp.

Hemodiálise: considerada a realização de sessão de hemodiálise e o número de sessões.

3.8.4. Variáveis relacionadas à terapêutica prévia

Nutrição parenteral: considerada a administração de nutrição parenteral total e o período de utilização (em dias) até a primeira hemocultura positiva para *Rhodotorula* sp..

Uso de corticosteróides: utilização de dose ≥ 20 mg de prednisona (ou dose equivalente para outros esteróides) por período ≥ 30 dias ou dose cumulativa ≥ 600 mg nos últimos 30 dias da primeira hemocultura positiva para *Rhodotorula* sp.

Uso de quimioterapia: considerado a utilização de quimioterapia nos últimos 30 dias da primeira hemocultura positiva para *Rhodotorula* sp.

Uso de outros imunossupressores: considerado a utilização de outras drogas imunossupressoras, tais como ciclosporina e ciclofosfamida, nos últimos 30 dias da primeira hemocultura positiva para *Rhodotorula* sp.

Uso de antibiótico parenteral: uso de antibiótico nas duas semanas que antecederam a primeira hemocultura positiva para *Rhodotorula* sp., o período (em dias), e a substância ou classe (vancomicina, teicoplanina, piperacilina/tazobactam, cefalosporina de primeira geração, cefalosporina de segunda geração, ceftriaxone, cefotaxima, ceftazidima, cefepime, imipenem, meropenem, quinolona, aminoglicosídeo, metronidazol, clindamicina, sulfametoxazol-trimetoprim e outros).

Uso de antibióticos oral: uso de antibiótico oral nas duas semanas que antecederam a primeira hemocultura positiva para *Rhodotorula* sp., o período (dias) e a substância ou classe (penicilina, cefalosporina de primeira ou segunda geração, quinolona, metronidazol, clindamicina, sulfametoxazol/trimetoprim, macrolídeo e outros).

Uso de antifúngicos parenteral: uso de antifúngico nas duas semanas que antecederam a primeira hemocultura positiva para *Rhodotorula* sp., o período (em dias); a substância (anfotericina B deoxicolato, anfotericina B complexo lipídico, anfotericina B dispersão coloidal, anfotericina B lipossomal e/ou fluconazol), e a dose total para anfotericina B deoxicolato e formulações lipossomais.

Uso de antifúngicos oral: uso de antifúngico oral nas duas semanas que antecederam a primeira hemocultura positiva para *Rhodotorula* sp., o período (dias), a substância (fluconazol, itraconazol e cetoconazol), e a dose.

3.8.5. Outras variáveis e definições

Infecção de corrente sanguínea (ICS): definida como isolamento de *Rhodotorula* sp. em uma ou mais hemocultura de paciente com sinais e sintomas de infecção na ausência de outro foco provável de infecção justificando o quadro; definição adaptada dos critérios utilizados pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) (GARNER et al., 1998). A presença de um ou mais dos seguintes sinais e sintomas foram considerados:

- Febre: definida como temperatura axilar $\geq 37,8$ °C.
- Calafrios: contração involuntária dos músculos com sensação de frio.
- Hipotensão: pressão arterial sistólica inferior a 90 mm Hg ou pressão arterial diastólica inferior a 60 mm Hg, ou queda de 40 mm Hg da pressão sistólica em pacientes hipertensos.

Colonização: definida como hemocultura positiva na ausência de sinais e sintomas de infecção.

Hemocultura polimicrobiana: isolamento de outro microrganismo (bactéria ou fungo) além de *Rhodotorula* sp. da mesma hemocultura ou de múltiplas hemoculturas coletadas durante o mesmo episódio de febre ou calafrios.

Número de hemoculturas: considerado o número de hemoculturas positivas e o intervalo de tempo entre a primeira e a última amostra positiva para *Rhodotorula* sp.

Outras infecções: considerado o diagnóstico em prontuário de outras infecções até 7 dias antes ou depois da hemocultura positiva para *Rhodotorula* sp.

3.8.6. Período de acompanhamento

Foi definido como o tempo transcorrido entre a primeira hemocultura positiva para *Rhodotorula* sp. e os próximos 30 dias ou até o paciente ter recebido alta ou evoluído para óbito. Durante este período, foram obtidas as seguintes informações: terapêutica antifúngica (introdução, antifúngico utilizado, via de administração, dose e duração do tratamento); remoção ou não de cateter intravascular; período de tempo transcorrido entre a hemocultura positiva e a retirada do cateter; envio de ponta de cateter para cultura incluindo resultado microbiológico e dados sobre a evolução clínica do paciente (sobrevida ou óbito).

3.9. Análise dos dados

3.9.1. Coleta dos dados

Foi utilizada uma ficha clínico-epidemiológica padronizada para a coleta de dados dos prontuários dos pacientes que apresentaram hemocultura positiva para *Rhodotorula* sp. durante o período avaliado (Apêndice 1).

3.9.2. Banco de dados

As informações foram digitadas em planilha eletrônica de dados utilizando o programa Excel for Windows (Office, 2003).

Os dados foram expressos em percentuais, média \pm desvio-padrão, mediana e intervalo de variação.

A concordância entre os resultados das concentrações inibitórias mínimas obtidas pelos dois métodos (NCCLS, 2002 e EUCAST, 2002) foi calculada tomando-se como critério de concordância os resultados que diferiram no máximo duas diluições.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

A TABELA 2 mostra a ocorrência de *Rhodotorula* spp. em relação a outras leveduras isoladas de amostras de hemocultura no HC-FMUSP de janeiro de 1996 a dezembro de 2004. O número total de fungos isolados por ano, incluindo fungos filamentosos e os quatro gêneros mais freqüentes de leveduras, *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Pichia anomala*, *Rhodotorula* spp., podem ser observados. Foi incluído apenas um isolado por paciente. A categoria “outras leveduras” englobou gêneros distintos ou mesma espécie com menos de dois isolados no ano ou ainda leveduras que não foram identificadas.

TABELA 2 - Total de fungos isolados de hemocultura e distribuição anual de *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Pichia anomala*, *Rhodotorula* spp., outras leveduras e fungos filamentosos no HC-FMUSP de janeiro de 1996 a dezembro de 2004

ANO	Fungos† N	<i>Candida</i> spp. N (%)‡	<i>C. neoformans</i> N (%)	<i>P.anomala</i> †† N (%)	<i>Rhodotorula</i> spp. N (%)	Outras* N (%)	FF** N (%)
1996	128	102 (79,7)	11 (8,6)	5 (3,9)	5 (3,9)	2 (1,6)	3 (2,3)
1997	129	102 (79,0)	14 (10,9)	1 (0,8)	4 (3,1)	4 (3,1)	4 (3,1)
1998	130	98 (75,4)	11 (8,5)	8 (6,2)	2 (1,5)	9 (6,9)	2 (1,5)
1999	108	91 (84,2)	10 (9,3)	1 (0,9)	1 (0,9)	2 (1,9)	3 (2,8)
2000	128	110 (85,9)	6 (4,7)	1 (0,8)	4 (3,1)	7 (5,5)	0 (0,0)
2001	131	109 (83,3)	7 (5,3)	7 (5,3)	3 (2,3)	2 (1,5)	3 (2,3)
2002	121	105 (86,8)	5 (4,1)	2 (1,7)	4 (3,3)	1 (0,8)	4 (3,3)
2003	139	122 (87,8)	9 (6,4)	0 (0,0)	3 (2,2)	3 (2,2)	2 (1,4)
2004	181	158 (87,3)	6 (3,3)	7 (3,9)	2 (1,1)	5 (2,8)	3 (1,6)
Total	1195	997 (83,4)	79 (6,6)	32 (2,7)	28 (2,3)	35 (3,0)	24(2,0)

NOTA: † Total de isolados fúngicos, duplicatas excluídas; ‡ Surto de *Candida* spp. ocorreu em 2004; †† Surtos de *P.anomala* ocorreram em 1998, 2001 e 2004; * Outras: outros gêneros e espécies ou leveduras não identificadas com isolamento anual 1 a 2 casos ** FF: fungos filamentosos

Durante o período avaliado, leveduras do gênero *Rhodotorula* foram isoladas de hemoculturas de 28 pacientes. Não foi possível localizar os prontuários de três pacientes, nem obter informações das variáveis de interesse por fontes alternativas, sendo os mesmos excluídos do estudo. Desse modo, a amostra analisada neste estudo foi constituída por 25 pacientes.

4.1. Variáveis Estudadas

4.1.1. Variáveis demográficas

A média de idade dos 25 pacientes incluídos no estudo foi $36,3 \pm 22,0$ anos e a mediana, 43,0 anos, observando-se maior incidência dos casos na sexta década de vida (28,0%), seguindo-se a primeira e a quinta décadas (20,0%). Sete (28,0%) destes pacientes eram menores que 15 anos, sendo que apenas um era recém-nascido (TABELA 3). Observou-se uma frequência maior de pacientes do sexo masculino, 19 (76,0%). A média de idade de homens e mulheres foi semelhante, entretanto com mediana maior nos pacientes do sexo masculino (47,0 anos).

TABELA 3 - Distribuição dos pacientes com hemocultura positiva para *Rhodotorula* spp. segundo a idade e o sexo – HC-FMUSP – janeiro de 1996 a dezembro de 2004

Idade (anos)	Sexo Masculino N(%)	Sexo Feminino N(%)
<1	1 (4,0)	-
1-9	4 (16,0)	1 (4,0)
10-19	2 (8,0)	-
20-29	-	1 (4,0)
30-39	1 (4,0)	1 (4,0)
40-49	2 (8,0)	3 (12,0)
50-59	7 (28,0)	-
60-69	1 (4,0)	-
≥ 70	1 (4,0)	-
TOTAL	19 (76,0)	6 (24,0)

4.1.2. Variáveis relacionadas ao quadro clínico-laboratorial

Encontravam-se internados 36,0% (9/25) dos pacientes no momento da hemocultura positiva para *Rhodotorula* sendo que 33,0% em unidades cirúrgicas e 67,0% em unidades clínicas, com distribuição temporal distinta. Nenhum paciente encontrava-se em unidade de terapia intensiva. O tempo de internação até a primeira hemocultura positiva variou entre 1 e 41 dias, com média de $14,7 \pm 13,4$ dias e mediana de 14,0 dias. Todos os outros pacientes (16/25) estavam em acompanhamento ambulatorial nas unidades de hospital-dia: 50,0% no ambulatório do transplante de medula óssea (ATMO) e 50,0% no ambulatório da quimioterapia (QTDH). A figura 4 mostra a distribuição anual dos 25 pacientes segundo a

localização em unidades hospitalares (enfermaria ou hospital-dia) no momento da hemocultura positiva para *Rhodotorula*.

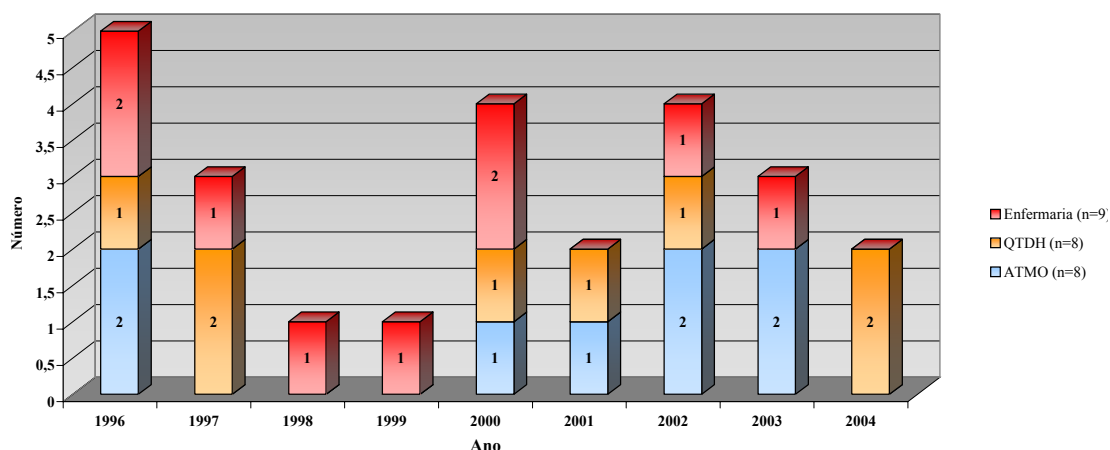


FIGURA 4. Distribuição anual dos 25 pacientes no momento da hemocultura positiva para *Rhodotorula* spp. segundo a localização nas unidades hospitalares (enfermaria ou hospital-dia) no HC-FMUSP de janeiro de 1996 a dezembro de 2004.

A grande maioria dos pacientes apresentava doença de base (24/25, 96,0%), sendo que neoplasia esteve presente em 18 pacientes (75,0%). Destes, 17 (94,4%) tinham diagnóstico de neoplasia hematológica, sendo linfoma não-Hodgkin (8/17-47,0%) o tipo mais freqüente, conforme ilustrado na TABELA 4.

As outras doenças de base encontradas foram: anemia falciforme, anemia aplásica, cirrose por hepatite por vírus B, síndrome do intestino curto e hepatopatia congênita.

Dos 25 pacientes, 40,0% (10/25) realizaram transplante de medula óssea nos últimos 12 meses ou em até 2 semanas após a primeira hemocultura positiva. Apenas um paciente estava no D+ 470 de transplante autólogo, complicado com pancitopenia prolongada e ainda em uso de cateter central de longa permanência (Hickman) no momento da hemocultura positiva.

Em sete casos (70,0%), o transplante realizado foi do tipo autólogo e em 30,0% do tipo alogênico. As doenças de base que motivaram a realização do transplante de medula óssea foram neoplasias hematológicas em 80,0% dos pacientes e anemia aplásica para os demais (TABELA 4).

O tempo transcorrido entre transplante de medula óssea e isolamento de *Rhodotorula* no sangue variou de -11 a 240 dias, com média de $61,4 \pm 87,0$ e mediana de 9,0 dias. A maioria dos pacientes também era do sexo masculino (7/10). A média de idade dos pacientes transplantados foi de 35,0 anos com mediana de 47,5 anos, semelhantes às da população geral do estudo. No momento da hemocultura positiva, apenas 30,0% dos pacientes encontravam-se internados (3/10). O tempo de internação até a primeira hemocultura positiva variou de 1 a 20 dias, com média de $12,0 \pm 9,8$ dias e mediana de 15,0 dias. Estes pacientes estavam internados para realização de condicionamento da medula óssea para transplante.

TABELA 4 - Características demográficas, doença de base e transplante de medula óssea dos 25 pacientes com hemocultura positiva para *Rhodotorula* spp. – HC-FMUSP – janeiro de 1996 a dezembro de 2004

Paciente	Idade	Sexo	Unidade	Doença de Base	Transplante
1	53	M	ATMO	Linfoma NH	Sim
2	8	F	ATMO	Anemia Aplásica	Sim
3	7	M	ICR	Neuroblastoma	Não
4	47	M	EICH	Cirrose HVB	Não
5	39	F	AQTDH	LMA	Não
6	58	M	E1MH	Linfoma Burckitt	Sim
7	43	M	AQTDH	Linfoma NH	Não
8	21	F	AQTDH	Linfoma HOD	Não
9	19	M	EPSC	- *	Não
10	3	M	ICR	Anemia falciforme	Não
11	70	M	E2CG	Sd Intestino Curto	Não
12	53	M	ATMO	Linfoma NH	Não
13	14	M	ETMO	Linfoma HOD	Sim
14	53	M	AQTDH	LLA	Não
15	50	M	ATMO	Linfoma NH	Sim
16	51	M	AQTDH	LMA	Não
17	9	M	ATMO	LMA	Sim
18	41	F	AQTDH	Linfoma HOD	Não
19	48	F	ATMO	LMA	Sim
20	22 dias	M	EBEI	Hepatopatia congênita	Não
21	7	M	ATMO	Anemia Aplásica	Sim
22	47	F	EICO	LMA	Sim
23	55	M	ATMO	Linfoma NH	Sim
24	67	M	AQTDH	Linfoma NH intestinal	Não
25	37	M	AQTDH	Linfoma NH	Não

NOTA: **HOD** Hodgkin; **NH** Não-Hodgkin; **LMA** Leucemia Mielóide Aguda; **LLA** Leucemia Linfóide Aguda; **HVB** Vírus da hepatite B; **ATMO** Ambulatório do Transplante de Medula Óssea; **AQTDH** Ambulatório da Quimioterapia – Hospital Dia; **ETMO**: Enfermaria do Transplante de Medula Óssea; **EBEI** Enfermaria do Berçário; **EICO** Enfermaria do INCOR; **E1MH** Enfermaria da Hematologia; **EPSC** Enfermaria do Pronto Socorro da Cirurgia; **ICR** Instituto da Criança; **EICH** Enfermaria Cirurgia Experimental do Fígado; **E2CG** Enfermaria da Cirurgia Geral. *Paciente com abscesso hepático por *S. aureus*

O APACHE II foi calculado em 12 pacientes, com média de $11,0 \pm 4,7$ e mediana 12,0. Onze pacientes não foram incluídos: sete porque eram menores de 15 anos e o restante por falta de dados.

Apenas três pacientes estavam neutropênicos no período que antecedeu a primeira hemocultura positiva para *Rhodotorula*. A classificação e duração de neutropenia foi possível avaliar em dois pacientes: ambos apresentaram contagem de neutrófilos inferior a 100 células/mm^3 durante 5 e 9 dias. A neutropenia nestes pacientes esteve relacionada à quimioterapia (2/3) e transplante de medula óssea.

Apenas um paciente havia sido submetido a procedimento cirúrgico 20 dias antes do isolamento fúngico, para drenagem de abscesso hepático por *Staphylococcus aureus*.

A ocorrência de diarreia e mucosite foi possível avaliar em 23 pacientes, sendo que diarreia foi verificada em dois casos (8,7%) com duração de 8 e 5 dias, respectivamente. Apenas um paciente teve registro de mucosite em prontuário, iniciada uma semana antes do isolamento fúngico.

TABELA 5 - Características clínicas dos 25 pacientes com hemocultura positiva para *Rhodotorula* spp. –HC-FMUSP – janeiro de 1996 a dezembro de 2004

Variável	Frequência
Doença de base	0,96 (24/25)
Linfoma	0,44 (11/25)
Leucemia	0,24 (06/25)
Outros	0,28 (07/25)
TMO	0,40 (10/25)
Neutropenia (células /mm³) *	0,13 (03/23)
101-500	-
≤ 100 neutrófilos	0,13 (03/23)
Duração neutropenia (dias)	7
Cirurgia	0,04 (01/25)
Diarréia	0,08 (02/23)
Mucosite	0,04 (01/23)
Cateter central	0,88 (22/25)
Tempo de cateter central	
1 a 45 dias	0,26 (05/19)
46-90	0,32 (06/19)
> 90	0,42 (08/19)
Uso de corticóides	0,43 (10/23)
Outros imunossupressores	0,43 (10/23)
Quimioterapia	0,52 (12/23)
Nutrição Parenteral	0,12 (03/25)
Uso de antibiótico parenteral	0,48 (11/23)
Uso de antifúngico parenteral	0,08 (02/23)

NOTA: dados expressos em percentual de pacientes (número de pacientes /total de pacientes); **TMO** Transplante de Medula Óssea; * um paciente sem dados de duração de neutropenia

4.1.3. Variáveis relacionadas a procedimentos invasivos

Vinte e dois pacientes (88,0%) utilizavam cateter venoso central no momento do isolamento fúngico. O cateter venoso central de longa permanência foi o tipo mais utilizado (20/22; 91%), particularmente o cateter de Hickman (17/22; 77,3%). Em 17 pacientes obteve-se informação do número de lumens do cateter venoso, sendo que 14 utilizaram cateter de duplo lumen (14/17, 82,3%).

Em dezenove pacientes (86,4%) foi possível avaliar o tempo de utilização de cateter até a primeira hemocultura positiva para *Rhodotorula*, que variou de 4 a 261 dias, com média de $86,5 \pm 64,8$ dias e mediana de 81,0 dias. Apenas cinco pacientes utilizavam cateter central há menos de 30 dias (TABELA 5).

Nenhum paciente estava em uso de sonda vesical, ventilação mecânica invasiva, sonda nasogástrica e/ou nasoenteral e hemodiálise no período que precedeu o isolamento fúngico.

4.1.4. Variáveis relacionadas à terapêutica prévia

A TABELA 5 apresenta os dados relacionados à terapêutica prévia e um resumo dos resultados observados para outras variáveis.

Apenas 12,0% (3/25) dos pacientes estavam em uso de nutrição parenteral, sendo que dois a utilizavam há mais de um ano.

Corticosteróides, quimioterápicos e outros imunossupressores foram utilizados por 10 (43,5%), 12 (52,2%) e 10 (43,5%) pacientes, respectivamente. Estes dados não foram obtidos em dois de 25 pacientes.

Quase metade dos pacientes (11/23, 48%) estava sob antibioticoterapia parenteral. A duração de antibioticoterapia variou de 1 a 21 dias, com média de $9,5 \pm 6,6$ dias e mediana de 8,0 dias. Os antibióticos mais utilizados foram as cefalosporinas de terceira geração e os glicopeptídeos.

Cinco pacientes (5/22, 22,7%) utilizaram antibiótico enteral, sendo sulfametoxazol/trimetoprim o antimicrobiano mais utilizado (60,0%), particularmente em esquema profilático ou terapêutico nos pacientes transplantados de medula óssea.

Apenas dois pacientes receberam antifúngico parenteral no período que precedeu o isolamento de *Rhodotorula* em hemocultura: fluconazol por 3 dias e anfotericina B deoxicolato em regime profilático por 7 dias, respectivamente. Ambos os pacientes estavam internados para transplante de medula óssea. Não se encontrou registro de utilização de antifúngico enteral durante o período avaliado.

4.1.5. Classificação do episódio de hemocultura positiva para *Rhodotorula*

O isolamento de *Rhodotorula* de hemocultura foi classificado como infecção da corrente sanguínea em 20 pacientes (80,0%).

Em cinco pacientes (20,0%) o isolamento fúngico ocorreu na ausência de sinais e sintomas sugestivos de infecção ou concomitantemente a febre,

porém na presença de outras situações clínicas passíveis de justificá-la; nestes casos, as hemoculturas positivas para *Rhodotorula* foram consideradas como colonização. Destes, apenas dois pacientes estavam com cateter central de longa permanência, em condicionamento para transplante de medula óssea ou no D+3 pós-transplante. Ambos tiveram hemocultura coletada de cateter venoso central na ausência de sinais e sintomas de infecção, como parte do protocolo de rotina do Serviço de Hematologia.

Dos outros três pacientes, dois eram crianças: uma com diagnóstico de anemia falciforme em provável crise de falcização e outra com meduloblastoma, não neutropênica, em tratamento recente de sinusiopatia aguda. O terceiro paciente era um adulto jovem internado há mais de duas semanas para tratamento de abscesso hepático bacteriano, em uso prolongado de antibiótico parenteral e com quadro interrogado de alergia à droga.

4.1.6. Outras infecções

Dentre os 25 casos avaliados, três apresentaram hemocultura positiva para outros microrganismos próximo ao isolamento de *Rhodotorula* (-1 a + 5 dias) e foram considerados ICS. Além destes, um paciente estava em tratamento para otite média aguda havia 7 dias da primeira hemocultura positiva e outro tinha diagnóstico prévio de infecção de óstio de cateter.

4.1.7. Hemoculturas positivas

O número de hemoculturas positivas por paciente variou de um a quatro, sendo que 45,4% (10/22) dos pacientes com cateter venoso central apresentaram mais de uma hemocultura positiva (média 2,6 e mediana 2) com intervalo de tempo entre as amostras variando de 1 a 26 dias, média $9,3 \pm 8,8$ dias e mediana 6 dias.

Rhodotorula sp. foi o único agente isolado em 60,0% (15/25) dos pacientes em uma ou mais hemocultura e o isolamento polimicrobiano ocorreu em 28,0% (7/25). Os microrganismos isolados concomitantemente foram: *Candida albicans* (1), *Staphylococcus haemolyticus* (1), *Pseudomonas aeruginosa* + *Streptococcus viridans* (1), *Pichia ohmerii* (1), *Enterobacter cloacae* (1), *Staphylococcus epidermidis* (1) e *Staphylococcus hominis* (1).

Em três pacientes (12,0%) houve crescimento em hemocultura de outros agentes, a saber: *Burkholderia cepacia* e *Escheria coli*, 24 e 48 horas, respectivamente, antes do isolamento de *Rhodotorula* e, *Candida albicans*, 5 dias após hemocultura índice, e foram todos considerados como ICS.

4.1.8. Período de acompanhamento

4.1.8.1 Cateter venoso central

Todos os pacientes classificados como ICS (20/25) utilizavam cateter venoso central. Um deles foi transferido para outro hospital, não sendo possível avaliar o seguimento. Dezesete (89,5%) pacientes retiraram o

cateter central, tendo o tempo transcorrido entre a primeira hemocultura positiva para *Rhodotorula* e a retirada do cateter venoso central variado de 1 a 37 dias, com média de $11,6 \pm 9,3$ dias e mediana de 8 dias. Apenas dois pacientes não retiraram o cateter central: um recém-nascido que evoluiu a óbito 96 horas após hemocultura positiva para *Rhodotorula* e um paciente adulto em quimioterapia, sem possibilidade de outro acesso central devido a múltiplas trombozes locais.

Dentre os cinco pacientes cujo episódio de isolamento fúngico não foi classificado como ICS, dois estavam com cateter venoso central de longa permanência, retirados após 5 e 8 dias da hemocultura positiva respectivamente.

Entre os pacientes com cateter venoso central que retiraram o dispositivo e enviaram a ponta para cultura (19/21), seis (31,6%) apresentaram resultado de cultura positivo. Os microrganismos isolados foram: *Pichia ohmerii* (1), *Rhodotorula glutinis* (1), *Rhodotorula mucilaginosa* (1), *Staphylococcus coagulase negativo* (2) e *Staphylococcus aureus* + *Candida albicans* (1). Entre os pacientes com resultado negativo da cultura de cateter (13/19), observou-se a utilização de terapia antifúngica parenteral prévia em 54,5% dos casos (6/11).

4.1.8.2. Tratamento Antifúngico

Pacientes classificados como colonização

Dos cinco pacientes cujo isolamento de *Rhodotorula* de hemocultura foi considerado como colonização, apenas um recebeu tratamento antifúngico. Não foi possível avaliar o uso de antifúngico em um paciente (alta hospitalar 24 horas após a hemocultura positiva).

O paciente que recebeu tratamento antifúngico teve o isolamento de *Rhodotorula* em hemocultura colhida de cateter venoso central no D+1 de transplante de medula óssea autólogo, na ausência de sinais e sintomas clínicos de infecção, evoluindo com neutropenia grave após 24 horas da hemocultura positiva, porém permanecendo afebril. Este paciente vinha em uso de fluconazol parenteral em esquema de profilaxia (200 mg/dia) há 3 dias da hemocultura positiva, sendo o mesmo continuado por mais 7 dias. Neste momento, retirou-se o cateter de longa permanência e aumentou-se a dose de fluconazol para 400 mg por dia por mais 5 dias, sendo então substituído por anfotericina B deoxicolato, com dose total administrada de 350 mg.

Pacientes classificados como infecção da corrente sanguínea

Dos 20 pacientes com infecção de corrente sanguínea, não foi possível avaliar dados referentes ao tratamento instituído em três casos (15,0%).

Dois pacientes (12%) não receberam nenhum tipo de antifúngico. Um era o recém-nascido que faleceu 96 horas após a hemocultura positiva para fungo e o outro era um paciente portador de linfoma não-Hodgkin, não neutropênico, com infecção concomitante do óstio do cateter, sem possibilidade de remoção do mesmo devido a múltiplas trombozes locais e sem diagnóstico de infecção fúngica pelo serviço. Este caso recebeu apenas antibioticoterapia parenteral.

Para os demais pacientes (15/17, 88%), o tempo transcorrido entre hemocultura positiva e o início do tratamento antifúngico variou de 1 a 27 dias, com média de $9,1 \pm 7,5$ dias e mediana de 8,0 dias. A duração de terapêutica antifúngica variou de 2 a 22 dias, com média de $13,4 \pm 5,8$ e mediana de 13,0 dias.

Anfotericina B deoxicolato foi o antifúngico mais utilizado (14/15, 93%) com dose total variando de 60 a 930 mg (média de 450 ± 277 mg e mediana de 461,5 mg) e duração de tratamento de $13,5 \pm 4,8$ dias e mediana de 13,5 dias, com intervalo de variação de 2 a 20 dias.

Dois pacientes receberam fluconazol endovenoso na dose de 400 mg por dia por 4 e 8 dias, respectivamente, e retiraram o cateter venoso central. Um deles completou a terapêutica parenteral com fluconazol oral por mais 10 dias e o outro recebeu mais 13 dias de anfotericina B deoxicolato (dose total de 430 mg) seguida de anfotericina lipossomal (dose total de 1,6 g).

4.1.8.3. Evolução clínica

Foi possível avaliar a evolução clínica após isolamento de *Rhodotorula* de hemocultura em 23 pacientes – quatro considerados como colonização e 19 como

ICS. Para dois pacientes não foi possível obter informações da evolução clínica; pois um teve alta 24 horas após a hemocultura positiva (considerado como não ICS) e o outro foi transferido de hospital no mesmo dia do isolamento (considerado como ICS). A evolução e as principais características clínicas dos pacientes pode ser observada na TABELA 6.

Os quatro pacientes avaliados não considerados como ICS sobreviveram ao episódio, sem constatação de nova hemocultura positiva para *Rhodotorula* durante o período avaliado.

Dentre os 19 pacientes classificados como ICS, quatro pacientes (21% 4/19) foram a óbito durante o período de acompanhamento. Todos estavam com cateter venoso central, com tempo de uso médio de 73 ± 126 dias, variando de 4 a 261 dias. Apenas três pacientes retiraram o cateter central após 3, 10 e 19 dias, respectivamente, da data da primeira hemocultura positiva.

Um dos pacientes era o recém-nascido previamente mencionado, com fungemia concomitante por *Candida albicans*, que evoluiu a óbito 96 horas após a coleta da hemocultura, sem instituição de terapia antifúngica. Os resultados da necropsia foram compatíveis com infecção fúngica disseminada. O segundo caso de óbito era um paciente portador de cirrose hepática pós-infecção por vírus da hepatite B, cujo óbito foi provavelmente relacionado à pneumonia nosocomial desenvolvida após resolução da fungemia por *Rhodotorula*.

Os outros dois pacientes eram transplantados de medula óssea. O primeiro era uma criança que estava no D+ 240 de transplante autólogo, não neutropênico, que faleceu 5 dias após o isolamento de *Rhodotorula* em hemocultura. O cateter venoso central foi precocemente retirado e os dados sobre terapêutica antifúngica não

puderam ser obtidos. Os resultados do lavado broncoalveolar coletado 24 horas antes do óbito foram positivos para *Pneumocystis jiroveci* (*P. carinii*) na microscopia direta e *Rhodotorula mucilaginosa* na cultura de fungos.

O segundo era um adulto com diagnóstico de linfoma de Burckitt, cujo isolamento de *Rhodotorula* no sangue ocorreu uma semana antes de transplante autólogo, mantendo isolamento do fungo em várias hemoculturas após realização do transplante. Evoluiu com neutropenia e persistência de febre até retirada de cateter central, 19 dias após a primeira hemocultura positiva, com uso de antimicrobianos de amplo espectro e dose cumulativa de anfotericina B deoxicolato de 750 mg. Foi a óbito no D+ 25 do transplante, em decorrência de insuficiência respiratória aguda após 48 horas de isolamento de *Acinetobacter* sp. em hemocultura.

Não foi solicitada necropsia para nenhum destes pacientes.

TABELA 6 - Resumo dos 25 pacientes com hemocultura positiva para *Rhodotorula* spp. no HC-FMUSP de janeiro de 1996 a dezembro de 2004

Paciente; Ano	Sexo /Idade	Doença de Base	Unidade	TMO	CVC	Terapia Antifúngica	Remoção CVC	Evolução
1; 1996	M/53	Linfoma NH	ATMO	Sim	Sim	Anfotericina	Sim	S
2; 1996	F/8	Anemia Aplásica	ATMO	Sim	Sim	...	Sim	S
3; 1996	M/7	Neuroblastoma	Clínica	Não	Não	Não	-	S
4; 1996	M/47	Cirroze por HVB	Cirúrgica	Não	Sim	Anfotericina	Sim	O
5; 1996	F/39	LMA	AQTDH	Não	Sim	Anfotericina	Sim	S
6; 1997	M/58	Linfoma Burkitt	Clínica	Sim	Sim	Anfotericina	Sim	O
7; 1997	M/43	Linfoma NH	AQTDH	Não	Sim	Anfotericina	Sim	S
8; 1997	F/21	Linfoma HOD	AQTDH	Não	Sim	Anfotericina	Sim	S
9; 1998	M/19	*	Cirúrgica	Não	Não	Não	-	...
10; 1999	M/3	Anemia Falciforme	Clínica	Não	Não	Não	-	S
11; 2000	M/70	Intestino Curto	Cirúrgica	Não	Sim	Fluconazol	Sim	
12; 2000 #	M/53	Linfoma NH	ATMO	Não	Sim
13; 2000	M/14	Linfoma HOD	Clínica	Sim	Sim	Anfotericina	Sim	S
14; 2000	M/53	LLA	AQTDH	Não	Sim	Anfotericina	Sim	S
15; 2001	M/50	Linfoma NH	ATMO	Sim	Sim	Anfotericina	Sim	S
16; 2001	M/51	LMA	AQTDH	Não	Sim	Anfotericina	Sim	S
17; 2002	M/9	LLA	ATMO	Sim	Sim	Anfotericina	Sim	S
18; 2002	F/41	Linfoma HOD	AQTDH	Não	Sim	Anfotericina	Sim	S
19; 2002	F/48	LMA	ATMO	Sim	Sim	Anfotericina	Sim	S
20; 2002	M/22dias	Hepatopatia congenita	Clínica	Não	Sim	Não	Não	O
21; 2003	M/7	Anemia Aplásica	ATMO	Sim	Sim	...	Sim	O
22; 2003	F/47	LMA	Clínica	Sim	Sim	Não	Sim	S
23; 2003	M/55	Linfoma NH	ATMO	Sim	Sim	Fluconazol Anfotericina	Sim	S
24; 2004	M/67	Linfoma NH	AQTDH	Não	Sim	Não	Não	S
25; 2004	M/37	Linfoma NH	AQTDH	Não	Sim	Fluconazol Anfotericina	Sim	S

NOTA: **HOD** Hodgkin; **NH** não-Hodgkin; **LLA** Leucemia Linfóide Aguda; **LMA** Leucemia Mielóide Aguda; **HVB** Vírus da hepatite B; **ATMO** Ambulatório do Transplante de Medula Óssea; **AQTDH** Ambulatório da Quimioterapia – Hospital Dia; **CVC** cateter venoso central; **S** Sobreviveu; **O** Óbito; * paciente 9 com abscesso hepático por *S. aureus*; # paciente número 12 transferido para outro hospital; ... ignorado; - não se aplica

4.2. Microbiologia

4.2.1. Identificação das espécies de *Rhodotorula*

Inicialmente, o sistema de identificação automatizado Vitek (bioMérieux, EUA) identificou as 25 cepas de *Rhodotorula* como: 15 (60%) *R. mucilaginosa*, sete (28%) *R. glutinis* (em três delas a probabilidade de identificação de espécie foi de 84%, sugerindo testes suplementares) e três (12%) sem identificação de espécie.

Somente 20 cepas viáveis foram incluídas na reavaliação microbiológica. As características macroscópicas, degradação da uréia e crescimento a 37 °C das 20 cepas de *Rhodotorula* podem ser observadas na TABELA 7. A avaliação micromorfológica em ágar fubá de todas as cepas foi compatível com as características descritas para o gênero incluindo ausência de balistoconídio e pseudo-hifa/ hifa rudimentar.

Destas, o sistema automatizado Vitek (bioMérieux, EUA) identificou 15 cepas como *R. mucilaginosa* (75%), quatro como *R. glutinis* (20%) e uma (5%) permaneceu não identificada ao nível de espécie. Já o sistema manual API 20C AUX (bioMérieux, EUA) identificou 19 (95%) cepas como *R. mucilaginosa* e apenas uma (5%) como *R. glutinis*. Os resultados discordantes entre as duas metodologias persistiram após um segundo teste (TABELA 8).

Todas as cepas foram também identificadas manualmente pelo método convencional de assimilação de carboidratos e nitrato (auxanograma) sendo que todos os resultados foram compatíveis com *R. mucilaginosa*.

TABELA 7 - Características macromorfológicas, degradação da uréia e crescimento a 37 °C de 20 cepas de *R. mucilaginosa* isoladas de hemocultura no HC-FMUSP de janeiro de 1996 a dezembro de 2004

Nº cepa	Espécie	Cor	Aspecto	Uréia	Crescimento*
1	<i>R. mucilaginosa</i>	salmão	mucóide	Positivo	Positivo
2	<i>R. mucilaginosa</i>	salmão	cremosa	Positivo	Positivo
3	<i>R. mucilaginosa</i>	salmão	mucóide	Positivo	Positivo
4	<i>R. mucilaginosa</i>	coral	cremosa	Positivo	Positivo
5	<i>R. mucilaginosa</i>	coral	cremosa	Positivo	Positivo
6	<i>R. mucilaginosa</i>	coral	cremosa	Positivo	Positivo
8	<i>R. mucilaginosa</i>	salmão	mucóide	Positivo	Positivo
9	<i>R. mucilaginosa</i>	salmão	mucóide	Positivo	Positivo
10	<i>R. mucilaginosa</i>	salmão	mucóide	Positivo	Positivo
11	<i>R. mucilaginosa</i>	coral	mucóide	Positivo	Positivo
13	<i>R. mucilaginosa</i>	coral	mucóide	Positivo	Positivo
16	<i>R. mucilaginosa</i>	salmão	mucóide	Positivo	Positivo
17	<i>R. mucilaginosa</i>	salmão	cremosa	Positivo	Positivo
18	<i>R. mucilaginosa</i>	coral	cremosa	Positivo	Positivo
19	<i>R. mucilaginosa</i>	salmão	cremosa	Positivo	Positivo
20	<i>R. mucilaginosa</i>	salmão	cremosa	Positivo	Positivo
21	<i>R. mucilaginosa</i>	salmão	mucóide	Positivo	Positivo
22	<i>R. mucilaginosa</i>	salmão	cremosa	Positivo	Positivo
23	<i>R. mucilaginosa</i>	salmão	mucóide	Positivo	Positivo
24	<i>R. mucilaginosa</i>	salmão	cremosa	Positivo	Positivo

NOTA: * Crescimento a 37 °C.

TABELA 8 - Identificação da espécie de 20 cepas de *Rhodotorula* isoladas de hemocultura de acordo com método utilizado - HC-FMUSP – janeiro de 1996 a dezembro de 2004

Nº cepa	Vitek	API 20C AUX	Vitek*	API 20C AUX*	Auxanograma**
1	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	–	–	<i>R. mucilaginosa</i>
2	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	–	–	<i>R. mucilaginosa</i>
3	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	–	–	<i>R. mucilaginosa</i>
4	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	–	–	<i>R. mucilaginosa</i>
5	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	–	–	<i>R. mucilaginosa</i>
6	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	–	–	<i>R. mucilaginosa</i>
8	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	–	–	<i>R. mucilaginosa</i>
9	<i>R. glutinis</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>R. glutinis</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>R. mucilaginosa</i>
10	<i>R. glutinis</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>R. glutinis</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>R. mucilaginosa</i>
11	<i>R. glutinis</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>R. glutinis</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>R. mucilaginosa</i>
13	<i>R. glutinis</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>R. glutinis</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>R. mucilaginosa</i>
16	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	–	–	<i>R. mucilaginosa</i>
17	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	–	–	<i>R. mucilaginosa</i>
18	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	–	–	<i>R. mucilaginosa</i>
19	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	–	–	<i>R. mucilaginosa</i>
20	<i>R. glutinis</i>	<i>R. glutinis</i>	–	–	<i>R. mucilaginosa</i>
21	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	–	–	<i>R. mucilaginosa</i>
22	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	–	–	<i>R. mucilaginosa</i>
23	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	–	–	<i>R. mucilaginosa</i>
24	<i>Rhodotorula</i> sp.	<i>R. mucilaginosa</i>	–	–	<i>R. mucilaginosa</i>

* Resultados discordantes que foram submetidos a um segundo teste. ** Teste de assimilação de carboidratos (galactose, sacarose, maltose, celobiose, trealose, lactose, melibiose, melezitose, xilose, L-raminose, eritritol, galactitol, inositol e peptona) e nitrato

4.2.2 Teste de sensibilidade *in vitro* à drogas antifúngicas

Os resultados do teste de sensibilidade *in vitro* para anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol frente às 20 cepas de *Rhodotorula mucilaginosa* avaliadas estão demonstrados nas TABELA 9, 10 e Apêndice 2. Na TABELA 9, além da concentração inibitória mínima que inibiu 50% (MIC₅₀) e 90% (MIC₉₀) das cepas avaliadas, para cada antifúngico estudado, de acordo com NCCLS (2002) e EUCAST (2002), também estão demonstrados os intervalos obtidos das concentrações inibitórias mínimas e o valor modal. Já na TABELA 10, o número de cepas inibidas em cada concentração inibitória mínima testada para os antifúngicos avaliados de acordo com NCCLS e EUCAST, pode ser observado. No Apêndice 2 estão demonstrados os valores das concentrações inibitórias mínimas obtidos individualmente para cada cepa avaliada por ambos os métodos, NCCLS e EUCAST.

Os valores obtidos para as concentrações inibitórias mínimas das cepas controle *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258 estiveram dentro dos valores esperados exceto para *C. parapsilosis* e itraconazol, freqüentemente com valores no máximo uma diluição menor que o limite inferior esperado. Entretanto, os resultados foram consistentes durante todo o período estudado e estão de acordo com os resultados obtidos na rotina do teste de sensibilidade aos antifúngicos do laboratório de Micologia do Instituto Adolfo Lutz.

Nos resultados obtidos de acordo com o documento M27-A2, (NCCLS, 2002) considerado como método de referência, observou-se que anfotericina B demonstrou uma boa atividade *in vitro* para todas as cepas. Entre os compostos azólicos,

itraconazol e voriconazol demonstraram uma atividade *in vitro* variável. Já as concentrações inibitórias mínimas observadas para fluconazol foram uniformemente elevadas ($> 64 \mu\text{g/mL}$) TABELA 9 e Apêndice 2.

O percentual de concordância entre os resultados obtidos das concentrações inibitórias mínimas para cada antifúngico após 72 horas de incubação de acordo com as recomendações do NCCLS e EUCAST, considerando o intervalo de \pm duas diluições como variação aceitável foi de: 100% para anfotericina e fluconazol, 90% para voriconazol e 85% para itraconazol.

TABELA 9 - Atividade *in vitro* de quatro drogas antifúngicas frente a 20 cepas de *R. mucilaginosa* isoladas de hemocultura no HC- FMUSP- janeiro de 1996 a dezembro de 2004

Antifúngico	Método	Moda	Intervalo de MIC ($\mu\text{g/mL}$)		
			MIC ₅₀	MIC ₉₀	
Anfotericina B	NCCLS	0,5	0,5	0,5	0,25 - 1
	EUCAST	0,5	0,5	1	0,25 - 1
Fluconazol	NCCLS	> 64	> 64	> 64	> 64
	EUCAST	> 64	> 64	> 64	> 64
Itraconazol	NCCLS	0,5	0,5	2	0,03 - > 8
	EUCAST	0,12	0,25	1	0,03 - 4
Voriconazol	NCCLS	1	1	4	0,06 - 4
	EUCAST	0,25	0,5	4	0,06 - 4

NOTA: NCCLS *National Committee for Clinical Laboratory Standards*; EUCAST *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing*; MIC concentração inibitória mínima; MIC₅₀ concentração da droga necessária para inibir 50% dos isolados; MIC₉₀ concentração da droga necessária para inibir 90% dos isolados

TABELA 10 - Distribuição das concentrações inibitórias mínimas encontradas nas 20 cepas de *Rhodotorula mucilaginosa* isoladas de hemocultura de acordo com NCCLS (2002) e EUCAST (2002) -HC-FMUSP – janeiro de 1996 a dezembro de 2004

MIC µg/mL	Anfotericina B		Fluconazol		Itraconazol		Voriconazol	
	NCCLS	EUCAST	NCCLS	EUCAST	NCCLS	EUCAST	NCCLS	EUCAST
0,03	0	0	0	0	1	2	0	0
0,06	0	0	0	0	1	2	3	2
0,125	0	0	0	0	1	5	1	1
0,25	2	1	0	0	4	4	2	5
0,5	17	14	0	0	6	2	3	3
1	1	5	0	0	4	4	6	4
2	0	0	0	0	2	0	2	2
4	0	0	0	0	0	1	3	3
>8	0	0	0	0	1	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0	0	0
64	0	0	0	0	0	0	0	0
> 64	0	0	20	20	0	0	0	0

NOTA: **MIC** concentração inibitória mínima; **NCCLS** *National Committee for Clinical Laboratory Standards*; **EUCAST** *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing*

4.3. Biologia molecular

4.3.1 Eletroforese em campo pulsado

Foram avaliadas 19 cepas de *R. mucilaginosa* provenientes de hemocultura. Somente em nove cepas (47%) foi possível avaliar o perfil genotípico ou foram tipáveis através da eletroforese em campo pulsado.

A tipagem molecular destas nove cepas revelou três cariótipos diferentes, todos contendo de nove a 11 bandas com pesos moleculares que variaram entre 0,610 Mb a 2,1Mb.

Observou-se predomínio de um genótipo, denominado perfil A, representado por 66,7% das cepas. Foi utilizada como cepa-controle *R. minuta*, que apresentou um perfil distinto do predominante (FIGURA 5).

Na TABELA 11 podemos observar a distribuição dos perfis encontrados de acordo com a identificação do paciente, unidade em que se encontrava na data do isolamento do fungo, número da cepa e número da coluna da eletroforese em campo pulsado (FIGURA 5).

TABELA 11 - Distribuição do perfil genotípico de nove cepas de *R. mucilaginosa* isoladas de hemocultura de acordo com paciente, unidade de internação, data do isolamento, número da cepa e número da coluna da eletroforese em campo pulsado - HC-FMUSP – janeiro de 1996 a dezembro de 2004

Nº paciente	Unidade	Data	Nº cepa	Perfil	Coluna
1	ICR	27/11/1996	2	A	3
2	QTDH	08/05/1997	5	B	9
3	EPSC	01/08/1998	6	A	10
4	ATMO	04/10/2000	10	A	5
5	ETMO	15/05/2000	11	A	11
6	E2CG	31/01/2000	9	A	4
7	ATMO	09/10/2001	20	C	8
8	QTDH	05/02/2002	19	C	7
9	ATMO	20/10/2002	13	A	6

NOTA: **ATMO** Ambulatório do Transplante de Medula Óssea; **QTDH** Ambulatório da Quimioterapia – Hospital Dia; **ETMO** Enfermaria do Transplante de Medula Óssea; **EPSC** Enfermaria do Pronto Socorro da Cirurgia; **ICR** Instituto da Criança; **E2CG** Enfermaria da Cirurgia Geral

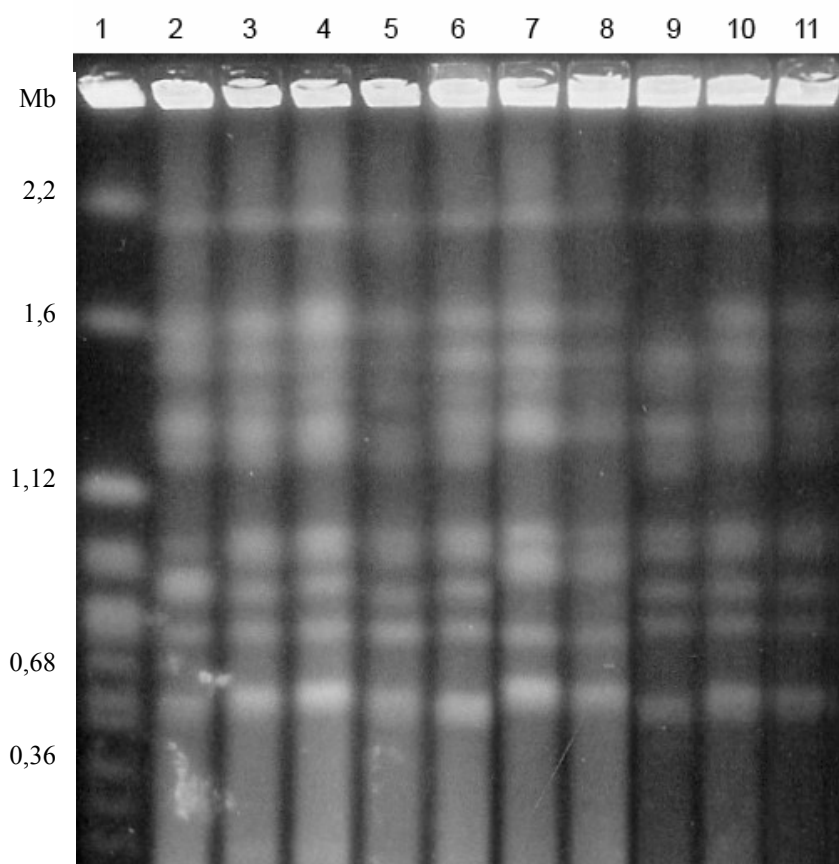


FIGURA 5. Eletroforese em campo pulsado de nove cepas de *R. mucilaginosa* isoladas de hemocultura – HC- FMUSP de janeiro de 1996 a dezembro de 2004.

Canaleta 1: marcador de peso molecular *S. cerevisiae*;

Canaleta 2: *R. minuta*;

Canaletas 3-6, 10- 11: perfil A;

Canaletas 7-8: perfil C;

Canaleta 9: perfil B.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, um número maior de infecções causadas por fungos incomuns tem sido relatado na literatura, principalmente na crescente população de pacientes imunossuprimidos. O manejo adequado das infecções causadas por estes microrganismos requer familiaridade com aspectos epidemiológicos, clínicos, microbiológicos e terapêuticos (Vartivarian et al., 1993, Hazen, 1995; Perfect e Schell, 1996; Fleming et al., 2002; Walsh et al., 2004; Pfaller e Diekema; 2004).

As leveduras do gênero *Rhodotorula* têm sido tradicionalmente consideradas microrganismos de baixa virulência quando comparadas a espécies de *Candida* e *Trichosporon*. Somente na última década este gênero tem sido progressivamente reconhecido como causa de infecção, especialmente em pacientes imunossuprimidos e na presença de cateter venoso central (Kiehn et al., 1992; Braun e Kauffman, 1992; Goldani et al., 1995; Colombo et al., 1997; Ahmed et al., 1998; Samonis et al., 2001; Zaas et al., 2003).

Cerca de 60 casos foram descritos até o momento de fungemia causada por espécies de *Rhodotorula* sendo 23 deles ocorridos em uma única instituição no início da década de 90, a maior casuística publicada até o momento (Kiehn et al., 1992; Anatoliotaki et al., 2003; Zaas et al., 2003; Pasqualotto et al., 2005).

No presente estudo, descrevemos a ocorrência de *Rhodotorula* spp. em amostras de hemocultura no HC-FMUSP de janeiro de 1996 a dezembro de 2004, observando sua freqüência em relação ao total de fungos isolados e principais gêneros de leveduras. Os pacientes identificados foram caracterizados de acordo com variáveis clínicas de interesse. Determinaram-se ainda as espécies isoladas, comparando-se o

desempenho de identificação de dois métodos comerciais com os resultados de método convencional de assimilação de carboidratos e nitrato. A atividade *in vitro* de diferentes drogas antifúngicas foi também determinada, assim como o perfil genotípico dos isolados.

Consistente com dados da literatura, *Candida* spp. (83,5 %) foi o gênero mais freqüente entre os 1.195 fungos isolados de hemocultura na Seção de Microbiologia da DLC do HC-FMUSP (Costa et al., 2000; Kovacicová et al., 2001). Embora infrequente, *Rhodotorula* spp. foram as leveduras não-*Candida* não-*Cryptococcus* mais isoladas em amostras de hemocultura processadas no laboratório nos anos de 1997, 2000 e 2002. Entretanto, o gênero representou apenas 2,3 % do total de leveduras isoladas, não sendo observada uma tendência de aumento no período avaliado ($p < 0,67$). Convém destacar que *Pichia anomala* foi responsável por três surtos ocorridos no berçário da Instituição nos anos de 1998, 2001 e 2004, anos em que sua prevalência ultrapassou a de *Rhodotorula* spp. Interessante comentar que dentre as leveduras não-*Candida* e não-*Cryptococcus* isoladas, *Rhodotorula* teve uma prevalência anual e global maior que *Trichosporon*, levedura considerada como principal agente de infecção fúngica causada por leveduras não-*Candida* em pacientes onco-hematológicos (Krcmery et al., 1999, Erer et al., 2000; Moretti-Branchini et al., 2001; Girmenia et al., 2005).

Os registros históricos do Laboratório de Microbiologia sobre ocorrência de fungos em amostras de hemocultura de 1990 a 1995 documentaram um provável surto de *Rhodotorula* spp. no berçário da Instituição em 1992, com 10 casos registrados. Nos anos seguintes, entre 1993 e 1995 ocorreram apenas dois casos de hemoculturas positivas para *Rhodotorula*. A partir de 1996, embora infrequente,

Rhodotorula, junto com *Pichia anomala*, passou a integrar a lista das leveduras mais isoladas anualmente em hemocultura no HC-FMUSP.

Durante o período avaliado, *Rhodotorula* foi isolada de hemocultura de 28 pacientes, sendo que apenas 25 foram incluídos neste estudo, pois não encontramos os dados clínicos referentes a três casos. Concordante com os resultados dos maiores estudos publicados sobre esta levedura, a grande maioria dos pacientes apresentava doença de base (96%), mais notadamente neoplasia hematológica, com 11 casos de linfoma. Nos 23 casos descritos por Kiehn et al. (1992), todos os pacientes apresentavam doença de base, sendo que neoplasia esteve presente em 87% (20/23). Destes, oito apresentavam tumores sólidos e 10 neoplasia hematológica, principalmente leucemia. Em 10 casos reportados por Zaas et al. (2003) apenas um paciente não apresentava doença de base, não sendo observado predomínio de doença neoplásica nestes pacientes.

Deve ser ressaltado que as outras doenças de base descritas no nosso trabalho, como anemia aplásica, anemia falciforme, cirrose hepática por vírus da hepatite B, podem cursar com comprometimento da função imune, favorecendo o surgimento de infecções.

Também relevante foi o grande número de pacientes que realizaram transplante de medula óssea (10/25, 40%), achado muito diferente do descrito até o momento na literatura. O tempo transcorrido entre transplante de medula óssea e isolamento de *Rhodotorula* no sangue variou de - 11 dias a 240 dias. O transplante realizado em 70% dos nossos casos foi autólogo, contrastando com os dados do Serviço de Hematologia da Divisão de Clínica Médica I do HC-FMUSP. Dados deste serviço mostram que, entre 1988 e julho de 2004,

1034 transplantes de medula óssea foram realizados, sendo $\approx 70\%$ do tipo alogênico. É surpreendente a concentração verificada de infecção por *Rhodotorula* entre casos de transplante autólogo (7 x 3, $p=0,016$), visto ser o transplante alogênico reconhecidamente associado a maior imunossupressão (Anaisse et al., 2003).

Avanços decorrentes das técnicas cirúrgicas utilizadas, terapêutica imunossupressora e cuidados clínicos repercutiram no aumento da sobrevida e qualidade de vida dos pacientes transplantados. Contudo, complicações infecciosas permanecem como uma das principais causas associadas à morbimortalidade destes pacientes (Patel e Paya, 1997; Gordon, 2001; Marr et al., 2002). Os pacientes transplantados constituem um grupo de alto risco para infecções fúngicas, que irá variar de acordo com o tipo de órgão transplantado e severidade da terapêutica imunossupressora (Greenberg, 2001; Anaisse et al., 2003). Entretanto, infecção por *Rhodotorula* ainda é causa infrequente de infecção fúngica em pacientes transplantados, incluindo transplantados de medula óssea, com poucos casos relatados na literatura. Em uma série de 1186 pacientes transplantados de medula óssea, apenas um caso de infecção por *Rhodotorula* foi relatado (Morrinson et al., 1993). Além disso, nos casos descritos de fungemia por *Rhodotorula* apenas quatro eram transplantados de medula óssea (Sheu et al., 1994; Chao et al., 1994; Petrocheilou-Paschou et al., 2001; Zaas et al., 2003).

A maioria dos pacientes avaliados (16/25) encontrava-se em unidades ambulatoriais, estando todos em seguimento nas unidades de hospital-dia da quimioterapia ou transplante de medula óssea. Por outro lado, nenhum caso foi visto em unidades de terapia intensiva, locais onde freqüentemente são descritos na

literatura pacientes internados com fungemia, particularmente candidemia (Blumberg et al, 2001; Trick et al., 2002; Rollides et al., 2003). É sabido que cada vez mais pacientes graves, incluindo imunossuprimidos, são conduzidos ambulatorialmente. Para estes pacientes, a exposição ao meio ambiente pode favorecer o surgimento de infecções, particularmente infecções fúngicas, já que estes microrganismos freqüentemente são ubíquos na natureza. As leveduras do gênero *Rhodotorula* foram isoladas de diversos ambientes incluindo água, ar, alimentos. Colonização por *Rhodotorula* pode resultar da interação do paciente com fatores ambientais, constituindo potencial fator de risco para fungemia, particularmente naqueles com uso de cateter intravascular. Deve ser ressaltado que não fez parte dos objetivos deste estudo a avaliação de fatores de risco da fungemia por *Rhodotorula*.

Embora o APACHE II score tenha sido desenvolvido para aplicação em pacientes de unidade de terapia intensiva, optou-se por avaliá-lo nos pacientes deste estudo, sendo possível calculá-lo apenas em 66,7% (12/18) dos nossos pacientes adultos. A dificuldade em obter o APACHE foi resultado do fato da maioria dos pacientes encontrar-se em acompanhamento ambulatorial, mais precisamente em unidades de hospital-dia, nos quais freqüentemente observou-se uma ausência de dados básicos para o cálculo do APACHE II score. Não obstante, a média e mediana do APACHE foi 11 e 12 (intervalo de 1-17), inferior ao previamente reportado para outras infecções fúngicas (Nolla-Sallas et al., 1997; Kontoyiannis et al., 2001; Minari et al., 2001). Para aqueles com pontuação superior a 10, o score mais elevado foi decorrente principalmente de idade, febre, doença de base e alterações hematológicas no hemograma.

Neutropenia foi observada em apenas três pacientes nas duas semanas que precederam o isolamento de *Rhodotorula* de hemocultura relacionada à quimioterapia e transplante de medula óssea. Entretanto, após hemocultura positiva, cinco pacientes evoluíram com neutropenia grave o que motivou a instituição de terapêutica em um paciente sem sinais e sintomas de infecção de corrente sanguínea.

É sabido que neutropenia é um fator de risco para infecção fúngica (Fridkin e Jarvis, 1996; Minari et al., 2001). Nas duas maiores casuística clínicas sobre fungemia por *Rhodotorula*, Kiehn et al. (1992) reportaram apenas dois pacientes com neutropenia no momento da hemocultura positiva e Zaas et al. (2003) apenas um caso, sem no entanto, ilustrar definição de neutropenia e tempo de observação da variável. Nossos achados são concordantes com estas descrições. Por outro lado, em várias descrições de casos isolados, neutropenia aparece associada à ocorrência de fungemia por *Rhodotorula* (Sheu et al., 1994; Colombo et al., 1997, Fanci et al., 1997; Kiraz et al., 2000; Samonis et al., 2001; Petrocheilou-Paschou et al., 2001; Pasqualotto et al., 2005). A baixa prevalência de neutropenia encontrada no nosso e nos demais estudos descritivos retrospectivos pode ser decorrente das limitações intrínsecas deste tipo de estudo. Também é possível que a perspectiva mostrada nestes estudos esteja correta e que outros componentes do sistema imune, que não neutrófilos, estejam associados à infecção por *Rhodotorula*.

A presença de cirurgia e mucosite, fatores de risco associados à infecção fúngica, não foram achados proeminentes na população estudada. A utilização de nutrição parenteral esteve presente em apenas três pacientes, dois deles em regime ambulatorial há mais de um ano, e possivelmente agregou risco para o desenvolvimento de fungemia (Fridkin e Jarvis, 1996; MacDonald et al., 1998;

Saiman et al., 2000; Blumberg et al., 2001). A utilização de nutrição parenteral como fator de risco de desenvolvimento de infecção fúngica foi mais bem avaliada em candidíase e envolve as seguintes alterações: achatamento de vilosidade intestinal elevando translocação com subsequente infecção e outros efeitos imunossupressores, como diminuição da função dos macrófagos e polimorfonucleares, inativação de imunoglobulina G e diminuição de fixação de complemento (Hennessey et al. 1991; Gogos e Kalfarentzos, 1995).

Utilização de corticosteróide, outras drogas imunossupressoras e quimioterápicos estiveram presentes em cerca de metade dos pacientes, o que não foi surpreendente dado o considerável número de pacientes oncológicos e transplantados de medula óssea. Por outro lado, estas drogas podem constituir fatores de risco isolados para a ocorrência de fungemia por *Rhodotorula*.

Em relação ao uso prévio de antibioticoterapia, quase metade dos pacientes estava sob utilização de um ou mais antibióticos, dados concordantes com a literatura sobre infecção fúngica da corrente sanguínea (Fridkin e Jarvis, 1996; Costa et al. 2000; Saiman et al. 2001). Glicopeptídeos e cefalosporinas de terceira geração foram os antibióticos mais utilizados. Nos dois maiores estudos de fungemia para *Rhodotorula*, nenhum dos autores descreveu esta variável. O uso de antibióticos múltiplos e/ou prolongadamente suprime a microflora endógena e aumenta a colonização de microrganismos resistentes e leveduras.

O papel do trato gastrintestinal como fonte de fungemia é mais bem estudado para *Candida* spp. (Sandovsky-Losica et al., 1992; Mellado et al., 2000; Takahashi et al., 2003) Entretanto, Samonis et al., em 2001, documentaram um caso de fungemia transitória por *Rhodotorula* em paciente com neoplasia, período breve de

neutropenia, com utilização previa de antibióticos e sem cateter venoso central. A hipótese considerada mais provável (aventada pela primeira vez na literatura) para desenvolvimento da fungemia transitória foi o aumento da colonização do trato gastrointestinal por *Rhodotorula*, pela utilização de antibióticos associados à mucosite e neutropenia breve. Outros estudos demonstraram o isolamento desta levedura em amostras clínicas de trato gastrointestinal, reiterando que a mesma faz parte da flora endógena, podendo constituir fonte de infecção em situações especiais (Kwon-Chung e Bennett, 1992; Nowakowska et al., 2004).

O número de pacientes em uso prévio, profilático ou terapêutico, de antifúngicos foi pequeno (2/23), sendo que apenas um estava em uso de fluconazol profilático três dias antes do isolamento de *Rhodotorula*. A utilização de fluconazol em esquemas profiláticos ou terapêuticos e a emergência de microrganismos resistentes é uma hipótese aventada por alguns autores (Goldani et al., 1995; Petrocheilou-Paschou et al., 2001). Este antifúngico foi introduzido em nosso hospital no ano de 1996, com aumento de consumo nos anos seguintes. Em 2000, o uso de profilaxia com fluconazol foi instituído para os pacientes das unidades do transplante de medula óssea. Nossos dados não sugerem a ocorrência de eventual relação entre utilização de fluconazol profilático e fungemia para *Rhodotorula*. Entretanto, mais uma vez deve-se ressaltar que o estudo realizado foi descritivo e retrospectivo, sendo que a utilização de fluconazol pode ter sido subestimada, uma vez que o período de avaliação levou em consideração apenas as duas semanas que antecederam a hemocultura positiva, além da possibilidade de subnotificação do uso deste agente em prontuário médico, pois algumas vezes foi referida a utilização de profilaxia antifúngica sem menção à droga em uso.

Outra característica de nossa casuística foi a presença de cateter venoso central em 88% dos pacientes, concordante com a maior parte dos casos relatados (Kiehn et al., 1992; Anatoliotaki et al., 2003; Zaas et al., 2003). O tempo médio de utilização de cateter foi de $86,5 \pm 64,8$ dias. Em dois pacientes, o dispositivo intravascular havia sido inserido há apenas 4 dias, sendo este o menor tempo de uso reportado até o momento (Petrocheilou-Paschou et al., 2001). A maioria dos pacientes estava em uso de cateter venoso central de longa permanência (91%), sendo o cateter de Hickman o mais utilizado. O uso prévio de cateter central tem sido associado ao risco de infecção da corrente sanguínea por *Rhodotorula* (Kiehn et al., 1992; Anatoliotaki et al., 2003). O fungo pode colonizar o cateter através da colonização prévia da pele ou secundária a colonização gastrintestinal. O risco de infecção relacionada a cateteres vasculares varia de acordo com o tipo de cateter, sítio de inserção, duração, tamanho do hospital, unidade ou serviço (Mermel et al., 2001). Alguns estudos documentaram um maior risco de infecção com a utilização de cateter semi-implantável do tipo Hickman em relação a cateter totalmente implantável (Pegues et al., 1992; Viot, 2000).

Quanto ao significado clínico do isolamento de *Rhodotorula* de hemocultura, 80% (20/25) dos pacientes do presente estudo foram classificados como infecção da corrente sanguínea. O critério utilizado foi adaptado do CDC, sendo que fungemia transitória não foi incluída na nossa avaliação. É possível que este tenha sido o caso de dois dos nossos pacientes, classificados como não infecção e que não utilizavam cateter venoso central (números 3 e 9; TABELA 6), à semelhança do descrito por Samonis et al.

(2001). Em dois outros casos, classificados como colonização de cateter central, o dispositivo foi removido após cinco e oito dias após o isolamento fúngico, sendo que um recebeu terapêutica antifúngica parenteral prescrita pelo médico assistente.

Estes casos refletem a dificuldade de se classificar adequadamente o isolamento de *Rhodotorula* do sangue como infecção. Nos dois primeiros podemos ter sido muito rigorosos na classificação clínica do episódio, atribuindo os sintomas relacionados à infecção a outras condições que não a presença de *Rhodotorula* no sangue periférico. Nos dois últimos casos, nossa classificação não corresponde à conduta adotada pelos médicos assistentes, que valorizaram os achados a ponto de propor medidas terapêuticas específicas. Por outro lado, dois pacientes considerados como tendo infecção de corrente sanguínea não receberam tratamento específico após o primeiro isolamento da levedura.

No estudo conduzido por Kiehn et al., (1992) notou-se um aumento significativo do isolamento de *Rhodotorula* spp. de sete casos em 22 anos para 36 casos em quatro anos. Destes, 36% foram interpretados como não significantes dados o baixo número de colônias isoladas e ausência de sinais clínicos, sendo os mesmos excluídos de sua casuística, considerados como casos de pseudo-fungemia.

Contudo, no nosso estudo, mesmo considerando-se as dificuldades de classificação apontadas acima, observou-se que o isolamento de *Rhodotorula* em sangue, apesar de ser um evento infrequente, representou infecção de corrente sanguínea na maioria dos casos (80%). Portanto, nossos dados

reforçam a idéia que microrganismos pouco freqüentes, tradicionalmente considerados de baixa virulência, podem causar infecções sistêmicas, particularmente em situações especiais.

Rhodotorula foi o único agente isolado de hemocultura em 60% dos nossos pacientes, freqüência maior que a reportada por Kiehn et al. (1992), onde o isolamento polimicrobiano foi predominante (65%). Na nossa casuística, a infecção polimicrobiana ocorreu em apenas 28% das vezes. Contudo, em 12% (3/25) dos casos observamos o isolamento de outros agentes em hemoculturas colhidas entre 24, 48 horas e cinco dias após o isolamento de *Rhodotorula*.

Fungemia com dois ou mais fungos isolados é um evento infrequente (Wong et al. 2001, Garbino et al., 2001; Pulimood et al., 2002; Yera et al., 2004). Neste trabalho ocorreram dois casos de isolamento de *Rhodotorula* concomitantes ao isolamento de *C. albicans* e *P. ohmerii*, respectivamente. Estudo anterior também reportou dois casos de hemocultura positiva para *Rhodotorula* concomitante a outras leveduras: *C. parapsilosis* e *C. guillhermondii* (Kiehn et al., 1992).

O sítio de coleta da hemocultura, central ou periférico não foi possível ser determinado na maioria dos pacientes por ausência de informação adequada no pedido médico. A ponta do cateter foi encaminhada para cultura em todos os pacientes com cateter central que tiveram o dispositivo removido (19/21), sendo positiva para *Rhodotorula* em apenas dois casos. Fatores relacionados à coleta, transporte e processamento do material podem ter interferido nestes resultados. Além disso, 11 pacientes com cultura negativa já estavam sob terapêutica antifúngica previa. A técnica semiquantitativa de Maki é utilizada de rotina na Seção de Microbiologia e apenas a superfície externa do cateter é cultivada. A maioria dos

pacientes com cateter central apresentava cateter de longa duração e com tempo de uso superior a duas semanas. Para estes pacientes, a colonização das conexões e da superfície intraluminal do cateter constituem a rota mais comum de infecção (Mermel et al., 2001) e técnicas diagnósticas quantitativas ou por tempo diferencial de positividade parecem ser mais adequadas (Siegman-Ingra et al., 1997, Raad et al., 2004; Safdar et al., 2005). Cabe ressaltar ainda, que a grande maioria dos médicos solicitou apenas cultura geral. Na solicitação específica de cultura para fungos, o meio de cultura utilizado é o mesmo, porém o tempo de incubação é mais prolongado, permitindo a recuperação de leveduras com crescimento superior a 24 horas, como *Rhodotorula* spp. Achados semelhantes foram apresentados por Kiehn et al. (1992).

Contudo, outra interpretação possível para estes achados é que a origem da fungemia não seja o cateter, mas sim translocação do trato gastrointestinal ou outras fontes de infecção ainda não conhecidas.

Em relação a abordagens terapêuticas, considerando remoção de cateter venoso central e utilização de antifúngicos, 89,5% dos pacientes com ICS retiraram cateter central e 88% utilizaram antifúngicos sistêmicos, sendo anfotericina B a droga de escolha em 93,3% dos casos. Entretanto, o tempo transcorrido entre a hemocultura positiva e a retirada do cateter variou de 1 a 37 dias. Vale mencionar que um paciente, transplantado de medula óssea, com várias hemoculturas positivas evoluiu com neutropenia e persistência de febre até retirada de cateter central, dezenove dias após a primeira hemocultura positiva, mesmo em uso de antimicrobianos de amplo espectro e com dose cumulativa de anfotericina B deoxicolato de 750 mg. Outro não retirou cateter durante episódio inicial de isolamento polimicrobiano em

hemocultura, retornando 27 dias depois com novo episódio de infecção da corrente sanguínea, com isolamento apenas de *Rhodotorula* sp., porém para o qual não tivemos informação do seguimento por transferência para outro serviço. Por outro lado, um dos pacientes não retirou cateter central, não recebeu antifúngico, e não houve novo episódio de fungemia durante o período avaliado (30 dias).

No estudo de Kiehn et al. (1992), dos 23 pacientes com fungemia associada a cateter central, cinco não receberam qualquer antifúngico e removeram cateter central e cinco não retiraram o cateter e receberam anfotericina B deoxicolato. Os demais tiveram o cateter retirado e receberam anfotericina B. Para todos os casos não houve relato de recaída durante o tempo de seguimento, que variou de dois a sete meses. Há outros relatos na literatura ilustrando ambas as situações (Goldani et al., 1995; Lo Re et al., 2003; Hsueh et al., 2003; Pasquollato et al., 2005). A necessidade de retirada ou não de cateter central diante de uma possível infecção requer avaliação clínica do paciente e conhecimento do tipo de microrganismo isolado. Na tentativa de salvaguardar cateteres implantados cirurgicamente em pacientes com suspeita de infecção relacionada ao cateter e necessidade de terapia endovenosa prolongada, foi desenvolvida uma estratégia de tratamento denominada técnica de bloqueio antibiótico. Esta estratégia é fundamentada no conceito de que a superfície intraluminal do cateter é a principal rota de infecção, sendo o cateter selado com solução de antibióticos por algumas horas. Alguns microrganismos são mais difíceis de serem erradicados com esta técnica, particularmente *Candida* spp. (Kryswda et al. 1995; Benoit et al., 1995) e em infecções por este agente em cateteres semi-implantáveis ou implantáveis, a recomendação é de retirada do dispositivo sem tentativa de utilização de técnica de bloqueio (Rex et al., 2000; Raad et al., 2004;

Pappas et al., 2004; Almirante et al., 2005). A técnica de bloqueio de cateter foi aplicada sem sucesso em pelo menos um caso de infecção por *Rhodotorula* sp. (Krzywda et al., 1995).

Não há até o momento uma recomendação definitiva para tratamento de infecções da corrente sanguínea causadas por *Rhodotorula*, mas a utilização de anfotericina B associada à remoção de cateter (quando presente) é recomendada por diversos autores para prevenir ocorrência de infecção mais grave (Petrocheilou-Paschou et al., 2001; Samonis et al., 2001, Lo Re et al., 2003).

Conforme já mencionado, a maioria dos pacientes deste estudo, classificados como ICS, recebeu terapêutica antifúngica sistêmica (15/17, 88,2%), sendo anfotericina B deoxicolato a droga mais utilizada (16/17, 94,1%). Interessante notar que o tempo médio transcorrido entre o isolamento do agente de hemocultura e o início da terapêutica antifúngica foi de $9,1 \pm 7,5$ dias. Deve-se destacar que em um caso este tempo foi de 27 dias, sendo as hemoculturas positivas inicialmente não valorizadas. O tempo médio maior que uma semana refletiu, com observação registrada em prontuário em alguns casos, dúvidas dos médicos assistentes sobre a necessidade de tratamento sistêmico para este fungo, combinado ou não com a retirada de cateter, e qual o melhor regime terapêutico. Consoante com o registrado na literatura observou-se uma grande variação quanto às doses utilizadas e o tempo de tratamento. A dose de anfotericina B deoxicolato variou de 60 a 930 mg, com tempo médio de uso de $13,5 \pm 4,8$ dias. Formulações lipossomais foram empregadas em dois pacientes.

A utilização de fluconazol não é recomendada para o tratamento destas infecções devido à limitada atividade *in vitro* deste antifúngico. Foi descrita tanto

falha terapêutica como eficácia clínica com esta droga, entretanto com retirada concomitante de cateter central (Anatoilotaki et al., 2003; Hsueh et al., 2003). Neste trabalho, apenas dois pacientes receberam fluconazol endovenoso. Em um caso, a terapêutica foi modificada para anfotericina B, por persistência de isolamento fúngico após oito dias de uso do fluconazol endovenoso. O outro paciente recebeu quatro dias de fluconazol parenteral, com retirada precoce de cateter central, e recomendação de uso oral do azólico por mais dez dias.

Foi possível obter dados da evolução clínica de 23 pacientes durante todo o período de acompanhamento proposto. Destes, 19 foram classificados como infecção da corrente sanguínea, dos quais quatro evoluíram para óbito (21%). Nenhum dos pacientes cujo isolamento de *Rhodotorula* foi considerado como não-infecção de corrente sanguínea evoluiu para óbito durante o período avaliado.

Necropsia foi realizada apenas no paciente 20 (TABELAS 4 e 6), um recém-nascido com hemocultura positiva para *Rhodotorula mucilaginosa* e *Candida albicans*, que não recebeu terapêutica antifúngica, cujo resultado revelou infecção fúngica sistêmica sugestiva de *Candida* sp. Entretanto, como não houve a negação da presença de leveduras em brotamento sem pseudo-hifa/hifa nos diferentes tecidos, não foi possível descartar a presença concomitante de *Rhodotorula* como agente associado ao óbito.

A infecção por *Rhodotorula* pode ter contribuído para o óbito deste paciente e também para o óbito do paciente de número 21 (Tabelas 4 e 6), que se apresentou para consulta médica com quadro febril e calafrios, no D + 240 de transplante de medula óssea autólogo, com isolamento de *Rhodotorula mucilaginosa* em duas hemoculturas obtidas cinco dias antes. No lavado broncoalveolar obtido 24 horas

antes do óbito, na pesquisa direta do material observaram-se estruturas sugestivas de *Pneumocystis jiroveci* (*P. carinii*) coradas pelo azul de orto-toluidina e, na cultura de fungos realizada, houve isolamento de *Rhodotorula mucilaginosa*.

Apesar de não ter sido objetivo deste estudo avaliar a mortalidade atribuída à infecção por *Rhodotorula*, visto ser este um estudo descritivo observacional, baseado em achado de hemoculturas positivas e sem garantia de descrição adequada dos dados clínicos que permitissem a inferência da participação do agente em questão no óbito, não nos furtamos à opinião da possível contribuição da infecção sistêmica por *Rhodotorula* no óbito dos dois casos descritos acima.

Deve ser destacado que a letalidade potencialmente atribuível à *Rhodotorula* em nossa casuística é de $\approx 10\%$, da mesma ordem de grandeza da estimativa publicada na literatura atual. A mortalidade atribuída à infecção invasiva por *Rhodotorula*, estimada em 15 % (Krcmery et al., 1999), é menor que a reportada para candidemia (49% - Gudlaugsson et al., 2003) e *Trichosporon* (64 %, Krcmery et al., 1999), porém não deve ser negligenciada.

A complexidade dos pacientes sob risco de desenvolvimento de infecção fúngica e a crescente diversidade dos fungos envolvidos trazem um desafio a mais no diagnóstico e tratamento destas infecções. Neste contexto, o isolamento e a identificação correta dos fungos são muito importantes, pois diferem entre si quanto à suscetibilidade *in vitro* aos diferentes antifúngicos.

A identificação correta de um fungo ao nível de espécie agrega informação não somente epidemiológica como também pode auxiliar na escolha terapêutica mais adequada, já que algumas espécies são intrinsecamente resistentes a alguns

antifúngicos e outras podem apresentar maior propensão de aquisição de resistência durante terapêutica prolongada ou exposição a doses subterapêuticas.

Em relação às infecções causadas por leveduras do gênero *Rhodotorula*, das 34 espécies descritas, apenas três tem sido associadas a infecções no homem: *R. mucilaginosa*, com maior número de casos descritos, seguida de *R. glutinis* e em menor frequência, *R. minuta*. A diferença entre elas reside no perfil de assimilação de carboidratos e nitrato.

A identificação das leveduras é realizada através de características macromorfológicas e perfil bioquímico associadas às características micromorfológicas. O método convencional de assimilação de carboidratos não é adequado para os laboratórios clínicos que realizam um grande número de culturas micológicas. A miniaturização destes painéis, contendo açúcares-chave para identificação das diferentes leveduras em tempos menores, representou um avanço para laboratórios de microbiologia clínica.

Não existe trabalho na literatura que compara o desempenho de sistemas comerciais na identificação correta das espécies para o gênero *Rhodotorula*. Os estudos publicados avaliaram a performance de sistemas comerciais na identificação de leveduras em geral e incluíram um número pequeno de *Rhodotorula* spp. avaliando mais a capacidade de identificação do gênero (Espinel-Ingroff et al., 1998; Verweij et al., 1999; Wadlin et al., 1999). Outro estudo demonstrou uma limitação do sistema comercial API ID 32C (bioMérieux, França) na identificação de *R. glutinis* (Garcia-Martos et al., 2004). Em nosso estudo, a identificação das espécies de *Rhodotorula* nos 25 pacientes com hemocultura positiva foi realizada através do sistema de identificação automatizado Vitek (bioMérieux, EUA) sendo 15 (60%) *R.*

mucilaginosa, sete (28%) *R. glutinis* e e três (12%) sem identificação de espécie, devido à baixa probabilidade obtida. Somente 20 cepas viáveis foram incluídas na reavaliação microbiológica, re-identificadas através dos sistemas comerciais Vitek e API 20C AUX, ambos da bioMérieux (EUA). Os resultados foram comparados ao método convencional de assimilação de carboidratos e nitrato que identificou todas as espécies como *R. mucilaginosa*. Chamou atenção o fato do sistema Vitek ter identificado quatro cepas (20 %) como *R. glutinis* e o API 20C AUX apenas uma (5%).

A diferença entre estas duas espécies reside principalmente no teste de assimilação de nitratos, positivo apenas para *R. glutinis*. A assimilação de carboidratos pode apresentar resultados variáveis. Interessante notar que o nitrato faz parte dos compostos testados no cartão do sistema Vitek, mas não na galeria do API 20C AUX. Todas as cepas identificadas como *R. glutinis* pelo Vitek exibiram resultado do nitrato negativo, mas o banco de dados do sistema parece considerar outros açúcares como mais importantes na identificação de *R. glutinis*, tais como trealose e sorbitol. Entretanto, no manual de referência do produto, as provas diferenciais entre *R. glutinis* e *R. mucilaginosa* sugeridas incluem melibiose e melezitose, além do nitrato. Para confirmação da espécie, é necessário teste de assimilação de nitrato positivo para identificação de *R. glutinis* (Warren e Hazen, 1999; Fell e Statzell-Tallman, 2000).

Embora o API 20C AUX não tenha nitrato na sua galeria, são considerados dois perfis de assimilação de açúcares para *R. mucilaginosa*, tipo 1 e 2 no software do produto, o que talvez possa aumentar a performance na identificação evitando erros de classificação da espécie como *R. glutinis*.

Para laboratórios de micologia clínica com grande número de leveduras isoladas, a automação representou um considerável avanço. O sistema automatizado Vitek apresenta a conveniência de ser um sistema automatizado, com relativa facilidade de manuseio, permitindo uma otimização no gerenciamento de dados gerados. É capaz de identificar as principais leveduras ao nível de espécie, com tempo de liberação de resultado variando de 24 a 48 horas identificando corretamente mais de 93% de leveduras comuns (Freydiere et al., 2001). Entretanto, para gêneros e espécies menos frequentes, apresenta limitações quanto à confiabilidade do resultado gerado ou mesmo incapacidade de identificação (Doodley et al., 1994; Fenn et al., 1994; Riddle et al., 1994; Verwij et al., 1999; Freydiere et al., 2001).

O sistema manual API 20C Aux (bioMérieux, EUA) é considerado um método de referência, embora algumas limitações também tenham sido publicadas (Wadlin et al., 1999; Freydiere et al., 2001). Para laboratórios com grande volume de identificação de leveduras, apresenta como desvantagem, além do custo, o fato de ser um sistema totalmente manual, gerando resultados entre 48-72 horas e dúvidas na interpretação visual dos resultados de assimilação de carboidratos.

Algumas limitações exibidas pelos diferentes sistemas de identificação de leveduras podem ser contornadas através da utilização combinada de avaliação de características micromorfológicas. Entretanto, para as espécies de *Rhodotorula* isto não se aplica, uma vez que não há característica peculiar que diferencie uma espécie da outra.

Diante destes resultados, o mais prudente seria confirmar a identificação de *R. glutinis* isolada com teste de assimilação de nitrato, especialmente para os usuários

do sistema automatizado Vitek. Também se deve interpretar com cuidado os trabalhos publicados sobre *R. glutinis* diante das considerações acima expostas.

Com relação ao teste de sensibilidade aos antifúngicos, há pouco mais de duas décadas parecia desnecessária a necessidade de um antifungigrama, devido à baixa incidência de infecções fúngicas graves e ao limitado arsenal terapêutico disponível. Com o progressivo aumento destas infecções, o reconhecimento dos fungos como potenciais patógenos e a introdução de novas drogas antifúngicas ampliando o arsenal terapêutico, tornou-se evidente a necessidade de um teste capaz de orientar a escolha da terapêutica mais adequada. Em 1997, após 15 anos de esforços, o NCCLS aprovou o documento intitulado “Método de Referência por Diluição em Caldo para Teste de Sensibilidade de Leveduras”, padronizado para *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans*”, M27-A (NCCLS, 1997), tendo demonstrado uma boa reprodutibilidade tanto intra como interlaboratorial. Com os resultados do teste, é possível comparar as relativas potências *in vitro* dos diferentes antifúngicos e construir um ranking de sensibilidade para leveduras de uma mesma espécie.

O objetivo de um teste de sensibilidade é auxiliar na escolha da terapêutica mais adequada no tratamento de uma infecção causada por um patógeno específico. Entretanto, devemos lembrar que os testes são realizados em cenários artificializados com limitações intrínsecas para prever resposta clínica, sendo que no cenário *in vivo* inúmeras variáveis atuam, como sítio da infecção, doença de base do paciente e penetração da droga, entre outras. Particularmente para as infecções fúngicas, a recuperação da função imunológica do paciente tem sido apontada com um dos maiores preditores de sucesso terapêutico.

O documento do NCCLS (1997) estabeleceu critérios pontos de corte interpretativos apenas para fluconazol e itraconazol para *Candida* spp. Vale ressaltar que os pontos de corte para fluconazol foram estabelecidos a partir de estudos de candidíase orofaríngea em pacientes HIV + e infecções invasivas para *Candida* spp. em pacientes não neutropênicos, exceto para *C. krusei*, intrinsecamente resistente a fluconazol. Para *Cryptococcus neoformans* vários estudos sugerem uma correlação entre concentração inibitória mínima elevada e falha clínica, sem, no entanto, estabelecer ponto de corte específicos. Para itraconazol, os pontos de corte foram estabelecidos para *Candida* spp. a partir de estudos realizados exclusivamente em pacientes com candidíase orofaríngea. Estes valores foram estabelecidos dentro da premissa de que sensibilidade *in vitro* nem sempre prediz sucesso terapêutico, mas resistência *in vitro* freqüentemente está associada à falha terapêutica (Rex et al.,1997).

A despeito das limitações, o documento do NCCLS (1997) representou um considerável avanço e é considerado um método de referência para realização de teste de sensibilidade aos antifúngicos. Outros métodos foram desenvolvidos, denominados NCCLS-like, entre eles o proposto pelo EUCAST (2002) da Sociedade Européia de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas. É baseado no método proposto pelo NCCLS (1997) incorporando algumas modificações: adição de 2% de glicose no meio de RPMI, aumento do inóculo utilizado ($1-5 \times 10^5$ UFC/mL) e leitura espectrofotométrica. Com estas modificações pretende-se diminuir o tempo de incubação necessário para determinação de MIC e eliminar a subjetividade da leitura visual para cálculo dos percentuais de inibição. O método EUCAST (2002) apresenta boa correlação com o método NCCLS (> 85%) e pode constituir uma alternativa

semi-automatizada para os laboratórios clínicos (Cuenca-Estrella, 2001; Cuenca Estrella; 2003).

Embora não existam pontos de corte para interpretação dos resultados para todas as leveduras, é importante a avaliação da atividade *in vitro* dos diferentes antifúngicos particularmente de fungos menos frequentes. Até recentemente existiam poucos trabalhos a respeito de suscetibilidade *in vitro* para espécies de *Rhodotorula* utilizando metodologia padronizada que permitam comparação de resultados obtidos (TABELA 1). Surpreendentemente, os resultados obtidos por Kiehn et al. (1992) nos testes de sensibilidade realizados em 23 cepas de *Rhodotorula* em 1992, fase ainda bastante embrionária de padronização de teste de sensibilidade, até recentemente ainda eram citados na literatura, incluindo artigos de revisão (Kiraz et al., 2000; Samonis et al., 2001; Preney et al., 2004).

A partir do final de 2003, trabalhos de sensibilidade *in vitro* utilizando metodologia padronizada em um maior número de isolados são publicados, sendo que Diekema et al. (2005) avaliaram 64 cepas de *Rhodotorula*, 28 delas provenientes de amostras sanguíneas, a maior casuística publicada até o momento utilizando metodologia padronizada.

Neste trabalho, determinamos a concentração inibitória mínima a diferentes antifúngicos utilizando as metodologias propostas pelo NCCLS (2002) e EUCAST (2002) em 20 cepas de *Rhodotorula* isoladas de sangue, considerando o método proposto pelo NCCLS como padrão-ouro.

Não foi possível comparar os resultados obtidos após 48 horas de incubação entre as duas metodologias, uma vez que não houve crescimento suficiente de inúmeras cepas na metodologia proposta pelo NCCLS, não permitindo a leitura

espectrofotométrica para todos os antifúngicos testados. Também não ocorreu crescimento uniforme das cepas no protocolo sugerido pelo EUCAST.

No estudo realizado por Zaas et al. (2003), das 10 cepas avaliadas, duas não exibiram crescimento a 35°C, sendo que concentração inibitória mínima foi determinada a 30°C após cinco dias de incubação. Diekema et al. (2005) também relataram falha de crescimento de duas cepas a 35°C. O crescimento adequado de algumas leveduras, particularmente as não fermentadoras da glicose, como *Cryptococcus neoformans*, tem sido um problema nas condições de teste dos métodos padronizados para o teste de sensibilidade aos antifúngicos. Algumas modificações têm sido propostas, como a utilização de meio alternativo de crescimento e condições de incubação, como agitação das microplacas e temperatura utilizada. Neste trabalho, todas as cepas exibiram crescimento a 35°C, após 72 horas de incubação e sem agitação das microplacas.

Conforme a literatura, os resultados do teste de sensibilidade para anfotericina B demonstraram uma boa atividade *in vitro* com MIC₅₀ 0,5 µg/mL e MIC₉₀ 0,5 µg/mL obtidos de acordo com NCCLS e MIC₉₀ 1 µg/mL pelo EUCAST. Os valores obtidos por ambas as metodologias foram 100% concordantes.

Entre os compostos azólicos, itraconazol demonstrou uma atividade *in vitro* variável com valores obtidos para MIC₅₀ e MIC₉₀ de 0,5 e 2 µg/ml respectivamente (NCCLS, 2002), sendo que 65% das cepas foram inibidas com concentração inibitória mínima < 1 µg/mL. Os resultados para itraconazol foram semelhantes aos obtidos por outros autores (Espinel-Ingroff, 1998; Barcheisi et al., 2000; Galan-Sanchez et al., 1999; Garcia-Martos et al., 2001), mas incluiu valores menores para MIC₅₀/MIC₉₀ do que aqueles reportados por Diekema et al. (2005), onde 30% das

cepas apresentaram MIC > 4 µg/ml. Este autor testou um maior número de isolados obtendo uma escala de valores de MIC mais ampla. Cabe ressaltar que não há qualquer descrição sobre tipo de paciente e possível exposição a azólicos. Nas 29 cepas avaliadas por Gomez-Lopez (2005) segundo protocolo EUCAST, o intervalo de variação observação para MIC foi semelhante ao nosso resultado, porém com MIC₉₀ mais elevado (> 8 µg/mL). Os parâmetros utilizados, como tempo de incubação (48 horas) e temperatura de incubação (30 °C), poderiam explicar estas diferenças. Serena et al. (2004) avaliaram 10 cepas de *R. glutinis* com intervalo de variação de 1-32 µg/mL e MIC₉₀ de 32 µg/mL, bem superior aos nossos resultados. Uma possível explicação seria o fato de termos avaliado apenas *R. mucilaginosa* e diferenças entre as espécies podem existir, embora isto não tenha sido observado por outros autores (Zaas et al., 2003, Diekema et al., 2005). Outra possibilidade é a presença do fenômeno de trailing descrito para compostos azólicos utilizando o método de diluição em caldo, tornando a determinação da concentração inibitória mínima problemática e elevando artificialmente os resultados obtidos. Normalmente estas cepas exibem MIC menores com 24 horas de incubação e MIC bem mais elevados após leitura com 48 horas de incubação. O fenômeno parece estar relacionado ao pH do meio (Revankar et al., 1998; Marr et al., 1999). A concordância tanto intra como interlaboratorial para itraconazol pode ser problemática, em parte devido a sua baixa solubilidade, como também a diferenças na interpretação da inibição de crescimento e ao fenômeno de trailing. Em todos os artigos publicados não há menção sobre a ocorrência de trailing para os azólicos testados e tampouco foi abordada a questão da reprodutibilidade. No nosso trabalho, a concordância dos

resultados obtidos para itraconazol por ambas as metodologias, considerando variação ± 2 diluições, foi de 85%.

Com relação ao voriconazol, o intervalo de variação observado incluiu valores de MIC mais baixos do que o publicado por outros autores (Zaas et al., 2003, Espinel-Ingroff, 1998; Serena et al., 2004; Diekema et al., 2005). Entretanto, os valores obtidos MIC₅₀ e MIC₉₀ (1- 4 $\mu\text{g/mL}$) foram semelhantes a outros relatos na literatura (Gomes-Lopez et al., 2005; Diekema et al., 2005) tornando duvidosa sua escolha como opção terapêutica no tratamento destas infecções. A concordância dos resultados obtidos por ambas as metodologias considerando variação ± 2 diluições foi de 90%.

Em relação ao fluconazol, todas as concentrações inibitórias mínimas obtidas por ambas as metodologias foram uniformemente elevadas (MIC₅₀ e MIC₉₀ $> 64 \mu\text{g/mL}$), concordante com inúmeros relatos prévios e sugerindo uma possível resistência intrínseca deste gênero para fluconazol (Zaas et al., 2003; Serena et al., 2004; Diekema et al., 2005). Chama atenção o resultado obtido em algumas cepas por Gomes-Lopez et al. (2005) no valor de 8 $\mu\text{g/mL}$. O protocolo realizado foi de acordo com EUCAST, porém com incubação a 30°C e leitura realizada após 48 horas.

Neste momento, não existem trabalhos sobre possíveis mecanismos de resistência *in vitro* ao fluconazol e leveduras do gênero *Rhodotorula*, mas diante dos resultados observados nos testes de sensibilidade, o mais prudente seria não utilizá-lo no tratamento de infecções causadas por estas leveduras.

Neste estudo, não foi possível realizar teste de sensibilidade utilizando flucitosina, novos triazólicos, como ravuconazol e posaconazol, e equinocandinas.

Vários trabalhos reportam uma baixa concentração inibitória mínima para flucitosina, exceto os valores relatados por Gomez-Lopez et al. (2005), constituindo uma possível opção terapêutica no tratamento de infecções por *Rhodotorula* (Galan-Sanchez et al., 1999; Garcia-Martos et al., 2001; Zaas et al., 2003; Diekema et al., 2005). Contudo, não deve ser utilizada como agente único devido à possibilidade de emergência de resistência durante o tratamento. No Brasil, este antifúngico não é comercializado e, mesmo em hospitais de referência, não está prontamente disponível. Quanto aos novos azólicos de espectro estendido, poucos trabalhos avaliaram sua potência *in vitro*, sendo que o ravuconazol parece ser o composto mais ativo (Zaas et al., 2003; Diekema et al., 2005; Gomez-Lopez et al., 2005). Entretanto, maiores trabalhos são necessários para avaliar a sua utilidade clínica já que a ocorrência de resistência cruzada em compostos azólicos é uma possibilidade. Assim como previamente relatado para espécies de *Cryptococcus*, a nova classe de antifúngicos, equinocandinas, não têm atividade *in vitro* para espécies de *Rhodotorula* e não devem ser consideradas como opção terapêutica.

A caracterização molecular dos diferentes fungos pode auxiliar não somente no conhecimento taxonômico dos mesmos como na investigação de eventuais surtos. Até o momento, poucos trabalhos foram publicados a respeito da caracterização molecular de *Rhodotorula* spp. sendo que um deles avaliou características filogenéticas do gênero (Biswas et al., 2001; Hsueh et al., 2003; Saracli et al., 2003). Apenas Saracli et al. (2003), avaliaram seis cepas de *R. mucilaginosa*, sendo a maioria isolada de sangue.

Neste estudo, foram avaliadas 19 cepas de *R. mucilaginosa* através da cariotipagem eletroforética em campo pulsado, que a despeito de ser uma técnica

trabalhosa é aceita como método de referência para tipagem tendo sido utilizada em outros fungos (Wickes et al., 1994; Hamal et al., 2001; Soll, 2000). Apenas nove cepas foram tipáveis por este método, evidenciando três diferentes cariótipos e não houve uma correlação dos mesmos com diferença de atividade *in vitro* dos antifúngicos testados. O protocolo utilizado foi semelhante ao descrito por Saracli et al. (2003), incluindo algumas modificações. Não observamos diferenças na utilização de 25 mg ou 50 mg da enzima para lise das células (*Trichoderma harzianum*, Sigma, EUA, L2265). Os problemas encontrados na tipagem podem ter sido decorrentes do protocolo utilizado para extração de DNA. Não avaliamos formalmente a obtenção de esferoplastos o que pode ter contribuído para os resultados negativos observados. Outras variáveis tais como pH de tampões utilizados, tempo e temperatura de incubação nas diferentes etapas da extração, além de parâmetros de corrida do gel foram exaustivamente avaliados na tentativa de incluir as 19 cepas no estudo, porém sem sucesso.

O poder discriminatório do teste foi similar ao estudo previamente descrito (Saracli et al., 2003) sendo que a cepa controle de *Rhodotorula minuta* demonstrou perfil diferente quando comparada aos isolados da instituição. Entretanto, a variabilidade genética da *Rhodotorula* precisa ser melhor estudada, comparando métodos de tipagem molecular com sequenciamento e também a aplicação dos mesmos durante a ocorrência de um surto já que no estudo de Saracli et al. (2003), cepas de hospitais não relacionados mostraram o mesmo perfil molecular.

Outros métodos tais como amplificação de seguimentos aleatórios de DNA (RAPD) e a utilização de enzimas de restrição devem ser testados para caracterização molecular de leveduras do gênero *Rhodotorula*.

Em resumo, neste estudo, observou-se que o isolamento de *Rhodotorula* de hemoculturas, apesar de ser evento infrequente, não deve ser negligenciado, pois representou infecção de corrente sanguínea em 80% dos casos, verificada particularmente em pacientes imunossuprimidos, com potencial não desprezível de participação no óbito em até 10% das ocorrências. Vale ressaltar que nenhum estudo de caso-controle foi realizado até o momento para avaliação de fatores de risco e da mortalidade atribuída às infecções por *Rhodotorula*. Alguns dos achados clínicos descritos neste estudo, consoantes com o encontrado na literatura específica, não são diferentes daqueles relatados em outras infecções fúngicas sistêmicas como candidemia. Não há até o momento recomendação estabelecida para tratamento destas infecções, mas a utilização de anfotericina B associada à remoção de cateter tem sido recomendada por diversos autores, com o que concordamos.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- *Rhodotorula* foi a levedura não-*Candida* não-*Cryptococcus* mais freqüentemente isolada de hemocultura no HCFMUSP em 1997, 2000 e 2002. Entretanto, representou apenas 2,3% dos fungos isolados de hemocultura entre janeiro de 1996 e dezembro 2004.
- A distribuição temporo-espacial dos casos não sugeriu presença de surto.
- Os pacientes eram predominantemente do sexo masculino, em seguimento ambulatorial, com doença de base, principalmente neoplasia hematológica (68%).
- Transplante de medula óssea foi realizado em 40% dos pacientes, sendo 70% deles do tipo autólogo.
- A maioria dos pacientes (88%) utilizava cateter venoso central no momento do isolamento fúngico; sendo o de longa permanência o mais freqüente.
- Infecção da corrente sanguínea ocorreu em 80% dos casos analisados.
- A maioria (88%) dos pacientes com ICS foi submetida à abordagem terapêutica combinada, com retirada de cateter venoso central e utilização de

antifúngicos sistêmicos, sendo anfotericina B a droga de escolha em 94% dos casos.

- Óbito ocorreu em 21% (4) dos pacientes com ICS, sendo que em dois deles consideramos que a infecção fúngica pode ter contribuído para o evento.
- *Rhodotorula* foi o único agente isolado em 60% dos pacientes, tendo o isolamento polimicrobiano ocorrido em apenas 28%.
- Todas as cepas avaliadas foram identificadas como *R. mucilaginosa*. Os sistemas comerciais testados (VITEK e API 20C AUX) podem não discriminar corretamente a espécie de *Rhodotorula*, sendo o segundo melhor que o primeiro. O teste de assimilação do nitrato é necessário para confirmar *R. glutinis*.
- Houve boa concordância entre os resultados das concentrações inibitórias mínimas obtidas nos testes de sensibilidade realizados de acordo com as recomendações do NCCLS e EUCAST.
- Anfotericina B exibiu boa atividade *in vitro* para todos os isolados.
- Entre os compostos azólicos, voriconazol e itraconazol exibiram atividade *in vitro* variável, contrastando com fluconazol, para o qual as concentrações inibitórias mínimas foram uniformemente elevadas (>64 µg/mL).

- A eletroforese em campo pulsado discriminou três perfis moleculares. Entretanto, revelou-se limitada para a caracterização genotípica de todas as cepas de *Rhodotorula*.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

Ahearn DG, Jannach JR, Roth FJ Jr. Speciation and densities of yeasts in human urine specimens. *Sabouraudia*. 1966; 5(2):110-9.

Ahmed A, Aggaewal M, Chiu R, Ramratnam B, Rinaldi R, Flanigan TP. A fatal case of *Rhodotorula meningitis* in AIDS. *Med Health R I*. 1998; 81(1): 22-3.

Alliot C, Desablens B, Garidi R, Tabuteau S. Opportunistic infection with *Rhodotorula* in cancer patients treated by chemotherapy: two case reports. *Clin Oncol-Uk*. 2000; 12:115-7.

Almirante B, Rodriguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, Mensa J, Sanchez F, Ayats J, Gimenez M, Saballs P, Fridkin SK, Morgan J, Rodriguez-Tudela JL, Warnock DW, Pahissa A; Barcelona Candidemia Project Study Group. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(4):1829-35.

Anaissie EJ, Bodey GP, Kantarjian H, Ro J, Vartivarian SE, Hopfer R, Hoy J, Rolston K. New spectrum of fungal infections in patients with cancer. *Rev Infect Dis*. 1989; 11:369-78.

Anaissie EJ, Mahfouz TH, Kiwan EN. Fungal Infection in the patients with cancer. In: Anaisse EJ, McGinnis MR, Pfaller MA, editores. *Clinical Microbiology*. Phyladelphia: Elsevier: 2003. p.397-406.

Anatoliotaki M, Mandatadakis E, Galanakis E, Samonis G. *Rhodotorula* species fungemia: a treat to the immunocompromised host. *Clin Lab*. 2003; 49(1-2):49-55.

Arvanitidou M, Kanellou K, Constantinides TC, Katsouyannopoulos V. The occurrence of fungi in hospital and community potable waters. *Lett Appl Microbiol*. 1999; 29(2): 81-4.

Barchiesi F, Arzeni D, Fothergill AW, Di Francesco LF, Caselli F, Rinaldi MG, Scalise G. *In vitro* activities of the new antifungal triazole SCH 56592 against common and emerging yeast pathogens. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44(1):226-9.

Bawazeer AM, Hodge WG. *Rhodotorula* infection in a corneal graft following penetrating keratoplasty. *Can J Ophtalmol*. 2003; 38(3): 225-7.

Beck-Sague C, Jarvis WR Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. *J Infect Dis*. 1993; 167(5):1247-51.

Biswas SK, Yokoyama K, Nishimura K, Miyaji M. Molecular phylogenetics of the genus *Rhodotorula* and related basidiomycetous yeasts inferred from the mitochondrial cytochrome b gene. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001;51(Pt 3):1191-9.

Blumberg HM, Jarvis WR, Soucie JM, Edwards JE, Patterson JE, Pfaller MA, Rangel-Frausto MS, Rinaldi MG, Saiman L, Wiblin RT, Wenzel RP; National Epidemiology of Mycoses Survey(NEMIS) Study Group. Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. The National Epidemiology of Mycosis Survey. *Clin Infect Dis*. 2001; 33(2):177-86.

Braun DK, Kauffman CA. *Rhodotorula* fungaemia: a life-threatening complication of indwelling central venous catheters. *Mycoses*. 1992; 35: 305-8.

Burt Rk, Derg HJ, Lothian ST, Santos GW, Camargo LF, Strabelli TM, Ribeiro FG, Iwahashi ER. On call in bone marrow transplantation. In: Chapman, RG. Texas: Landes Company; 1996.

Butinar L, Santos S, Spencer-Martins I, Oren A, Gunde-Cimerman N. Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiol Lett*. 2005; 244(2):229-34.

Calhoun DL, Roberts GD, Galgiani JN, Bennett JE, Feingold DS, Jorgensen J, Kobayashi GS, Shadomy S. Results of a survey of antifungal susceptibility tests in

the United States and interlaboratory comparison of broth dilution testing of flucytosine and amphotericin B. *J Clin Microbiol.* 1986; 23(2): 298-301.

Carratalà J. The antibiotic-lock technique for therapy of “highly needed” infected catheters. *Clin Microbiol Infect.* 2002; 8(5):282-9.

Centeno S, Machado S. Assessment of airborne mycoflora in critical areas of the Principal Hospital of Cumana, state of Sucre, Venezuela. *Inv Clin.* 2004; 45(2):137-44.

Chao TY, Kuo CC, Hseuh EJ, Yang KF, Wang CC. Diagnosis of fungemia in bone marrow transplantation patients by examination of peripheral blood smears. *Bone Marrow Transplant.* 1994; 14(4):647-9.

Chryssanthou, E. Trends in antifungal susceptibility among Swedish *Candida* species bloodstream isolates from 1994 to 1998: comparison of the E-test and the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with the NCCLS M27-A reference method. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:4181-83.

Colombo AI, Barchiesi F, McGough DA, Rinaldi MG. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. *J Clin Microbiol.* 1995; 33:535-540.

Colombo AI, Dantas LS, Abramczyk ML, Cyprinano M, Fischman O, Iazetti AV, Petrilli AS, Selijan MP. *Rhodotorula glutinis* fungemia: a case report and literature review. *Braz J Infect Dis.* 1997; 1(4):204-7.

Costa SF, Marinho EA, Araujo EAP, Manrique AEI, Medeiros EAS, Levin AS. Nosocomial fungaemia: a 2-year prospective study. *J Hosp Infect.* 2000; 45: 69-72.

Cuenca-Estrella M, Diaz-Guerra TM Mellado E, Rodriguez-Tudela JL. Influence of glucose supplementation and inoculum size on growth kinetics and antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(2):525-32.

Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Present status of the detection of antifungal resistance: the perspective from both sides of the ocean. *Clin Microbiol Infect.* 2001; 7 Suppl 2:46-53.

Cuenca-Estrella M, Lee-Yang W, Ciblak MA, Arthington-Skaggs BA, Mellado E, Warnock DW, Rodriguez-Tudela JL. Comparative evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST broth microdilution procedures for antifungal susceptibility testing of *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(11):3644-7.

Cuenca-Estrella M, Moore CB, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Denning DW, Donnelly JP, Dromer F, Dupont B, Rex JH, Richardson MD, Sancak B, Verweij PE, Rodriguez-Tudela JL; AFST Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Multicenter evaluation of the reproducibility of the proposed antifungal susceptibility testing method for fermentative yeasts of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST). *Clin Microbiol Infect.* 2003; 9(6):467-74.

Cutrona AF, Shah M, Himes MS, Miladore MA. *Rhodotorula minuta*: an unusual fungal infection in hip-joint prosthesis. *Am J Orthop*. 2002; 31(3):137-40.

de Azeredo LA, Gomes EA, Mendonca-Hagler LC, Hagler NA. Yeast communities associated with sugarcane in Campos, Rio de Janeiro, Brazil. *Int Microbiol*. 1998; 1(3):205-8.

de Barros MG; Queiroz LA; Cavalcanti MAQ. Fungos isolados do ar e do piso de ambientes fechados do Hospital Escola da Universidade Federal de Pernambuco, Recife. *Bol Micol*. 1990; 5(1/2):69-72.

de Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figuera MJ. *Atlas of clinical fungi*. 2nd edition. Centralbureau Voor Fchimmelcultures; 2000.

Diamond RD. The growing problem of mycoses in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Rev Infect Dis*. 1991;13(3):480-6.

Diekema DJ, Petroelje B, Messer SA, Hollis RJ, Pfaller MA. Activities of available and investigational antifungal agents against *Rhodotorula* species. *J Clin Microbiol*. 2005;43(1):476-8.

Donald FE, Sharp JF, Firth JL, Crowley JL, Ispahani P. *Rhodotorula rubra* ventriculitis. *J Infect*. 1988;16(2):187-91.

Edwards JE Jr, Lehrer RI, Stiehm ER, Fischer TJ, Young LS. Severe candidal infections: clinical perspective, immune defense mechanisms, and current concepts of therapy. *Ann Intern Med.* 1978; 89(1):91-106.

Eisemberg ES, Alpert BE, Weiss RA, Mittman N, Soeiro R. *Rhodotorula rubra* in patients undergoing continuous peritoneal dialysis. *Am J Med.* 1983; 75: 349-52.

Ekendahl S, O'Neill AH, Thomsson E, Pedersen K. Characterisation of yeasts isolated from deep igneous rock aquifers of the Fennoscandian Shield. *Microb Ecol.* 2003; 46(4):416-28.

Espinel-Ingroff A, Stockman L, Roberts G, Pincus D, Pollack J, Marler J. Comparison of RapID yeast plus system with API 20C system for identification of common, new, and emerging yeast pathogens. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(4):883-6.

Espinel-Ingroff, A. In vitro activities of the new triazole voriconazole (UK-109,496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens. *J Clin Microbiol.* 1998;36:198-202.

Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Messer SA, Knapp CC, Killian S, Norris HA, Ghannoum MA. Multicenter comparison of the sensitive YeastOne Colorimetric Antifungal Panel with the National Committee for Clinical Laboratory standards M27-A reference method for testing clinical isolates of common and emerging

Candida spp., *Cryptococcus* spp., and other yeasts and yeast-like organisms. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(3):591-5.

EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Method for determination of minimal inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. - Subcommittee of Antifungal Susceptibility Testing of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Discussion document E.* Dis. 7.1.2002.

Erer B, Galimberti M, Lucarelli G, Giardini C, Polchi P, Baronciani D, Gaziev D, Angelucci E, Izzi G. *Trichosporon beigelii*: a life-threatening pathogen in immunocompromised hosts. *Bone Marrow Transplant.* 2000; 25(7):745-9.

Fanci R, Pecile P, Martinez RL, Fabbri A, Nicoletti P. Amphotericin B treatment of fungemia due to unusual pathogens in neutropenic patients: report of two cases. *J Chemother.* 1997; 9(6):427-30.

Fell JW, Statzell-Tallman A. *Rhodotorula* F.C. Harrison. In: Kurtzman CP, Fell JW, editors: *The Yeasts, a taxonomic study*. New York: Elsevier; 2000. p. 800-27.

Fleming RV, Walsh TJ, Anaissie EJ. Emerging and less common fungal pathogens. *Infect Dis Clin North Am.* 2002; 16(4):915-33.

Freydiere AM, Guinet R, Boiron P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Med Mycol.* 2001; 39(1):9-33.

Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev.* 1996; 9(4):499-511.

Galan-Sanchez F, Garcia-Martos P, Rodriguez-Ramos C, Marin-Casanova P, Mira-Gutierrez J. Microbiological characteristics and susceptibility patterns of strains of *Rhodotorula* isolated from clinical specimens. *Mycopathologia* 1999; 145(3):109-12.

Galgiani JN, Reiser J, Brass C, Espinel-Ingroff A, Gordon MA, Kerkering TM. Comparison of relative susceptibilities of *Candida* species to three antifungal agents as determined by unstandardized methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987; 31(9):1343-7.

Garbino J, Kolarova L, Lew D, Hirschel B, Rohner P. Fungemia in HIV-infected patients: a 12-year study in a tertiary care hospital. *AIDS Patient Care STDS.* 2001; 15(8):407-10.

Garcia-Martos P, Garcia-Agudo L, Ruiz-Aragon J, Saldarreaga A, Marin P. Carbohydrate assimilation by clinical and environmental *Rhodotorula glutinis* strains. *Rev Iberoam Micol.* 2004; 21(2):90-2.

Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections. *Am J Infect Control*. 1988; 16 (3):128-40.

Girmenia C, Pagano L, Martino B, D'Antonio D, Fanci R, Specchia G, Melillo L, Buelli M, Pizzarelli G, Venditti M, Martino P; GIMEMA Infection Program. Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(4):1818-28.

Gogos CA, Kalfarentzos F. Total parenteral nutrition and immune system activity: a review. *Nutrition*. 1995; 11(4):339-44.

Goldani LZ, Craven DE, Sugar AM. Central venous catheter infection with *Rhodotorula minuta* in a patient with AIDS taking suppressive doses of fluconazole. *J Med Vet Mycol*. 1995; 33:267-70.

Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Susceptibility profile of 29 clinical isolates of *Rhodotorula* spp. and literature review. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 55(3):312-6.

Gordon SM, Avery RK. Aspergillosis in lung transplantation: incidence, risk factors, and prophylactic strategies. *Transpl Infect Dis*. 2001;3(3):161-7.

Greenberg D. *Opportunistig fungi in the immunocompromised patient* [monografia]. Pittsburgh: Division of Allergy, Immunology & Infectious Diseases, Children's Hospital of Pittsburgh, School of Medicine, University of Pittsburgh - EUA; 2001.

Groll AH, Walsh TJ. Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. *Clin Microbiol Infect.* 2001; 7:8-24.

Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S, Herwaldt L, Pfaller M, Diekema D. Attributable mortality of nosocomial candidemia revisited. *Clin Infect Dis.* 2003; 37(9):1172-7.

Gyaurgieva OH, Bogomolova TS, Gorshkova GI. Meningitis caused by *Rhodotorula rubra* in an HIV-infected patient. *J Me Vet Mycol.* 1996; 34:357-9.

Hagan ME, Klotz SA, Bartholomew W, Potter L, Nelson M. A pseudoepidemic of *Rhodotorula rubra*: a marker for microbial contamination of the bronchoscope. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1995; 16(12):727-8.

Hamal P, Kappe R, Rimek D. Rate of transmission and endogenous origin of *Candida albicans* and *Candida glabrata* on adult intensive care units studied by pulsed field gel electrophoresis. *J Hosp Infect* 2001; 49:37-42

Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 1995; 8(4):462-78.

Hennessey PJ, Black CT, Andrassy RJ. Nonenzymatic glycosylation of immunoglobulin G impairs complement fixation. *J Parenter Enteral Nutr.* 1991; 15(1):60-4.

Hoffmann KK, Weber DJ, Rutala WA. Pseudoepidemic of *Rhodotorula rubra* in patients undergoing fiberoptic bronchoscopy. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1989; 10(11):511-4.

Hsueh PR, Teng LJ, Ho SW, Luh KT. Catheter-related sepsis due to *Rhodotorula glutinis*. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:857-9.

Jennings AE, Bennett JE. The isolation of red yeast-like fungi in a diagnostic laboratory. *J Med Microbiology.* 1972; 5:391-4.

Khatib R, Riederer KM, Ramanathan J, Baran J Jr. Faecal fungal flora in healthy volunteers and inpatients. *Mycoses.* 2001; 44(5):151-6.

Kiehn TE, Gorey E, Brown AE, Edwards FF, Armstrong D. Sepsis due to *Rhodotorula* related to use of indwelling central venous catheters. *Clin Infect Dis.* 1992; 14:841-6.

Kiraz N, Gulbas Z, Akgun Y. Case report. *Rhodotorula rubra* fungaemia due to use of indwelling venous catheters. *Mycoses* 2000; 43(5):209-10.

Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med.* 1985; 13(10):818-29.

Kontoyiannis DP, Vaziri I, Hanna HA, Boktour M, Thornby J, Hachem R, Bodey GP, Raad II. Risk factors for *Candida tropicalis* fungemia in patients with cancer. *Clin Infect Dis.* 2001; 33(10):1676-81.

Kontayanis DP, Bodey GP. Invasive aspergilosis in 2002: an update. *Eur J Clin Micorbiol Infect Dis.* 2002; 21(3):161-72.

Kontoyiannis DP, Torres HA, Chargua M, Hachem R, Tannand JJ, Bodey GP, Raad II. Trichosporinosis in a tertiary care cancer center: risk factor, changing spectrum and determinants of outcome. *Scand J Inf Dis.* 2004; 56(8):564-9.

Kovacicova G, Spanik S, Kunova A, Trupl J, Sabo A, Koren P, Sulcova M, Mateicka F, Novotny J, Pichnova E, Jurga L, Chmelik B, Obertik T, West D, Krcery V Jr. Prospective study of fungaemia in a single cancer institution over a 10-y period: aetiology, risk factors, consumption of antifungals and outcome in 140 patients. *Scand J Infect Dis.* 2001;33(5):367-74.

Krcmery V Jr, Oravcova E, Spanik S, Mrazova-Studena M, Trupl J, Kunova A, Stopkova-Grey K, Kukuckova E, Krupova I, Demitrovicova A, Kralovicova K. Nosocomial breakthrough fungaemia during antifungal prophylaxis or empirical antifungal therapy in 41 cancer patients receiving antineoplastic chemotherapy:

analysis of aetiology risk factors and outcome. *J Antimicrob Chemother.* 1998; 41(3):373-80.

Krcmery V, Krupova I, Denning DW. Invasive yeast infections other than *Candida* spp. in acute leukaemia. *J Hosp Infect.* 1999; 41(3):181-94.

Krzywda EA, Andris DA, Edmiston CE Jr, Quebbeman EJ. Treatment of Hickman catheter sepsis using antibiotic lock technique. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1995; 16(10):596-8.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Infections due to *Trichosporon* and miscellaneous fungi. In: Kwon-Chung KJ, Bennett JE, eds. *Medical mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1992. p.768-82.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. *Tratado de micologia médica Lacaz*. 9^a ed. São Paulo: Sarvier; 2002.

Leibovitz E, Rigaud M, Chandwani S, Kaul A, Greco MA, Pollack H, Lawrence R, Di John D, Hanna B, Krasinski K. Disseminated fungal infections in children infected with human immunodeficiency virus. *Pediatr Infect Dis J.* 1991; 10(12): 888-94.

Libkind D, Brizzio S, van Broock M. *Rhodotorula mucilaginosa*, a carotenoid producing yeast strain from a Patagonian high-altitude lake. *Folia Microbiol (Praha)*. 2004; 49(1):19-25.

Lo Re V, Fishman NO, Nachamkin I. Recurrent catheter-related *Rhodotorula rubra* infection. *Clin Microbiol Infect*. 2003; 9(8):897-900.

Louria DB, Geemberg SM, Molander DW. Fungemia caused by certain nonpathogenic strains of the *Cryptococcaceae* family. *N Engl J Med*. 1960; 263:1281-4.

Louria DB, Blevins A, Armstrong D, Burdich R, Liberman P. Fungemia caused by “nonpathogenic “ yeasts. *Arch Intern Med*. 1967; 119:247-52.

Lui AY, Turett GS, Karter DL, Bellman PC, Kislak JW. Amphotericin B lipid complex therapy in an AIDS patient with *Rhodotorula rubra* fungemia. *Clin Infect Dis*. 1998; 27:892-893.

MacDonald L, Baker C, Chenoweth C. Risk factors for candidemia in a children's hospital. *Clin Infect Dis*. 1998; 26(3):642-5.

Maeder M, Vogt PR, Shaer G, von Graevenitz A, Gunthard HF. Aortic homograft endocarditis caused by *Rhodotorula mucilaginosa*. *Infection*. 2003; 31(3):181-3.

Marinova I, Szabadosova V, Brandeburova O, Krcmery V Jr. *Rhodotorula* spp. fungemia in an immunocompromised boy after neurosurgery successfully treated with miconazole and 5-flucytosine: case report and review of the literature. *Chemotherapy*. 1994; 40(4):287-9.

Marr KA, Rustad TR, Rex JH, White TC. The trailing end point phenotype in antifungal susceptibility testing is pH dependent. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43(6):1383-6.

Marr KA, Carter RA, Boeckh M, Martin P, Corey L. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood*. 2002; 100(13):4358-66.

McGinnis MR, Nunn GB. Sequence-based fungal identification and classification. In: Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, Tang YW, Unger ER, Relman DA, White TJ, editors. *Molecular microbiology – diagnostic, principles and practice*. Washington: ASM Press; 2004.

McGinnis MR, Pasarell L. *In vitro* testing of susceptibilities of filamentous ascomycetes to voriconazole, itraconazole, and amphotericin B, with consideration of phylogenetic implications. *J Clin Microbiol*. 1998; 36(8):2353-5.

Mellado E, Cuenca-Estrella M, Regadera J, Gonzalez M, Diaz-Guerra TM, Rodriguez-Tudela JL. Sustained gastrointestinal colonization and systemic

dissemination by *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis* in adult mice. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000; 8(1):21-8.

Mermel LA, Farr BM, Sherertz RJ, Raad II, O'Grady N, Harris JS, Craven DE; Infectious Diseases Society of America; American College of Critical Care Medicine; Society for Healthcare Epidemiology of America. Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections. *Clin Infect Dis*. 2001; 32(9):1249-72.

Minari A, Hachem R, Raad I. *Candida lusitanae*: a cause of breakthrough fungemia in cancer patients. *Clin Infect Dis*. 2001; 32(2):186-90.

Mok WY, Luizao RC, do Socorro Barreto da Silva M, Teixeira MF, Muniz EG. Ecology of pathogenic yeasts in Amazonian soil. *Appl Environ Microbiol*. 1984; 47(2):390-4.

Morace G, Amato G, Bistoni F, Fadda G, Marone P, Montagna MT, Oliveri S, Polonelli L, Rigoli R, Mancuso I, La Face S, Masucci L, Romano L, Napoli C, Tato D, Buscema MG, Belli CM, Piccirillo MM, Conti S, Covan S, Fanti F, Cavanna C, D'Alo F, Pitzurra L. Multicenter comparative evaluation of six commercial systems and the National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A broth microdilution method for fluconazole susceptibility testing of *Candida* species. *J Clin Microbiol*. 2002; 40:2953-58.

Moretti-Branchini ML, Fukushima K, Schreiber AZ, Nishimura K, Papaiordanou PM, Trabasso P, Tanaka R, Miyaji M. *Trichosporon* species infection in bone marrow transplanted patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2001;39(3):161-4.

Morrison VA, Haake RJ, Weinsdorf DJ. The spectrum of non-*Candida* fungal infections following bone marrow-transplantation. *Medicine*. 1993; 72:78-89.

Morrison VA, Haake RJ & Weisdorf DJ Non-*Candida* fungal infections after bone marrow transplantation: risk factors and outcome. *American Journal of Medicine*. 1994; 96: 497-503.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratories Standards, USA. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts - M 27-A. 1997.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratories Standards, USA. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts - M 27-A2. 2002.

Nolla-Salas J, Sitges-Serra A, Leon-Gil C, Martinez-Gonzalez J, Leon-Regidor MA, Ibanez-Lucia P, Torres-Rodriguez JM. Candidemia in non-neutropenic critically ill patients: analysis of prognostic factors and assessment of systemic antifungal therapy. Study Group of Fungal Infection in the ICU. *Intensive Care Med*. 1997; 23(1):23-30.

Nowakowska D, Kurnatowska A, Stray-Pedersen B, Wilczynski J. Species distribution and influence of glycemic control on fungal infections in pregnant women with diabetes. *J Infect.* 2004; 48:339-46.

Nucci M, Pulcheri W, Spector N, Bueno AP, Bacha PC, Caiuby MJ, Derossi A, Costa R, Morais JC, de Oliveira HP. Fungal infections in neutropenic patients: a 8-year prospective study. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1995; 37(5):397-406.

Oyeka CA, Ugwu LO. Fungal flora of human toe webs. *Mycoses.* 2002; 45(11-12):488-91.

Pagnocca FG, Mendonca-Hagler LC, Hagler AN. Yeasts associated with the white shrimp *Penaeus schmitti*, sediment, and water of Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, Brasil. *Yeast.* 1989; 5 Spec No: S479-83.

Pappas PG, Rex JH, Sobel JD, Filler SG, Dismukes WE, Walsh TJ, Edwards JE; Infectious Diseases Society of America. Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin Infect Dis.* 2004; 38(2):161-89.

Pappas PG, Morgan J, Hajjeh RA, Transplant Surveillance Network (Transnet). In: 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC); 2003 September 14 – 17; Chicago, IL. **Abstracts.** p.458, NRM1010.

Pasqualotto GC, Copetti FA, Meneses CF, Leal Machado AR, Brunetto AL. Infection by *Rhodotorula* sp. in children receiving treatment for malignant diseases. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2005; 27(4):232-3.

Patel R, Paya CV. Infections in solid-organ transplant recipients. *Clin Microbiol Rev*. 1997; 10(1):86-124.

Pavlova K, Grigorova D, Hristozova T, Angelov A. Yeast strains from Livingston Island, Antarctica. *Folia Microbiol (Praha)*. 2001; 46(5):397-401.

Pegues D, Axelrod P, McClarren C, Eisenberg BL, Hoffman JP, Ottery FD, Keidan RD, Boraas M, Weese J. Comparison of infections in Hickman and implanted port catheters in adult solid tumor patients. *J Surg Oncol*. 1992; 49(3):156-62.

Perfect J, Schell WA The new fungal opportunists are coming. *Clin Infect Dis*. 1996; 22 Suppl 2:S112-8.

Petrocheilou-Paschou V, Prifti H, Kostis E, Papadimitriou C, Dimopoulos MA, Stamatelopoulos S. *Rhodotorula* septicemia: case report and minireview. *Clin Microbiol Infect*. 2001;7:100-102.

Pfaller MA Epidemiology of nosocomial candidiasis: the importance of molecular typing. *Braz J Infect Dis*. 2000;4(4):161-7.

Pfaller MA, Rex JH, Rinaldi MG. Antifungal susceptibility testing: technical advances and potential clinical applications. *Clin Infect Dis*. 1997; 24(5):776-84.

Pfaller MA, Wenzel RP. The epidemiology of fungal infections. In: Anaisse EJ, McGinnis MR, Pfaller MA, editores. *Clinical Microbiology*. Phyladelphia: Elsevier: 2003. p.3-19.

Pfaller MA, Diekema DJ. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(10):4419-31.

Pien FD, Thompson RL, Deye D, Roberts GD. *Rhodotorula* septicemia: two cases and a review of the literature. *Mayo Clin Proc*. 1980; 55(4):258-60.

Preney L, Theraud M, Guiguen C, Gangneux JP. Experimental evaluation of antifungal and antiseptic agents against *Rhodotorula* spp. *Mycoses*. 2003; 46(11-12):492-5.

Prystowsky SD, Vogelstein B, Ettinger DS, Merz WG, Kaizer H, Sulica VI, Zinkham WH. Invasive aspergillosis. *N Engl J Med*. 1976; 295(12):655-8.

Pulimood S, Ganesan L, Alangaden G. Polymicrobial candidemia. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002; 44:353-7.

Puzniak L, Teutsch S, Powderly W, Polish L. Has the epidemiology of nosocomial candidemia changed? *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2004; 25(8):628-33.

Raad I, Hanna H, Boktour M, Girgawy E, Danawi H, Mardani M, Kontoyiannis D, Darouiche R, Hachem R, Bodey GP. Management of central venous catheters in patients with cancer and candidemia. *Clin Infect Dis.* 2004; 38(8):1119-27.

Revankar SG, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Fothergill AW, Redding SW, Rinaldi MG, Patterson TF. Interpretation of trailing endpoints in antifungal susceptibility testing by the National Committee for Clinical Laboratory Standards method. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(1):153-6.

Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Bartlett MS, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Lancaster M, Odds FC, Rinaldi MG, Walsh TJ, Barry AL. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and candida infections. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Clin Infect Dis.* 1997; 24(2):235-47.

Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Gosey LL, Odds FC, Rinaldi MG, Sheehan DJ, Warnock DW. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14:643-58.

Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD, Filler SG, Pappas PG, Dismukes WE, Edwards JE. Practice guidelines for the treatment of candidiasis. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2000; 30(4):662-78.

Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Diaz-Guerra TM, Mellado E. Standardization of antifungal susceptibility variables for a semiautomated methodology. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(7):2513-7.

Roilides E, Farmaki E, Evdoridou J, Francesconi A, Kasai M, Filoti J, Tsivitanidou M, Sofianou D, Kremenopoulos G, Walsh TJ. *Candida tropicalis* in a neonatal intensive care unit: epidemiologic and molecular analysis of an outbreak of infection with an uncommon neonatal pathogen. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(2):735-41.

Rose HD, Kurup VP. Colonization of hospitalized patients with yeast-like organisms. *Sabouraudia*. 1977; 15(3):251-6.

Safdar N, Fine JP, Maki DG. Meta-analysis: methods for diagnosing intravascular device-related bloodstream infection. *Ann Intern Med*. 2005; 142(6):451-66.

Saiman L, Ludington E, Dawson JD, Patterson JE, Rangel-Frausto S, Wiblin RT, Blumberg HM, Pfaller M, Rinaldi M, Edwards JE, Wenzel RP, Jarvis W; National Epidemiology of Mycoses Study Group. Risk factors for *Candida* species

colonization of neonatal intensive care unit patients. *Pediatr Infect Dis J.* 2001; 20(12):1119-24.

Samonis G, Anatoliotaki M, Apostolakou H, Maraki S, Mavroudis S, Goergoulas V. Transient fungemia due to *Rhodotorula rubra* in a cancer patient: case report and review of the literature. *Infection.* 2001; 29:173-76.

Sandovsky-Losica H, Barr-Nea L, Segal E. Fatal systemic candidiasis of gastrointestinal origin: an experimental model in mice compromised by anti-cancer treatment. *J Med Vet Mycol.* 1992;30(3):219-31.

Saracli MA, Sener K, Gonlum A, Yildiran ST, Wickes BL. Genotyping of clinical *Rhodotorula mucilaginosa* isolates by pulsed field gel electrophoresis. *Mycoses.* 2003; 46(11-12):487-91.

Schell WA. New aspects of emerging fungal pathogens. A multifaceted challenge. *Clin Lab Med.* 1995; 15(2):365-87.

Serena C, Pastor FJ, Ortoneda M, Capilla J, Nolard N, Guarro J. *In vitro* antifungal susceptibilities of uncommon basidiomycetous yeasts. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(7):2724-6.

Sheu MJ, Wang CC, Wang CC, Shi WJ, Chu ML. *Rhodotorula* septicemia: report of a case. *J Formos Med Assoc.* 1994; 93(7):645-7.

Siegman-Igra Y, Anglim AM, Shapiro DE, Adal KA, Strain BA, Farr BM. Diagnosis of vascular catheter-related bloodstream infection: a meta-analysis. *J Clin Microbiol.* 1997; 35(4):928-36.

Silva V, Zepeda G, Rybak ME, Febre N. Yeast carriage on the hands of Medicine students. *Rev Iberoam Micol.* 2003; 20(2):41-5.

Soll DR. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13(2): 332-70.

Takahashi K, Kita E, Konishi M, Yoshimoto E, Mikasa K, Narita N, Kimura H. Translocation model of *Candida albicans* in DBA-2/J mice with protein calorie malnutrition mimics hematogenous candidiasis in humans. *Microb Pathog.* 2003; 35(5):179-87.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpretation chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995; 33(9):2233-9.

Trick WE, Fridkin SK, Edwards JR, Hajjeh RA, Gaynes RP; National Nosocomial Infections Surveillance System Hospitals. Secular trend of hospital-acquired

candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clin Infect Dis.* 2002;35(5):627-30.

Trindade RC, Resende MA, Silva CM, Rosa CA. Yeasts associated with fresh and frozen pulps of Brazilian tropical fruits. *Syst Appl Microbiol.* 2002; 25(2):294-300.

Vartivarian SE, Anaissie EJ, Bodey GP. Emerging fungal pathogens in immunocompromised patients: classification, diagnosis, and management. *Clin Infect Dis.* 1993; 17 Suppl 2:S487-91.

Verweij PE, Breuker IM, Rijs AJ, Meis JF. Comparative study of seven commercial yeast identification systems. *J Clin Pathol.* 1999; 52(4):271-3.

Viot M. Intravenous access: related problems in oncology. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 16(2):165-8.

Wadlin JK, Hanko G, Stewart R, Pape J, Nachamkin I. Comparison of three commercial systems for identification of yeasts commonly isolated in the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(6):1967-70.

Walsh TJ, Rex JH. All catheter-related candidemia is not the same: assessment of the balance between the risks and benefits of removal of vascular catheters. *Clin Infect Dis.* 2002; 34:600-2.

Walsh TJ, Groll A, Hiemenz J, Fleming R, Roilides E, Anaissie E. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clin Microbiol Infect.* 2004; 10 Suppl 1:48-66.

Warren NG, Hazen KC. *Candida*, *Cryptococcus* and other yeasts of medical importance. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. EUA: ASM Press;1999. p.1184-99.

Wenzel RP. Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality. *Clin Infect Dis.* 1995; 20(6):1531-4.

Whitlock WL, Dietrich RA, Steimke EH, Tenholder MF. *Rhodotorula rubra* contamination in fiberoptic bronchoscopy. *Chest.* 1992; 102(5):1516-9.

Wickerham L J, Burton K A. Carbon assimilation tests for the classification of yeasts. *J Bacteriol.* 1948; 56:363-71.

Wickes BL, Moore TDE, Kwon-Chung KJ. Comparison of the electrophoretic karyotypes and chromosomal location of ten genes in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology.* 1994; 140:543-50.

Winston DJ, Balsley GE, Rhodes J, Linne SR. Disseminated *Trichosporon capitatum* infection in an immunosuppressed host. *Arch Intern Med.* 1977; 137(9):1192-5.

Winston DJ, Gale RP, Meyer DV, Young LS. Infectious complications of human bone marrow transplantation. *Medicine (Baltimore)*. 1979; 58(1):1-31.

Wong SS, Woo PC, Yuen KY. *Candida tropicalis* and *Penicillium marneffeii* mixed fungaemia in a patient with Waldenstrom's macroglobulinaemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2001; 20(2):132-5.

Yera H, Poulain D, Lefebvre A, Camus D, Sendid B. Polymicrobial candidaemia revealed by peripheral blood smear and chromogenic medium. *J Clin Pathol*. 2004; 57(2):196-8.

Yip C, Rotstein C. Hickman catheter-related infections in patients with cancer. *Int J Antimicrob Agents* 1998; 10(3):181-9.

Zaas AK, Boyce M, Schell W, Lodge BA, Miller JL, Perfect JR. Risk of fungemia due to *Rhodotorula* and antifungal susceptibility testing of *Rhodotorula* isolates. *J Clin Microbiol*. 2003; 41:5233-3

APÊNDICE

APÊNDICE 1 – Ficha clínica.

*Caracterização de pacientes com fungemia por *Rhodotorula* spp.*

Ficha clínica N^o: _____

Registro: _____

Nome: _____

Instituto: _____

1^a) Dados Clínicos

1) **Idade:** ____ anos

Data do nascimento: ____/____/____

Data da internação: ____/____/____

2) **Sexo:** masc. () fem. () ignorado ()

3) **Raça:** branco () pardo () negro () ignorado ()

4) Unidade de Internação (à admissão)

() Clínica: _____ Data de entrada: ____/____/____ Data de saída: ____/____/____

() UTI: _____ Data de entrada: ____/____/____ Data de saída: ____/____/____

() PS: _____ Data de entrada: ____/____/____ Data de saída: ____/____/____

() ATMO: _____ Data de entrada: ____/____/____ Data de saída: ____/____/____

() AQTDH: _____ Data de entrada: ____/____/____ Data de saída: ____/____/____

5) Tempo de internação até a 1^a hemocultura positiva (*Rhodotorula*):

Data da 1^a hemocult. positiva p/ *Rhodotorula*.: ____/____/____

Infecção sistêmica: febre ou hipotermia: S() N()

data de início: ____/____/____

temp. axilar máx.: _____, ____°C

6) **Transferência de outro hospital:** S() N() **Data:** __/__/__

Doença de base: S() N()

Qual:

- Doença cardiovascular - Hipertensão arterial sistêmica ()
Insuficiência coronariana ()
Insuficiência cardíaca congestiva ()
Arritmia cardíaca ()
- Neoplasia hematológica ()
- Neoplasia sólida ()
- Transplantado medula óssea () Data: __/__/__
- Transplantado de órgão sólido () Data: __/__/__
- Queimado ()
- Doença cerebrovascular ()
- Síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) ()
- Politraumatismo (politrauma, traumatismo crânio encefálico) ()
- Hepatopatia ()
- Outros () Qual: _____

7) **Comorbidades:** S() N()

Qual:

- Hipertensão arterial sistêmica ()
- Diabetes Mellitus ()
- Outros () Qual: _____

2ª) Evolução

9) **Cirurgia** (durante internação): S() N()

Qual:

- Hipertensão arterial sistêmica ()
- Cirurgia de grande porte -
 - Cirurgia abdominal ()
 - Cirurgia torácica ()
 - Cirurgia neurológica ()
 - Cirurgia ortopédica ()
 - Cirurgia ginecológica ()
- Cirurgia laparoscópica ()
- Procedimento cirúrgico
 - Biópsia ()
 - Dissecção venosa ()
 - Drenagem de pericárdio ()
 - Drenagem de tórax ()
 - Paracentese ()
 - Traqueostomia ()
- Outros () Qual: _____

10) **Diarréia**: S() N()

INÍCIO

FIM

10.1) ___/___/___ ___/___/___

10.2) ___/___/___ ___/___/___

11) **Hemodiálise**: S() N()

DATA

11.1) ___/___/___

11.2) ___/___/___

11.3) ___/___/___

12) **Sonda nasogástrica:** S() N()

	<u>INÍCIO</u>	<u>FIM</u>
12.1)	__/__/__	__/__/__
12.2)	__/__/__	__/__/__
12.3)	__/__/__	__/__/__

13) **Ventilação mecânica invasiva:** S() N()

	<u>INÍCIO</u>	<u>FIM</u>
13.1)	__/__/__	__/__/__
13.2)	__/__/__	__/__/__
13.3)	__/__/__	__/__/__

14) **Dispositivos intravasculares:** S() N()

	<u>Tipo</u>	<u>DATA INSERÇÃO</u>	<u>DATA RETIRADA</u>
14.1)	_____	__/__/__	__/__/__
14.2)	_____	__/__/__	__/__/__
14.3)	_____	__/__/__	__/__/__

(cateter venoso central/ cateter de Hickman/ cateter de Swan-Ganz/ cateter de pressão arterial média/ cateter de hemodiálise/ porto-cath)

15) **Sonda vesical de demora:** S() N()

	<u>INÍCIO</u>	<u>FIM</u>
15.1)	__/__/__	__/__/__
15.2)	__/__/__	__/__/__

3ª) Prescrição

16) **Nutrição parenteral total:** S() N()

	<u>INÍCIO</u>	<u>FIM</u>
16.1)	__/__/__	__/__/__
16.2)	__/__/__	__/__/__

17) **Corticoterapia:** S() N()

	<u>Qual/dose</u>	<u>INÍCIO</u>	<u>FIM</u>
17.1)	_____	__/__/__	__/__/__
17.2)	_____	__/__/__	__/__/__
17.3)	_____	__/__/__	__/__/__

18) **Outro Imunossupressor:** S() N()

	<u>Nome/dose</u>	<u>INÍCIO</u>	<u>FIM</u>
18.1)	_____	__/__/__	__/__/__
18.2)	_____	__/__/__	__/__/__
18.3)	_____	__/__/__	__/__/__

19) **Quimioterápico:** S() N()

	<u>Nome/dose</u>	<u>INÍCIO</u>	<u>FIM</u>
19.1)	_____	__/__/__	__/__/__
19.2)	_____	__/__/__	__/__/__
19.3)	_____	__/__/__	__/__/__
19.4)	_____	__/__/__	__/__/__

20) **Terapia antimicrobiana parenteral (IV):** S() N()

	<u>Droga</u>	<u>INÍCIO</u>	<u>FIM</u>	<u>Dose diária</u>
20.1)	_____	__/__/__	__/__/__	_____
20.2)	_____	__/__/__	__/__/__	_____
20.3)	_____	__/__/__	__/__/__	_____
20.4)	_____	__/__/__	__/__/__	_____
20.5)	_____	__/__/__	__/__/__	_____

21) Terapia antimicrobiana enteral: S() N()

	<u>Droga</u>	<u>INÍCIO</u>	<u>FIM</u>	<u>Dose</u>
21.1)	_____	__/__/__	__/__/__	_____
21.2)	_____	__/__/__	__/__/__	_____
21.3)	_____	__/__/__	__/__/__	_____
21.4)	_____	__/__/__	__/__/__	_____
21.5)	_____	__/__/__	__/__/__	_____
21.6)	_____	__/__/__	__/__/__	_____

22) Terapia antifúngica parenteral (IV): S() N()

- (a) Anfotericina B (b) Fluconazol (c) ABLC (d) ABCD
(e) Ambisome

	<u>Droga/CÓD.</u>	<u>INÍCIO</u>	<u>FIM</u>	<u>Dose</u>
22.1)	_____	__/__/__	__/__/__	_____
22.2)	_____	__/__/__	__/__/__	_____
22.3)	_____	__/__/__	__/__/__	_____
22.4)	_____	__/__/__	__/__/__	_____

23) Terapia antifúngica enteral: S() N()

- (a) Fluconazol (b) Itraconazol (c) Cetoconazol

	<u>Droga/CÓD.</u>	<u>INÍCIO</u>	<u>FIM</u>	<u>Dose</u>
23.1)	_____	__/__/__	__/__/__	_____
23.2)	_____	__/__/__	__/__/__	_____
23.3)	_____	__/__/__	__/__/__	_____

4ª) Laboratório

24) Apache II

No momento da primeira hemocultura positiva: _____

25) Neutropenia: S() N()

	<u>INÍCIO</u>	<u>FIM</u>
≤500 neutrófilos/mm ³ : ()	__/__/__	__/__/__
≤100 neutrófilos/mm ³ : ()	__/__/__	__/__/__

26) Outra hemocultura positiva para *Rhodotorula* sp: S() N()

DATA

26.1) __/__/__

26.2) __/__/__

26.3) __/__/__

26.4) __/__/__

27) Cateter venoso central com cultura positiva para *Rhodotorula* sp:

S() N() DATA: __/__/__

28) Outros sítios com cultura positiva para *Rhodotorula*: S() N()

(que não seja nem sangue nem CVC)

Sítio

DATA

28.1) _____ __/__/__

28.2) _____ __/__/__

28.3) _____ __/__/__

29) Hemocultura positiva para *outras leveduras* S() N()

Espécie

DATA

29.1) _____ __/__/__

29.2) _____ __/__/__

29.3) _____ __/__/__

30) **Outros sítios com cultura positiva para *outras leveduras*: S() N()**

	<u>Sítio</u>	<u>Espécie</u>	<u>DATA</u>
30.1)	_____	_____	__/__/__
30.2)	_____	_____	__/__/__
30.3)	_____	_____	__/__/__

31) **Hemocultura positiva para bactérias: S() N()**

	<u>Espécie</u>	<u>DATA</u>
31.1)	_____	__/__/__
31.2)	_____	__/__/__
31.3)	_____	__/__/__
31.4)	_____	__/__/__

32) **Outros sítios com cultura positiva para bactérias S() N()**

	<u>Sítio</u>	<u>Espécie</u>	<u>DATA</u>
32.1)	_____	_____	__/__/__
32.2)	_____	_____	__/__/__
32.3)	_____	_____	__/__/__
32.4)	_____	_____	__/__/__

Dados coletados após hemocultura positiva para *Rhodotorula*

33) **Desfecho:**

Alta () Óbito () Data: __/__/__

34) **Se óbito:**

Diagnóstico: 1- _____
2- _____

35) Dados de Necropsia:

36) Após hemocultura positiva, houve retirada do cateter central?

Sim () Data: __/__/__
Não () Não se aplica ()

37) Após hemocultura positiva, houve instituição de terapêutica antifúngica?

Sim () Não ()

Já estava tomando: ()

Modificação: S() Droga/dose: _____ N()

- (a) Anfotericina B (b) Fluconazol (c) ABLC (d) ABCD
(e) Ambisome

	<u>Droga/CÓD.</u>	<u>INÍCIO</u>	<u>FIM</u>	<u>Dose</u>
37.1)	_____	__/__/__	__/__/__	_____
37.2)	_____	__/__/__	__/__/__	_____
37.3)	_____	__/__/__	__/__/__	_____

38) Terapia antifúngica enteral: S() N()

- (a) Fluconazol (b) Itraconazol (c) Cetoconazol

	<u>Droga/CÓD.</u>	<u>INÍCIO</u>	<u>FIM</u>	<u>Dose</u>
38.1)	_____	__/__/__	__/__/__	_____
38.2)	_____	__/__/__	__/__/__	_____
38.3)	_____	__/__/__	__/__/__	_____

39) **Outros sítios com cultura positiva para *Rhodotorula*:** S() N()
(que não seja nem sangue nem CVC)

	<u>Sítio</u>	<u>DATA</u>
39.1)	_____	__/__/__
39.2)	_____	__/__/__
39.3)	_____	__/__/__

40) **Outra hemocultura positiva para *outras leveduras*:** S() N()

	<u>Espécie</u>	<u>DATA</u>
40.1)	_____	__/__/__
40.2)	_____	__/__/__
40.3)	_____	__/__/__

41) **Outros sítios com cultura positiva para *outras leveduras*:** S() N()
(que não seja nem sangue nem CVC)

	<u>Sítio</u>	<u>Espécie</u>	<u>DATA</u>
41.1)	_____	_____	__/__/__
41.2)	_____	_____	__/__/__
41.3)	_____	_____	__/__/__

42) **Outra hemocultura positiva para bactérias:** S() N()

	<u>Espécie</u>	<u>DATA</u>
42.1)	_____	__/__/__
42.2)	_____	__/__/__
42.3)	_____	__/__/__

43) **Outros sítios com cultura positiva para bactérias:** S() N()
(que não seja nem sangue nem CVC)

	<u>Sítio</u>	<u>Espécie</u>	<u>DATA</u>
43.1)	_____	_____	__/__/__
43.2)	_____	_____	__/__/__
43.3)	_____	_____	__/__/__

44) **Terapia antimicrobiana parenteral (IV):** S() N()

	<u>Droga</u>	<u>INÍCIO</u>	<u>FIM</u>	<u>Dose diária</u>
44.1)	_____	__/__/__	__/__/__	_____
44.2)	_____	__/__/__	__/__/__	_____
44.3)	_____	__/__/__	__/__/__	_____

45) **Terapia antimicrobiana enteral:** S() N()

	<u>Droga</u>	<u>INÍCIO</u>	<u>FIM</u>	<u>Dose</u>
45.1)	_____	__/__/__	__/__/__	_____
45.2)	_____	__/__/__	__/__/__	_____
45.3)	_____	__/__/__	__/__/__	_____

46) **Outros diagnósticos:** S() N()

	<u>Qual</u>	<u>DATA</u>
46.1)	_____	__/__/__
46.2)	_____	__/__/__

47) **ICS:** S() N()

APÊNDICE 2 – Resultados das concentrações inibitórias mínimas de 20 cepas de *R. mucilaginosa* isoladas de hemocultura de acordo com NCCLS e EUCAST – HC-FMUSP - janeiro de 1996 a dezembro de 2004

Cepa	Anfotericina B µg/mL		Fluconazol µg/mL		Itraconazol µg/mL		Voriconazol µg/mL	
	EUCAST	NCCLS	EUCAST	NCCLS	EUCAST	NCCLS	EUCAST	NCCLS
1	0,5	0,5	> 64	> 64	1	2	4	4
2	0,5	0,5	> 64	> 64	0,25	0,5	1	2
3	1	0,5	> 64	> 64	0,12	1	0,5	0,5
4	0,5	0,5	> 64	> 64	0,25	0,12	0,25	0,25
5	0,5	0,5	> 64	> 64	0,12	0,25	0,06	0,06
6	1	0,5	> 64	> 64	0,5	1	4	4
8	0,5	0,5	> 64	> 64	0,25	0,25	0,12	1
9	0,5	0,5	> 64	> 64	1	2	4	2
10	0,5	0,5	> 64	> 64	0,12	0,25	1	1
11	0,5	0,5	> 64	> 64	0,06	0,5	0,5	0,06
13	0,5	1	> 64	> 64	0,03	0,06	0,06	0,06
16	0,5	0,25	> 64	> 64	0,12	0,5	0,25	0,12
17	0,5	0,5	> 64	> 64	4	>8	0,25	0,5
18	1	0,5	> 64	> 64	0,5	1	2	4
19	1	0,5	> 64	> 64	1	0,5	2	1
20	1	0,5	> 64	> 64	0,25	1	0,5	0,5
21	0,5	0,5	> 64	> 64	0,03	0,03	1	1
22	0,25	0,25	> 64	> 64	1	0,5	1	1
23	0,5	0,5	> 64	> 64	0,12	0,25	0,25	1
24	0,5	0,5	> 64	> 64	0,06	0,5	0,25	0,25

NOTA: Para anfotericina B foi considerada a concentração inibitória mínima que inibiu 90% do crescimento e para as demais drogas foi considerada a concentração inibitória mínima que inibiu 50% do crescimento; **EUCAST** *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing*; **NCCLS** *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

APÊNDICE 3 - Protocolo modificado para cariotipagem eletroforética de levedura por eletroforese em campo pulsado (Saracli et al., 2003)

1. Crescer a levedura em placa de Ágar Sabouraud a 30°C por 48 horas
2. Inocular uma alçada da levedura em 25 mL de caldo YEPD (extrato de levedura 1%, peptona 1%, dextrose 2%) por 18 a 20 horas a 30°C, sob agitação a 150rpm
3. Centrifugar as células por 10 minutos a 4000 rpm
4. Desprezar o sobrenadante dos tubos centrifugados e adicionar 1 mL de solução fisiológica (cloreto de sódio a 0,9%) estéril ao sedimento de células
5. Ressuspender as leveduras com auxílio de agitador (vortexar) e, em seguida, centrifugar por 10 minutos a 3000 rpm
6. Repetir o mesmo procedimento descrito nos itens 4 e 5 por mais três vezes
7. Adicionar ao sedimento 7mL de tampão de lavagem (TL)
8. Retirar 2mL e medir, em espectrofotômetro, a densidade óptica (D.O.) a 620nm (Observação: as densidades medidas devem estar acima de 2,3 para obter uma quantidade de DNA suficiente para extração)
9. Centrifugar os tubos contendo 5mL de suspensão leveduriforme a 4000rpm por 5 minutos
10. Recuperar o sobrenadante e acrescentar 2mL de tampão TEME em cada tubo
11. Ressuspender as células e incubar a 30°C por 30 minutos, homogeneizando a cada 10 minutos
12. Centrifugar os tubos a 4000rpm por aproximadamente 5 minutos e desprezar o sobrenadante
13. Acrescentar ao sedimento 0,3mL de tampão CES
14. Homogeneizar e transferir a suspensão para microtubos de 2mL
15. Centrifugar os microtubos a 5000rpm por 5 minutos e desprezar o sobrenadante
16. Acrescentar 0,3mL de tampão CES ao sedimento e homogeneizar novamente
17. Centrifugar os microtubos a 5000rpm por 5 minutos e desprezar o sobrenadante
18. Ressuspender o sedimento com 0,1mL de tampão CES
19. Acrescentar 0,1mL de solução enzimática de *Trichoderma harzianum* (Concentração de 25mg de enzima em 0,1mL de tampão CES por amostra)
20. Incubar a 37°C por 20 minutos
21. Adicionar 0,24mL de agarose *low melting* (BioRad, CA, EUA) a 1,4% (concentração final da agarose será de aproximadamente 0,7%)
22. Transferir a mistura para os moldes e deixar a 4°C por aproximadamente 20 minutos
23. Numa placa de cultura de células com 24 poços, adicionar 2mL de tampão LET e em seguida transferir os blocos de agarose para esta placa (cada pocinho deve ser numerada para cada amostra e os blocos de agarose de uma mesma amostra devem ser colocados todos juntos no mesmo poço)

24. Incubar os blocos em tampão LET *overnight* a 37°C
25. Retirar o tampão LET e lavar os blocos com 1mL de tampão NDS
26. Repetir o procedimento descrito anteriormente (item 25) por mais duas vezes
27. Acrescentar 1mL de tampão NDS e, em seguida, adicionar 0,1mL de proteinase K (Invitrogen Life Technologies, EUA) a 20mg/mL em cada pocinho
28. Incubar a placa *overnight* a 50°C
29. Desprezar o tampão NDS e lavar os blocos de agarose com tampão TBE a 0,5X por 30 minutos
30. Repetir o procedimento descrito no item anterior por mais quatro vezes
31. Preparar gel de agarose para PFGE (BioRad, CA, EUA) a 1% em tampão TBE 0,5X
32. Montar gel a 1% com os blocos de agarose lavados, de acordo com a seqüência desejada, estando o marcador de peso molecular no início do gel (*Saccharomyces cerevisiae*)
33. Após endurecimento da agarose, acondicionar o gel no equipamento CHEF-DR II (BioRad, CA, EUA)
34. Programar o aparelho com pulso inicial de 60 segundos e pulso final de 180 segundos, utilizando uma voltagem de 6V/cm por um período de 23 horas
35. Após a corrida eletroforética em tampão TBE 0,5X, corar o gel com brometo de etídio na concentração final de 0,5µg/mL, por um período de 30 minutos e descorar, se necessário, em água destilada por 30 minutos
36. Visualizar as bandas sob transluminação e fotografar

APÊNDICE 4 - Preparo das soluções

Tampão de Lavagem (TL)

<i>Substância</i>	<i>Volume</i>	<i>Concentração Final</i>
EDTA 0,5M	10mL	50mM pH 8,0
Tris 1,0M	1mL	10mM
pH8,0		
Água ultrapura estéril q.s.p.100mL		-

Tampão TEME

<i>Substância</i>	<i>Volume</i>	<i>Concentração Final</i>
EDTA 0,5M	5,0mL	5mM pH8,0
Tris 1,0M	0,5mL	100mM
pH 8,0		
2-mercaptoetanol	0,25mL	0,5%
Água ultrapura estéril q.s.p. 50mL		-

Tampão LET

<i>Substância</i>	<i>Volume</i>	<i>Concentração Final</i>
EDTA 625mM	5,0mL	450mM pH9,0
Tris 1,0M	0,5mL	10mM pH8,0
2-mercaptoetanol	0,5mL	1,0%
Água ultrapura estéril q.s.p.50mL		-

Tampão CES

<i>Substância</i>	<i>Volume</i>	<i>Concentração Final</i>
EDTA 0,5M	0,3mL	10mM pH 8,0
Citrato de sódio 1,0M	1,5mL	100mM pH 5,0
Sorbitol 2,5M	6,0mL	1000mM
Água ultrapura estéril q.s.p.15mL		-

Tampão NDS

<i>Substância</i>	<i>Volume</i>	<i>Concentração Final</i>
EDTA 625mM	36,0mL	450mM pH9,0
Tris 1,0M	1,0mL	10mM pH8,0
N-Laurylsarcosine 10%	5,0mL	1,0%
Água ultrapura estéril q.s.p.50mL		-

Proteinase K (Invitrogen Life Technologies, CA, EUA, 92008)

Proteinase K	100mg
Água ultrapura estéril	5,0mL

OBS. Estocar em alíquotas de 0,5mL a -20°C.

Enzima lítica *Trichoderma harzianum* (Sigma)

<i>Trichoderma harzianum</i>	25mg/amostra
Tampão CES	0,1mL/amostra

OBS. Preparar somente na hora do uso.

Tampão TBE 0,5X

<i>Substância</i>	<i>Volume</i>	<i>Concentração Final</i>
EDTA 0,5M	4,0mL	0,002M pH 8,0
Tris 1,0M	89,0mL	0,089M pH 8,0
Ácido Bórico 1,0M	89,0mL	0,089M pH 8,0
Água ultrapura estéril q.s.p.1000mL		-