

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ALESSANDRO VIEIRA FERREIRA

**COMPARAÇÃO DO PERFIL ASSOCIADO À VIRULÊNCIA E DA SENSIBILIDADE
ANTIFÚNGICA ENTRE AMOSTRAS DE *Candida* spp EM CASOS DE
COLONIZAÇÃO DE AMBIENTE HOSPITALAR E INFECÇÃO HOSPITALAR.**

ALFENAS

2011

ALESSANDRO VIEIRA FERREIRA

**COMPARAÇÃO DO PERFIL ASSOCIADO À VIRULÊNCIA E DA SENSIBILIDADE
ANTIFÚNGICA ENTRE AMOSTRAS DE *Candida* spp EM CASOS DE
COLONIZAÇÃO DE AMBIENTE HOSPITALAR E INFECÇÃO HOSPITALAR.**

Dissertação apresentada
como parte dos requisitos
para obtenção do título de
mestre em Ciências
Farmacêuticas pela
Universidade Federal de
Alfenas.
Área de concentração: 2
Orientadora: Profa Dra.
Amanda Latercia Tranches
Dias

ALFENAS

2011

ALESSANDRO VIEIRA FERREIRA

**COMPARAÇÃO DO PERFIL ASSOCIADO À VIRULÊNCIA E DA SENSIBILIDADE
ANTIFÚNGICA ENTRE AMOSTRAS DE *Candida* spp EM CASOS DE
COLONIZAÇÃO DE AMBIENTE HOSPITALAR E INFECÇÃO HOSPITALAR.**

A banca examinadora abaixo
assinada aprova
a Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para obtenção do
título de mestre em Ciências
Farmacêuticas pela Universidade
Federal de Alfenas. Área de
concentração: 2

APROVADA EM:

Prof°.

Instituição:

Assinatura:

Prof°.

Instituição:

Assinatura:

Prof°.

Instituição:

Assinatura:

**Dedico a Deus, a
Nossa Senhora de
Aparecida ,a minha
esposa e filhos, aos
meus pais pelo apoio
na realização deste
trabalho.**

AGRADECIMENTOS

A todos amigos do laboratório de Microbiologia e Imunologia básica

Em especial a minha orientadora Profa.Dra. Amanda Latercia Tranches Dias

Aos amigos da Santa Casa de Poços de Caldas

Aos meus pais

A minha esposa que acreditou

As minhas inspirações:

Bianka

Maria Angélica

João Paulo

Ana Cecília

RESUMO

Este estudo visou comparar as leveduras do gênero *Candida* encontradas em fontes de infecção com as leveduras colonizantes de diversos locais de superfície e ambiente, tendo como critérios os fatores associados à virulência. Houve um predomínio de *Candida albicans* (32%) seguido de *C. parapsilosis* (20%), *C. lusitaniae* (20%), *C. krusei* (8%) e *C. guilliermondii* (4%) em fontes de infecção. Em relação às espécies colonizantes, observaram-se *C. tropicalis* (33,4%), *C. lusitaniae* (21,2%), *C. parapsilosis* (18,2%), *C. albicans* (15%), *C. famata* (6,1%) e *C. guilliermondii* (6,1%). Quanto aos fatores associados à virulência observou-se β hemólise em 19,7% dos isolados, α hemólise em 21,3% e não foi observada atividade hemolítica em 70% dos isolados. Dentre as amostras, houve sensibilidade para Anfotericina B em 100% das mesmas e em 98,57% para fluconazol. Das leveduras de *C. albicans* provenientes de fontes de infecção 100% demonstraram potencial de formação de biofilme. As espécies não-*albicans* com maior produção de biofilme foram *C. krusei* (100%), *C. parapsilosis* (75%), *C. tropicalis* (75%). Nas amostras oriundas de colonização, 100% de *C. albicans* desenvolveram biofilme e dentre as não-*albicans* destacaram-se *C. parapsilosis* (80%), *C. tropicalis* (77,78%). Elevadas capacidade de formação de biofilme e atividade metabólica foram observadas em 35,3% das espécies de *Candida* spp. Em *Candida* spp provenientes de fontes de colonização 33,3% apresentaram capacidade intermediária de produção de biofilmes mas com atividade metabólica alta.

Palavras-chave: Colonização. Infecção hospitalar. *Candida albicans*. *Candida* não-*albicans*. Virulência.

ABSTRACT

This study aims to compare the *Candida* species recovered from sources of infection with ones that are colonizing various sites and surface at the environment, having as criteria the factors associated with virulence. There was a predominance of *C. albicans* (32%) followed by *C. parapsilosis* (20%), *C. lusitaniae* (20%), *C. krusei* (8%) and *C. guilliermondii* (4%) at sources of infection. For the colonizing species we observed *C. tropicalis* (33.4%), *C. lusitaniae* (21.2%), *C. parapsilosis* (18.2%), *C. albicans* (15%), *C. famata* (6.1%) and *C. guilliermondii* (6.1%). Regarding the factors associated with virulence β hemolysis was observed at 19.7% of the isolates and α hemolysis at 21.3% and it wasn't seen hemolytic activity at 70% of the isolates. Among the isolates it was observed susceptibility for amphotericin B at 100% of the ones and at 98.57% for fluconazole. Among *C. albicans* from sources of infection 100% demonstrated the potential of biofilm formation. The non-*albicans* species with increased biofilm production were *C. krusei* (100%), *C. parapsilosis* (75%), *C. tropicalis* (75%). In isolates from colonization, 100% of *C. albicans* developed biofilm and among non-*albicans* species, predominated *C. parapsilosis* (80%), *C. tropicalis* (77.78%). High capacity for biofilm formation and metabolic activity were observed at 35,3% of the isolates. In *Candida* spp from sources of colonization 33.3% showed intermediate capacity to produce biofilms but with high metabolic activity.

Key words: Colonization. Nosocomial infection. *Candida albicans*. *Candida non-albicans*. Virulence.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estágios de formação de biofilme por *Candida albicans* em superfícies de cateteres. **32**
- Figura 2** - Imagem de biofilme maduro de *Candida albicans* após 48 horas de desenvolvimento. Biofilme composto por leveduras, hifas, pseudohifas e material exopolimérico (matriz). **33**
- Figura 3** - Avaliação do crescimento e análise das espécies de leveduras, isoladas do ambiente hospitalar, em meio de cultura cromogênico Chromagar Candida[®]. **50**
- Figura 4** - Diferença de tonalidade apresentados para *C. albicans* (a esquerda) e *C. Dubliniensis* (a direita) em Chromagar Candida[®]. **51**
- Figura 5** - Representação esquemática do ensaio de formação de biofilme em placa de microtitulação de 96 poços, composta de poliestireno. **52**
- Figura 6** - Esquema metodológico de interpretação da fita “Etest” com gradiente de droga antifúngica dado em µg/mL. **56**
- Figura 7** - Distribuição das espécies de *Candida* spp oriundas de fontes de colonização em ambiente hospitalar. **59**
- Figura 8** - Distribuição das espécies de *Candida* spp oriundas de fontes de infecção hospitalar. **59**
- Figura 9** - Distribuição das amostras de fontes de infecção de *Candida* spp quanto à fonte de isolamento. **60**
- Figura 10** - Distribuição das amostras de colonização de *Candida* spp quanto à fonte de isolamento. **61**
- Figura 11** - Comparação da distribuição de *Candida albicans* e *Candida* não-*albicans* em fontes de infecção. **62**

Figura 12 - Comparação da distribuição de <i>Candida albicans</i> e <i>Candida</i> não- <i>albicans</i> em fontes de colonização do ambiente hospitalar.	63
Figura 13 - Comparação da distribuição de <i>Candida albicans</i> e <i>Candida</i> não- <i>albicans</i> em fontes de infecção.	63
Figura 14 - Distribuição das espécies de <i>Candida</i> spp quanto à intensidade de produção de biofilme de acordo com a fonte de origem.	65
Figura 15 - Distribuição percentual das leveduras <i>C. albicans</i> e não- <i>albicans</i> , das leveduras de fontes de infecção, produtoras de hemolisinas.	68
Figura 16 - Distribuição das leveduras <i>C. albicans</i> e não- <i>albicans</i> , provenientes de fontes de colonização, produtoras de hemolisinas.	68
Figura 17 - Halo de hemólise de <i>Candida</i> spp em meio de cultura Agar sangue de carneiro.	69
Figura 18 - A e B- Avaliação da sensibilidade aos antifúngicos através da metodologia "E test".	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Coloração apresentada por diferentes espécies do gênero <i>Candida</i> semeadas em meio cromogênico Chromagar® <i>Candida</i>	50
Tabela 2 - Distribuição das amostras de <i>Candida</i> spp isoladas em fontes de infecção de Agosto de 2009 a Junho de 2010	58
Tabela 3 - Distribuição das amostras de <i>Candida</i> spp isoladas em fontes de colonização de Agosto de 2009 a Junho de 2010.	58
Tabela 4 - Fontes de infecção a partir das quais ocorreram isolamento de <i>Candida</i> spp.	60
Tabela 5 - Fontes de colonização a partir das quais ocorreram isolamentos de <i>Candida</i> spp	61
Tabela 6 - Distribuição percentual de <i>Candida albicans</i> e <i>Candida</i> não- <i>albicans</i> em amostras de origem clínica	62
Tabela 7 - Distribuição percentual de <i>Candida albicans</i> e <i>Candida</i> não- <i>albicans</i> em amostras de colonização	62
Tabela 8 - Avaliação da capacidade de produção de biofilme de acordo com a origem das espécies de <i>Candida</i> spp	64
Tabela 9 - Correlação entre a intensidade de produção de biofilme e atividade metabólica nas leveduras de <i>Candida</i> spp provenientes de fontes de infecção	66
Tabela 10 - Correlação entre a intensidade de produção de biofilme e atividade metabólica nas leveduras de <i>Candida</i> spp de fontes de colonização	66
Tabela 11 - Perfil de sensibilidade <i>in vitro</i> das espécies de <i>Candida</i> spp frente aos antifúngicos anfotericina B e fluconazol	70
Tabela 12 - Concentração inibitória mínima do crescimento <i>in vitro</i> de 50% (CIM50) e 90% (CIM90) dos 70 isolados de <i>Candida</i> spp	71

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** - Principais doenças fúngicas e fatores que predisõem à resistência aos antifúngicos de uso convencional em esquemas terapêuticos **43**
- Quadro 2** - Interpretação do perfil de sensibilidade antifúngica de amostras de *Candida* spp conforme valores apresentados de CIM frente a fluconazol e anfotericina B **56**
- Quadro 3** - Perfil de atividade hemolítica entre as diferentes espécies de *Candida* spp isoladas de fontes de infecção e colonização hospitalares **67**

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DE <i>Candida</i> spp.....	16
1.2	COLONIZAÇÃO POR ESPÉCIES DE <i>Candida</i> spp.....	17
1.3	INFECÇÃO HOSPITALAR POR <i>Candida</i> spp.....	20
1.4	FATORES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA	26
1.4.1	Capacidade de adesão.....	28
1.4.2	Capacidade de formação de biofilme	28
1.4.2.1	Etapas da formação de biofilme	30
1.4.3	Determinação de viabilidade celular.....	37
1.4.4	Capacidade de produção de hemolisinas.....	38
1.4.5	Perfil de sensibilidade x resistência a antifúngicos.....	39
1.4.5.1	Resistência aos antifúngicos	40
1.4.5.2	Antifúngicos de uso convencional em esquemas terapêuticos	41
1.4.5.3	Avaliação da sensibilidade aos antifúngicos das espécies de <i>Candida</i> spp.....	44
2	OBJETIVOS	45
2.1	OBJETIVO GERAL.....	45
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
3	METODOLOGIA	47
3.1	AMOSTRAS	47
3.1.1	Dados sobre os pacientes: critérios de inclusão	48
3.1.2	Coleta das amostras.....	48

3.2	PROCESSAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	49
3.2.1	Identificação	49
3.3	IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA DE <i>Candida dubliniensis</i>	51
3.4	PESQUISA DE FATORES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA DE <i>Candida</i> spp	52
3.4.1	Avaliação da capacidade de formação de biofilme	52
3.4.1.1	Quantificação da biomassa do biofilme	53
3.4.2	Avaliação da viabilidade dos biofilmes formados por <i>Candida</i> spp por ensaio de redução do XTT.....	53
3.4.3	Pesquisa de ação das hemolisinas sobre hemáceas	54
3.4.4	Teste de sensibilidade aos antifúngicos	55
3.4.4.1	Determinação da CIM dos antifúngicos por difusão em fita (Etest- AB Biodisk, Solna, Suécia)	55
4	RESULTADOS	57
4.1	IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	57
4.2	DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES DE <i>Candida</i> spp.....	57
4.2.1	Distribuição dos isolados de fontes de infecção	59
4.2.2	Distribuição dos isolados de fontes de colonização ambiental.....	60
4.2.3	Distribuição dos isolados <i>Candida albicans</i> x <i>Candida</i> não- <i>albicans</i>	62
4.3	IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA DE <i>Candida dubliniensis</i>	64
4.4	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DO BIOFILME	64
4.5	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DOS BIOFILMES	65
4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA	67
4.7	AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE A DROGAS ANTIFÚNGICAS.....	69
5	DISCUSSÃO	72

5.1	DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES <i>C. albicans</i> E não- <i>albicans</i>	72
5.2	CAPACIDADE HEMOLÍTICA	74
5.3	FORMAÇÃO E VIABILIDADE DE BIOFILMES	76
5.4	SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA	79
5.5	COMPARAÇÃO ENTRE AS FONTES DE INFECÇÕES E COLONIZAÇÃO PELAS ESPÉCIES DE <i>Candida</i> spp.....	81
6	CONCLUSÕES	86
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
	APÊNDICES	102
	ANEXOS	108

1 INTRODUÇÃO

As leveduras são fungos oportunistas ou patógenos responsáveis pela maior parte das infecções fúngicas nos seres humanos. Durante as últimas décadas, a incidência de infecções causadas por leveduras sofreu grande aumento, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (KHUN et al., 2003).

Avanços tecnológicos nos cuidados médico-hospitalares, melhoria e avanços nos métodos diagnósticos, disponibilidade de novos biomateriais para próteses, sondas e catéteres têm permitido aumento na sobrevivência de pacientes com quadros clínicos e cirúrgicos críticos, os quais têm sobrevivido à custa dos tratamentos aplicados e que de outra forma não sobreviveriam, no entanto, muitos destes pacientes acabam por morrer, não devido à doença de que realmente padecem, mas devido às infecções fúngicas de que passam a ser alvos (SELITRENNIKOFF, 2001; ZARAGOZA et al., 2006).

A elevada morbi-mortalidade e os custos decorrentes associados a estas infecções relevam a importância destas enfermidades como problema preocupante de saúde pública, sendo, assim, desejável e requerida a intervenção profilática embasada em identificações precoces dos fatores de risco, diagnóstico laboratorial nos estágios iniciais da infecção, determinação dos pontos de colonização microbiana em ambiente hospitalar e de fatores associados à virulência fúngica (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2003).

Os fungos, em outras épocas, frequentemente considerados contaminantes ou colonizantes, têm assumido caráter oportunista, sendo responsáveis por infecções de alta letalidade e surtos de infecções hospitalares, atingindo, principalmente, pacientes imunodeprimidos, nos quais apresentam-se como infecções rapidamente progressivas, de difícil diagnóstico e refratárias ao tratamento (CAGGIANO et al., 2008)

Há inúmeros fatores de risco que podem predispor os pacientes às infecções fúngicas, dentre estes: a) aumento da população de pacientes imunodeprimidos tais como pacientes com AIDS, pacientes oncológicos, diabéticos, dentre outros; b) uso

de antibióticos de largo espectro, tratamentos antimicrobianos de duração prolongada, uso de corticosteróides e drogas imunossupressoras; c) procedimentos cirúrgicos resultantes de tratamentos hospitalares intensivos e prolongados, hemodiálise e diálise interperitoneal em doentes imunocomprometidos; d) o advento do transplante de órgãos e de células-tronco hematopoiéticas permitindo maior sobrevida a estes pacientes; e) o aumento da população de idosos; f) evolução terapêuticas para o tratamento de recém-nascidos prematuros; e) As infecções por leveduras também podem estar associadas à utilização de dispositivos médicos invasivos tais como implantes, cateteres vasculares, próteses dentárias, lentes de contato, marcapassos para o coração, ligações artificiais, discos intervertebrais, dentre outros (PFALLER; WENZEL, 2003; WARNOCK, 2007).

O espectro de fungos oportunistas tem expandido de modo rápido e inclui diversas espécies do gênero *Candida*, *Cryptococcus*, *Rodothorula* e alguns fungos demáceos e espécies de *Aspergillus* spp. Dados referentes a autópsias de doentes imunocomprometidos revelaram que pelo menos metade destes doentes estava infectada com espécies de *Candida*, um terço com espécies de *Aspergillus* e os restantes continham infecções causadas por espécies de *Cryptococcus* e outros fungos, tais como espécies de *Fusarium* (CHANG et al., 2003). No entanto, *Candida* spp permanece como principal causa de infecção hospitalar oportunística, particularmente em unidades de terapia intensiva e de tratamento hematológico mas ainda há muitas falhas e dificuldades referentes à prevenção e ao tratamento das infecções causadas por estas leveduras (PFALLER; DIEKEMA, 2007).

1.1 ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DE *CANDIDA* SPP

As leveduras do gênero *Candida* são microrganismos pleomórficos, de ciclo sexual incompleto. O gênero *Candida* é constituído de aproximadamente 200 espécies de leveduras. Caracterizam-se por serem seres unicelulares, eucarióticos, heterotróficos, tendo como substância de reserva o glicogênio (PAULA, MATSUMOTO, MELO, 1999; LACAZ et al., 2002). Apresentam distribuição ubíqua na natureza, podendo ser encontradas em homens ou animais, solo, água, vegetais, alimentos e em diversos ambientes, inclusive hospitalares. Considerando-se a

microbiota normal humana, são encontradas como saprófitas em dobras cutâneas, orofaringe, mucosa vaginal e como colonizantes do trato gastrointestinal em até 80% de indivíduos saudáveis (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

As espécies do gênero *Candida* geralmente podem ser cultivadas em meios de composição relativamente simples como o ágar Sabouraud dextrosado, desenvolvendo colônias com aspecto característico. Testes laboratoriais simples como indução de tubo germinativo e clamidósporo terminal permitem identificar *C. albicans*. Os meios cromogênicos também são utilizados para identificação de algumas espécies de *Candida*, incluindo *C. albicans*, com base nas características de cor das colônias (MALUCHE; SANTOS, 2008).

As espécies pertencentes a este gênero estão muito bem adaptadas ao ambiente e ao corpo humano, assim, são capazes de colonizá-lo sem que sejam observados sinais de doença em condições fisiológicas normais (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007).

1.2 COLONIZAÇÃO POR ESPÉCIES DE *Candida* spp

O termo colonização é definido como a presença de um microrganismo em um ambiente ou um hospedeiro, havendo crescimento e multiplicação, mas sem qualquer expressão clínica e sem detecção de resposta imune no momento em que é isolado (JARVIS, 1996).

A colonização microbiana, nos seres humanos, tem início durante o nascimento e continua através de contatos posteriores com os ambientes inanimados ou animados até que seja estabelecido um equilíbrio sutil formando a microflora normal. Esta microflora normal, composta, por exemplo, por *Staphylococcus* coagulase-negativo ou *Staphylococcus aureus* na pele ou *C. albicans* no trato gastrointestinal, vagina, região perineal e trato respiratório, pode estar relacionadas a casos de infecções quando as defesas normais do hospedeiro são prejudicadas por doença subjacente, terapia imunomoduladora, com uso de dispositivos invasivos, ou quando o delicado equilíbrio da microflora normal é alterado através da terapia antimicrobiana (JARVIS, 1996).

A colonização é definida como o primeiro passo na patogênese das infecções invasivas associadas a *Candida* spp. Em uma pesquisa realizada por Mendiratta et al. (2006), a colonização de neonatos prematuros, por leveduras, foi considerada elevada, sendo da ordem de 33,9% contra o índice de 10% encontrado em recém nascidos a termo. A levedura colonizante mais frequente foi *C. albicans* (45,9%). Estes valores foram semelhantes aos encontrados por Sharp; Odds; Evans (1992) mas discrepantes do alto índice de 74,4% relatado por Singh et al. (1999).

Embora *C. albicans* seja considerada a levedura colonizante predominante, nas últimas décadas, as infecções e colonizações por outras espécies do gênero *Candida* têm aumentado consideravelmente (MENDIRATTA et al., 2006).

Muitos, se não a maioria, dos casos de infecções hospitalares resultam, direta ou indiretamente da colonização dos pacientes. Estudos têm mostrado que os pacientes internados podem rapidamente ser colonizados pela microbiota característica do ambiente hospitalar em questão (JARVIS, 1996).

Embora a maioria das infecções por *Candida* spp sejam de origem endógena, decorrentes da translocação de sítios da levedura existe a possibilidade de infecção exógena. O desequilíbrio na microbiota residente, lesões na mucosa intestinal, casos graves de desnutrição induzidos por algum fator predisponente do hospedeiro ou do fungo favorece a translocação da levedura aos capilares mesentéricos, permitindo o acesso à corrente sanguínea.

Por via exógena, as infecções podem ocorrer a partir de fontes em ambientes hospitalares, por intermédio das mãos dos profissionais da saúde, utilização de cateteres e soluções parenterais contaminadas (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; PERLROTH; CHOI; SPELLBERG, 2007).

A colonização ambiental ocorre quando o microrganismo permanece com a capacidade de infectar, mesmo em subcondições de desenvolvimento, nas mãos de profissionais de saúde, superfícies inanimadas e ambiente (VAZQUEZ et al., 1998).

Estudos moleculares de tipagem de leveduras, sugerem que as mãos dos profissionais de saúde e o meio ambiente podem desempenhar um papel importante na disseminação de *C. albicans* e *C. não albicans* entre o meio ambiente e pacientes submetidos a procedimentos como transplante de medula óssea. Entretanto, a direção na qual a transmissão ocorreu em maior frequência, se de paciente para o

meio ambiente ou vice-versa, não foi demonstrada conclusivamente (VAZQUEZ et al., 1998).

As colonizações de superfícies inanimadas podem ser duradouras. Estudos de inoculação experimental, em superfícies secas, mostram que *C. albicans* e *C. parapsilosis* podem sobreviver de 3 a 14 dias, respectivamente (TRAORE; SPRINGTHORPE; SATTAR, 2002). A presença de soro ou albumina, baixas temperaturas e teor elevado de umidade têm sido descritos como condicionadores de maior taxa de persistência ambiental (KRAMER; SCHWEBKE; KAMPF, 2006).

Há indícios de que as epidemias de propagação das *Candida* spp de colonização à infecção ocorra a partir de fontes ambientais (VAZQUEZ et al., 1993). Evidências da existência de um reservatório ambiental de espécies endêmicas como *C. albicans* e *C. glabrata* têm sido comprovadas através da utilização de técnicas de tipagem molecular. Linhagens de *Candida* spp recuperadas de pacientes submetidos a procedimento de transplante de medula óssea foram idênticas às linhagens encontradas em colonização nas superfícies das salas onde estes pacientes foram alojados, antes da comprovação da aquisição de infecção (VAZQUEZ et al., 1998).

A elevada prevalência de *Candida* spp em mãos dos profissionais de saúde (PHELPS; AYLIFFE; BABB, 1986), a habilidade do fungo em sobreviver em superfícies inanimadas (PFALLER, 1995), a colonização do trato genital materno, a colonização do trato respiratório e ou gastrointestinal dos recém nascidos e a colonização de biomateriais tais como próteses e catéteres podem funcionar como sítios reservatórios a partir dos quais o fungo pode se disseminar e passarem do estado de microrganismos colonizantes para a categoria de agentes infecciosos (GAGNEUR et al., 2001).

Nunn et al. (2007) observaram que linhagens de *C. dublinienses*, genótipo 1, presentes em infecções em pacientes HIV positivos, podem ser encontradas como colonizantes do trato gastrointestinal das aves marinhas *Uria aalge*. Estes pesquisadores afirmaram que a levedura utiliza como vetor o carrapato *Ixodes uriae* e estabeleceram, a partir dos resultados obtidos, uma nova via de transmissão fúngica, da colonização ambiental para a infecção em humanos.

1.3 INFECÇÃO HOSPITALAR POR *Candida spp*

As infecções nosocomiais ou hospitalares (IH) denominadas “infecções relacionadas a serviço de saúde” são consideradas uma das mais frequentes complicações nos pacientes submetidos à hospitalização. Segundo o *Center of Diseases Control* (CDC), a IH é uma infecção localizada ou sistêmica, que não existia no momento da admissão do paciente ao hospital (GARNER et al., 1996).

A natureza dos microrganismos encontrados nestas IHs tem variado nas últimas cinco décadas, devido a fatores ambientais e pressão seletiva do uso de antimicrobianos. Há diversos critérios para diagnóstico de IHs tais como: evidência clínica derivada da observação direta do paciente ou da análise do seu prontuário; resultados de exames de laboratório, ressaltando-se os exames microbiológicos, a pesquisa de antígenos, anticorpos; evidências de estudos com métodos de imagem, endoscopia, biópsia dentre outros (BRASIL, 1998).

É importante que cada instituição conheça o seu perfil epidemiológico de infecções nosocomiais e os desafios e obstáculos a serem vencidos para posterior prevenção e controle das mesmas (RIBEIRO et al., 2002).

A incidência de IHs por fungos tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas acarretando altos índices de mortalidade que ficam em torno de 60% (HOTA, 2004).

As manifestações clínicas das infecções fúngicas nosocomiais podem se apresentar sob diversas formas: infecção de corrente sanguínea (fungemia), infecção do trato urinário, infecção de ferida cirúrgica, abscessos cutâneos relacionados à inserção de cateter, infecção do músculo cardíaco entre outras (SILVA, 2005)

A relevância das infecções por *Candida spp* e ambiente hospitalar passaram a ganhar importância a partir da década de 1980, interligada ao avanço da tecnologia científica médica e do melhor conhecimento dos mecanismos desencadeadores de doenças, propiciando sobrevivência maior do ser humano. Este fato fez com que as intervenções de procedimentos clínico-laboratoriais expusessem os pacientes a uma seletividade de microrganismos mais resistentes,

favorecidos pelo uso indiscriminado, ao longo do tempo, dos fármacos disponíveis no mercado (COLOMBO et al., 2003).

As leveduras do gênero *Candida* são patógenos de destaque em IHS, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Em hospitais terciários, o gênero *Candida* responde por cerca de 80% das infecções fúngicas documentadas e é a quarta causa de infecção da corrente sanguínea, conduzindo ao óbito em torno de 25 a 38% dos pacientes que desenvolvem candidemia, representando grande desafio aos clínicos de diferentes especialidades devido às dificuldades diagnósticas e terapêuticas das infecções causadas por estes agentes (ST-GERMAIN et al., 2001).

Entre as infecções invasivas causadas pelo gênero *Candida*, salienta-se a relevância clínica dos casos de infecção de corrente sanguínea, conhecida como candidíase hematogênica ou candidemia. O termo candidíase hematogênica engloba um espectro amplo de situações clínicas, incluindo desde episódios isolados de candidemia até casos nos quais o fungo, presente na corrente sanguínea, dissemina-se para um ou vários órgãos do hospedeiro infectado (MATSUMOTO et al., 2002).

Um problema particular associado a este grupo de pacientes é que, no momento inicial da infecção, faz-se dificultada a distinção clínica de pacientes com fungemia daqueles com infecção hematogênica bacteriana (bacteremia). Esta dificuldade acarreta um atraso inicial da terapia antifúngica e a escolha da terapêutica empírica inicial pode ser inadequada. Novos estudos estão sendo realizados, com a finalidade de desenvolver técnicas modernas para diagnosticar com precisão e rapidez as candidemias. A reação em cadeia de polimerase (PCR) é uma técnica promissora, mas ainda não é uma ferramenta disponível rotineiramente (JAMES, 2007).

Berzaghi et al. (2009) apresentam em seu trabalho nova abordagem diagnóstica baseada na detecção do antígeno de 65 KDa que trata-se de uma proteína estrutural encontrada entre as espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* mas não encontrada em linhagens de *C. glabrata*.

Estudos recentes vêm destacando a possibilidade de utilização dos níveis séricos de procalcitonina como marcadores de infecções hematogênicas. A

procalcitonina é um polipeptídeo com peso molecular de aproximadamente 13 kDa, produzida primariamente pelo fígado e células mononucleares periféricas; sua produção é estimulada pelas citocinas e lipopolissacarídeos. É sabido que nas candidemias ocorre aumento dos níveis séricos deste polipeptídeo em menor escala quando comparado aos níveis em casos de bacteremias, embora o ponto de corte que diferencie uma da outra ainda não tenha sido referenciado (MARTINI et al., 2010).

As infecções fúngicas causadas por *Candida* spp abrangem desde lesões superficiais em pessoas saudáveis até infecções difusas em pacientes neutropênicos (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007). Tanto fatores predisponentes locais quanto sistêmicos do hospedeiro podem contribuir para a invasão por *Candida* spp. Diversos processos patológicos, fisiológicos ou traumáticos podem facilitar a colonização e posterior infecção do hospedeiro por *Candida* spp. Os fatores mais comumente encontrados são: imunossupressão, neutropenia, desnutrição e quimioterapia antineoplásica. Outros facilitam a entrada do microrganismo no hospedeiro, como o uso prolongado de cateteres, queimaduras, cirurgias extensas, diálise peritoneal ou abuso de drogas intravenosas. Fatores combinados também podem ocorrer como, por exemplo, a utilização prolongada de cateteres associados à antibioticoterapia, nos quais as leveduras podem multiplicar-se no trato gastrointestinal ou pele; a partir daí, o fungo pode causar candidemia (MALUCHE; SANTOS, 2008; ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007). A candidúria, presença de leveduras na urina, também é uma manifestação comum da colonização ou infecção por *Candida* em pacientes internados, podendo ser um indício de processos infecciosos mais graves no rim, o que pode causar lesões graves com alta morbidade e mortalidade (DE OLIVEIRA; MAFFEI; MARTINEZ, 2001). Nos últimos anos tem ocorrido alteração na etiologia das infecções causadas por *Candida*. Anteriormente as infecções estavam associadas principalmente a *C. albicans* nos pacientes com candidíase, que ainda é a micose invasiva mais frequente, embora, nos últimos anos as espécies de *Candida* não-*albicans* tenham respondido por mais de 50% dos casos (PAPPAS et al., 2003). Esta alteração na etiologia das infecções está associada a alguns fatores de risco específicos das *Candida* não-*albicans*, dentre eles: colonização simultânea em mais

de um sítio anatômico, neutropenia, uso profilático de antifúngicos, principalmente fluconazol, acesso vascular central, índice APACHE II (ABI SAID; ANNAISSIE, 1998); leucemia em fase aguda, transplante de medula óssea, interrupção do uso de anfotericina B durante o tratamento (KRCMERY, 1999), doenças hematológicas malignas (VISCOLI et al.; 1999), processos cirúrgicos e falência renal (BLOOMBERG et al., 1998). Bassetti et al. (2006) realizaram um estudo em pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva em hospitais italianos e mostraram esta alteração na distribuição das espécies de *Candida* em candidemias, havendo uma diminuição nas linhagens de *C. albicans* e aumento de *C. não-albicans*.

Candida albicans ainda é a espécie mais freqüentemente isolada de infecções superficiais e invasivas, mas espécies não-*albicans* têm aumentado em freqüência, muitas vezes são refratárias às terapias convencionais. Assim, paralelamente ao aumento geral das candidemias, observou-se aumento das infecções de corrente sangüínea por espécies de *Candida* não-*albicans* como: *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilhermondii* e *C. lusitaniae*. As razões para essa inversão no padrão de distribuição das espécies ainda não foram completamente elucidadas, podendo estar fortemente relacionadas com o potencial de virulência destes microrganismos (COLOMBO et al., 2003). A *C. albicans* apresenta um potencial patogênico bastante conhecido, apresentando como principais fatores de patogenicidade e virulência a capacidade de aderência a diferentes mucosas e epitélios, o dimorfismo com produção de estruturas filamentosas que auxiliam a invasão tissular, a termotolerância significativa, e a produção de enzimas como proteinases e fosfolipases (DIGNANI et al., 2003). Esta espécie é naturalmente sensível a todas as drogas antifúngicas de uso sistêmico, mas já foram relatados casos de resistência adquirida a azólicos em pacientes que foram expostos prolongadamente a estes medicamentos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Recentemente, *C. dubliniensis* foi reconhecida como uma espécie emergente cujas características morfológicas e bioquímicas são muito semelhantes a *C. albicans*, sendo assim, sua identificação precisa de grande importância, um teste presuntivo de identificação indireta baseado na capacidade de crescimento a 45°C

tem sido utilizado, mais as técnicas moleculares são as mais confiáveis para identificar *C. dubliniensis*. Esta espécie é menos patogênica que a *C. albicans*, porém apresenta maior facilidade em desenvolver resistência a azólicos. Atualmente, ainda são raros os casos de doenças sistêmicas relacionadas à *C. dubliniensis* (KRCMERY; BARNES, 2002).

Candida tropicalis possui considerável potencial biológico como agente oportunista quando o hospedeiro encontra-se neutropênico, quando há supressão da flora bacteriana pelo uso de antimicrobianos e danos na mucosa gastrointestinal. Em países da América Latina, em especial no Brasil, esta espécie é muito freqüente, mesmo entre pacientes não portadores de câncer, constituindo-se na segunda ou terceira principal causa de candidemia (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Candida glabrata é a espécie que apresenta maior aderência, sendo reconhecida pela capacidade de produzir biofilme e considerada um importante patógeno hospitalar, constituindo a levedura em maior ascensão nas candidemias relatadas nos EUA e Europa (TAMURA et al., 2007). Isolados clínicos de *C. glabrata* apresentam menor sensibilidade ao fluconazol, conseqüentemente, um aumento nos índices de colonização/infecção por esta espécie tem sido observado em diferentes grupos de pacientes expostos prolongadamente ao fluconazol. Além dos problemas terapêuticos de infecções por *C. glabrata* associados aos azólicos, tem sido documentada a menor sensibilidade de isolados desta espécie em relação a anfotericina B (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Candida parapsilosis apresenta-se, desde os anos 80, como um importante patógeno hospitalar de fungemias. Em países da América Latina, *C. parapsilosis* tem sido reconhecida como a segunda principal causa de infecção invasiva, sendo que sua ocorrência é maior em crianças e recém-nascidos prematuros internados em unidades de terapia intensiva (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). Esta espécie prolifera-se em soluções contendo glicose, tem grande capacidade de produzir biofilme e freqüentemente coloniza a pele (LEVIN et al., 1998).

Candida krusei tem se mostrado como um patógeno hospitalar ocasional, particularmente, em pacientes portadores de doenças patológicas malignas e/ou submetidos a transplante de medula óssea. Esta levedura é naturalmente resistente

ao fluconazol, e talvez isso explique seu aumento em pacientes neutropênicos expostos a este antifúngico (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Candida lusitaniae é uma levedura pouco freqüente como agente causador de doença invasiva, mas tem sido relatada como agente de candidemia em pacientes imunocomprometidos. Frequentemente, isolados clínicos de *C. lusitaniae* apresentam resistência natural a anfotericina B ou desenvolvem-se rapidamente, mas são sensíveis a triazólicos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Candida guilliermondii ainda não é frequentemente encontrada como causadora de infecções invasivas, mas esta espécie vem sendo reconhecida por diferentes autores como agente emergente. A maioria dos casos descritos relaciona-se a pacientes com câncer. Em relação a seu tratamento, há relatos de resistência *in vitro* de amostras clínicas à anfotericina B, porém há dúvidas sobre a real eficácia deste medicamento na terapêutica de infecções sistêmicas por *C. guilliermondii* (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Atualmente novas espécies de leveduras do gênero *Candida* spp, apesar de raras, estão se tornando emergentes. *Candida nivariensis* e *Candida bracarensis* possuem fenótipos semelhantes e genótipo com alta similaridade no sequenciamento genético à *C. glabrata* (CORREIA, A. et al. 2006). Estas leveduras apresentam multirresistência aos antifúngicos azóis e tem CIM mais elevada do que *C. glabrata* (BORMAN, A. et al. 2008; LOCKHART, S.R. et al. 2009). *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* são duas novas espécies que juntamente com *C. parapsilosis* formam o complexo parapsilosis e apresentam algumas variações genéticas em relação à *C. parapsilosis* (GOMEZ-LOPEZ, A. et al. 2008), além de possuírem redução de sensibilidade a classe de antifúngicos echinocandinas e serem consideradas como importantes leveduras patogênicas (GARCIA-EFRON, G. et al. 2008). A diferenciação entre as espécies de *C. glabrata* de *C. nivariensis* e *C. bracarensis*; *C. parapsilosis* de *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* e também *C. albicans* de *C. dubliniensis* são realizadas através da combinação de métodos presuntivos como os fenotípicos e métodos genotípicos.

1.4 FATORES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA

A capacidade da levedura em aderir, infectar e causar doença, em conjunto é definida como potencial de virulência ou patogenicidade (TAMURA et al., 2007). Existem diferenças na patogenicidade de isolados de *Candida* spp, assim, vários fatores de virulência têm sido propostos e descritos (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007).

Os fatores de virulência são determinados geneticamente, porém expressos pelos microrganismos quando submetidos a certas condições, tais como teor nutricional, atmosfera de oxigênio e temperatura. Essas condições são específicas para cada microrganismo e variam de hospedeiro para hospedeiro ou até mesmo entre os diferentes tecidos de um mesmo hospedeiro (TAMURA et al., 2007).

Candida albicans é um importante agente oportunista para seres humanos e dispõem de uma variedade de fatores associados à sua capacidade de causar infecções. Antes de se discutir cada um dos fatores de virulência deste microrganismo, faz-se importante ressaltarmos a sua versatilidade como um patógeno. Componente crucial desta versatilidade é a sua capacidade de sobreviver como comensal em vários sítios anatômicos, cada um com suas condições inerentes. Esta capacidade adaptativa está associada ao fato do espectro de doenças causadas por *C. albicans* e *C. não-albicans* ser superior a de outros microrganismos. *Escherichia coli*, por exemplo, coloniza o intestino de seres humanos mas só é encontrada transitoriamente na cavidade bucal e raramente na mucosa vaginal, ao contrário de *C. albicans*, que vive como comensal em cada um desses locais e causa a doença quando for dada a oportunidade (CALDERONE; FONZI, 2001).

Dentre os fatores de virulência observados entre as espécies de *Candida* spp. estão: habilidade de produzir enzimas hidrolíticas, atividade hemolítica em agar-sangue enriquecido, propriedade de multiplicação a altas temperaturas, hidrofobicidade de superfície celular, variabilidade genotípica, “switching” fenotípico, aderência e formação de biofilmes (TAMURA et al., 2007; RÖRIG; COLACITE; ABEGG, 2009).

As proteinases e fosfolipases são as principais exoenzimas envolvidas na virulência de leveduras do gênero *Candida* (RÖRIG; COLACITE; ABEGG, 2009). A aderência das leveduras às células epiteliais é maior quando as leveduras apresentam atividade de fosfolipase superior e, portanto, maior é a sua patogenicidade (BARRETT-BEE et al., 1985). Para estudar a atividade enzimática das leveduras são analisadas as atividades das enzimas extracelulares conforme protocolos clássicos (TAMURA et al., 2007).

Células leveduriformes hidrofóbicas (CSH) apresentam maior virulência em ratos do que células leveduriformes hidrofílicas. A expressão de CSH por *C. albicans* tem sido relacionada com virulência aumentada, possivelmente por estimular fenômenos de aderência, resistência à fagocitose e germinação (JABRA-RIZKI et al., 2001).

A alteração fenotípica na morfologia das colônias, incluindo mudança no formato, estruturas de superfície celular e germinação a 37°C, também pode tornar as leveduras mais virulentas (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007).

Outro fator de virulência mencionado anteriormente é a aderência, sendo esta mediada por macromoléculas denominadas adesinas. Para que ocorra a aderência permanente entre o microrganismo invasor e o tecido do hospedeiro, é necessário que se estabeleça ligações específicas entre estruturas complementares existentes na superfície do patógeno e da célula epitelial (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007). Alguns estudos *in vivo* e *in vitro* têm sido desenvolvidos para quantificar e caracterizar a aderência de espécies de *Candida* a superfícies celulares e inanimadas (JABRA-RIZKI et al., 2001).

A capacidade das leveduras de formar biofilme também pode ser avaliada segundo o método de aderência (TAMURA et al., 2007). A formação de biofilme é um outro tipo de aderência, na qual os microrganismos formam agregados unicelulares, gerando estruturas multicelulares que aderem a superfícies. Seu desenvolvimento ocorre em resposta a uma variedade de condições, tais como alta densidade celular, privação de nutrientes e estresse físico ambiental (O'TOOLE; DAVEY, 2000).

Para que as infecções causadas por *Candida* spp sejam controladas, o hospedeiro deve gerar uma ampla resposta de defesa, sendo assim possível neutralizar os fatores de virulência de tais leveduras (MORAGUES et al., 2003).

1.4.1 Capacidade de adesão

A capacidade de adesão de *Candida* spp às células, tecidos e dispositivos médicos implantados nos hospedeiros e a imunomodulação da resposta imune do hospedeiro são considerados aspectos importantes das interações da célula com o ambiente que a circunda. A adesão das células ao hospedeiro é um pré-requisito para a colonização e um passo inicial para a infecção (ARTHINGTON-SKAGGS; FRADE, 2010). As interações físicas destas leveduras com as células do hospedeiro são mediadas na superfície celular e os constituintes da parede celular que estão implicados nas ligações são denominados de adesinas. Existe uma grande variedade deste tipo de estruturas, justificando, assim, a capacidade da célula colonizar um variado número de superfícies (CHAFFIN et al., 1998).

O processo de adesão às superfícies do hospedeiro envolve fatores biológicos e não biológicos. Quanto aos fatores biológicos, a adesão é regulada por mecanismos moleculares específicos, principalmente através da produção de proteínas específicas, as adesinas. Um conjunto de adesinas diretamente envolvidas na adesão de *C. albicans* ao epitélio humano já foi identificado. Em relação aos fatores não biológicos, incluem-se as forças de van der Waals, interações hidrofóbicas e eletrostáticas (DUNNE, 2003).

1.4.2 Capacidade de formação de biofilme

As infecções causadas por *Candida* spp. se iniciam com aderência e colonização de superfícies artificiais ou superfície biótica do hospedeiro. Posteriormente, segue a formação de uma estrutura tridimensional complexa de células de leveduras, hifas, pseudohifas e matriz extracelular polimérica, sendo esta

denominada biofilme (LAFLEUR; KUMAMOTO; LEWIS, 2006; SENEVIRATNE et al., 2008; VANDENBOSCH et al., 2010).

Consterton et al., em 1978, definiram biofilme como “uma cidade de microrganismos”. Donnan e Costerton definiram um biofilme como sendo uma comunidade séssil caracterizada por células formadoras de microcolônias e que encontram-se aderidas, de modo irreversível, a um substrato, a uma interface, ou ainda umas às outras, embebidas em uma matriz exopolimérica de substâncias extracelulares e que exibe um fenótipo alterado em relação à taxa de crescimento, à transcrição genética (DONLAN, CONSTERTON, 2002).

Os microrganismos existem em condições normais sob duas formas, isolados como células planctônicas (em suspensão) ou na maioria das vezes em comunidades, aderidos a uma superfície e vinculados a um biofilme (CHANDRA et al., 2001). Os biofilmes são cruciais no desenvolvimento de infecções, uma vez que servem de nicho aos agentes patogênicos e estão associados a altos níveis de resistência a agentes antimicrobianos (KUHN et al., 2002).

A formação de biofilme é um dos principais fatores de virulência de *Candida* spp e, atualmente, tem recebido considerável destaque (JIN et al., 2003). A formação de biofilme de *Candida* tem uma importante repercussão clínica devido à habilidade das células do interior do biofilme que suportam o sistema imune do hospedeiro e devido também ao aumento da resistência à terapia antifúngica. Além disso, a formação de biofilme em dispositivos médicos pode afetar negativamente o hospedeiro, pois pode causar falha no funcionamento do aparelho e servir como reservatório ou fonte de futuras infecções (KOJIC; DAROUICHE, 2004). As infecções que estão associadas à formação de biofilmes são de tratamento difícil e em pacientes com candidemia associada a cateter, a remoção do mesmo deve ser realizada como parte do tratamento (PAULA; MATSUMOTO; MELO, 1999; TAMURA; GASPARETTO; SVIDZINSKI, 2003).

Candida spp tem facilidade de colonizar e formar biofilmes em uma série de biomateriais; *stents*, próteses (cardíacas, articulações, etc), implantes (lentes, mama, etc) e vários tipos de cateteres. *Candida* spp também pode formar biofilmes em diversos materiais constituídos por PVC, poliestireno, poliuretano e uma variedade de outras superfícies gerando dificuldade no sucesso do tratamento nas infecções

de pacientes que utilizam materiais médicos com esta composição (AL-DHAHERI; DOUGLAS, 2008).

A maioria das infecções associadas à utilização de implantes médicos invasivos estão relacionadas à formação de biofilmes nesses dispositivos. As células de *Candida* spp podem invadir os tecidos em contato com o dispositivo ou ser libertadas na corrente sanguínea, causando infecção. O desenvolvimento do biofilme depende do tipo e do número de células que se aderem ao dispositivo, do tipo de superfície que constitui o dispositivo e do meio ou fluido a que os microrganismos estão expostos (DONLAN, 2001).

A natureza da estrutura do biofilme e as características das células que o constituem conferem uma resistência aos agentes antimicrobianos e às defesas naturais do organismo. Os mecanismos responsáveis pela elevada resistência apresentada por biofilmes de *Candida* ainda não foram bem elucidados. Possíveis mecanismos incluem: reduzida taxa de crescimento, limitada disponibilidade de nutrientes, expressão de genes de resistência induzida pelo contato com uma superfície, em especial os de codificação de bombas de efluxo, densidade celular aumentada, envelhecimento celular, presença de células "persistente" no biofilme e penetração restrita da droga através da matriz do biofilme (FERREIRA et al., 2009; AL-DHAHERI; DOUGLAS, 2008). Alguns investigadores estudaram ainda o fenômeno de coagregação e coadesão entre *Candida* com diferentes espécies de bactérias e o efeito de fatores moduladores incluindo saliva, açúcares e pH. Verificou-se então que bactérias como a *Pseudomonas aeruginosa* podem influenciar e modificar significativamente o crescimento das leveduras e a formação de biofilme (THEIN; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2006).

1.4.2.1 Etapas da formação de biofilme

Espécies de *Candida*, como microrganismos oportunistas, são capazes de se aderir a superfícies e formar biofilmes, protegendo as leveduras dos antifúngicos e dos mecanismos de defesa do hospedeiro e podendo promover a persistência da infecção. Os mecanismos responsáveis pela resistência a antifúngicos podem estar

relacionados com limitações difusionais à passagem do agente pela matriz extracelular, com alterações fenotípicas das células no biofilme e ainda com o desenvolvimento de mecanismos de resistência por alteração do genótipo das células. A complexa estrutura dos biofilmes de *Candida*, já observada *in vitro* e *in vivo*, sugere que a diferenciação morfológica para produzir hifas tem um importante papel na formação e maturação do biofilme. Estas hifas são essenciais para a integridade da arquitetura multicamadas do biofilme (FERREIRA et al., 2009) (FIGURA 1). A formação do biofilme passa pelas seguintes etapas: a) condicionamento da superfície do biomaterial com proteínas do hospedeiro; b) adesão inicial das leveduras à superfície do biomaterial; c) formação da camada basal por microcolônias de leveduras que se ancoram à superfície; d) formação da camada superior, composta principalmente por hifas e material extracelular polimérico envolvendo todas as camadas produzidas. O biofilme maduro possui numerosos canais de água para permitir a nutrição à estrutura (DOUGLAS, 2002).

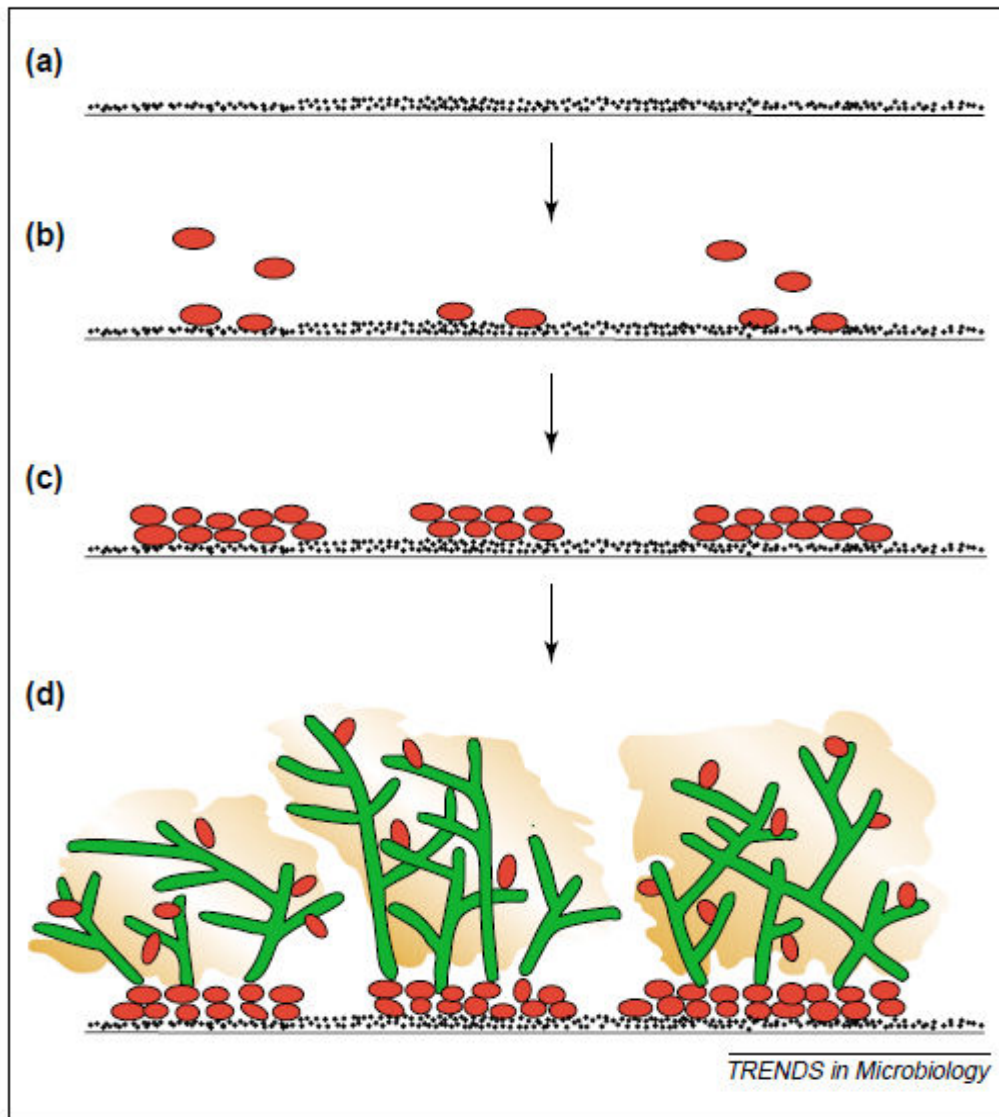


Figura 1. Estágios de formação de biofilme por *Candida albicans* em superfícies de cateteres.

Fonte: DOUGLAS (2003)

A arquitetura dos biofilmes produzidas por *C. albicans* está diretamente relacionada às diferentes morfologias presentes. O biofilme maduro após 48 horas é constituído por uma densa rede de leveduras, hifas e pseudohifas (DOUGLAS, 2002) (FIGURA 2).

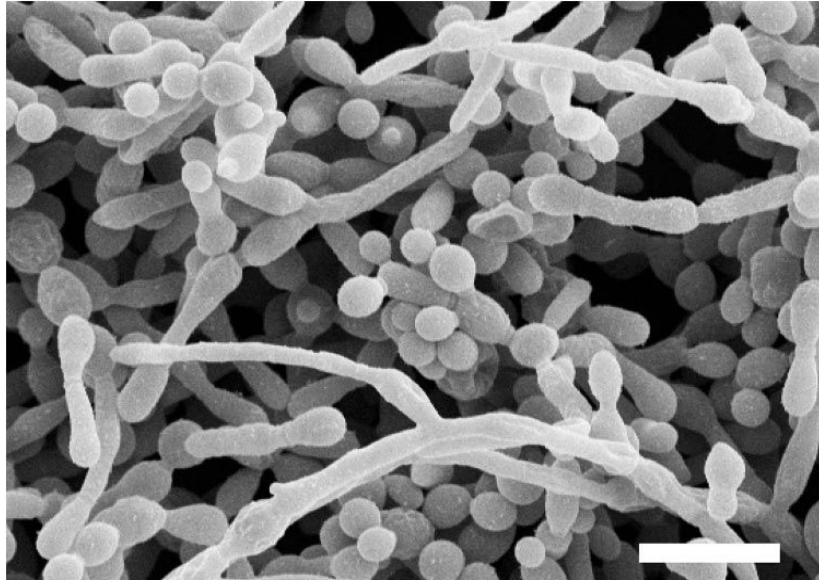


Figura 2. Imagem de biofilme maduro de *Candida albicans* após 48 horas de desenvolvimento. Biofilme composto por leveduras, hifas, pseudohifas e material exopolimérico (matriz).

Fonte: DOUGLAS (2003)

O crescimento do biofilme está limitado pela existência de nutrientes no meio ambiente e pela difusão desses mesmos nutrientes através da matriz do biofilme, bem como pela libertação de resíduos. A maturação do biofilme é também controlada por outros fatores, onde se incluem o pH interno, a difusão do oxigênio dissolvido e devido a osmolaridade (CARPENTIER; CERF, 1993). No final do processo de maturação, o biofilme acaba por atingir uma massa crítica e é estabelecido um equilíbrio dinâmico no qual o crescimento de células é compensado pela libertação de células planctônicas disponíveis para a colonização de outras superfícies. Num biofilme maduro, as células mais próximas da superfície tornam-se inativas, e numa fase posterior morrem devido à falta de nutrientes, diminuição do pH, diminuição da concentração de oxigênio e ao acúmulo de produtos tóxicos resultantes do metabolismo celular. Estudos recentes sugerem que o desenvolvimento primário, a maturação e o envelhecimento de um biofilme são regulados pela expressão de genes da qual é dependente a densidade populacional que é controlada através da transmissão de sinais entre as células. Uma vez

atingida a maturação, geram-se no biofilme uma série de alterações na forma de crescimento e cooperação fisiológica entre as células (DONLAN, 2002)

Na formação do biofilme está envolvida uma série de processos, dentre eles o sistema de sinalização celular denominado *quorum sensing* que é fundamental na formação de biofilmes microbianos (DONLAN, 2002). Esta estratégia de comunicação célula a célula, promove uma estabilidade aos biofilmes prevenindo a formação de superpopulação e, portanto, permitindo o controle da competição por nutrientes. O *quorum sensing* também possui implicações importantes no estabelecimento e desenvolvimento do processo infeccioso (HORNBY et al., 2001). Exemplos deste sistema de sinalização é a produção de farnesol que inibe a filamentação de *C. albicans* e a homoserina lactona que age como sinalizador promovendo a supressão da filamentação de *C. albicans* quando exposta a *Pseudomonas aeruginosa* (HOGAN; VIK; KOLTER, 2004).

As células em biofilme são fenotipicamente diferentes das células planctônicas. No biofilme, notadamente ocorre diminuição significativa de sensibilidade aos antifúngicos como anfotericina B, fluconazol e Voriconazol (RAMAGE et al., 2005). Os mecanismos desenvolvidos pelos biofilmes e que permitem a resistência aos antifúngicos em espécies de *Candida* ainda não estão claros. Possíveis mecanismos incluem: restrição na penetração da droga na matriz do biofilme, alterações fenotípicas resultante da diminuição da taxa de crescimento devido a limitações nutricionais, a expressão de genes de resistência induzida pelo contato com uma superfície, aumento da densidade celular, presença de esteróides de membrana e beta glucanos da parede celular (PERUMAL; MEKALA; CHAFFIN, 2007; NETT et al., 2007). Também podem ser devidos a uma combinação de dois ou mais desses mecanismos.

Al-dhaheri e Douglas, 2008, propuseram verificar se ocorreria a presença de uma subpopulação celular, em biofilmes, denominadas *persisters* ou droga-tolerante, viáveis mesmo a altas concentrações de anfotericina B, como já descrito para bactérias no trabalho de Lewis (2007). Os resultados mostraram a presença de células *persisters* em concentrações acima da CIM para *C. albicans* e não *albicans*. Não se sabe ainda o mecanismo pelo qual ocorre o desenvolvimento destas células e nem o motivo da tolerância a elevadas concentrações de antifúngicos mas a

principal preocupação é que estas células podem se constituir em fontes de *Candida* spp para infecções subseqüentes.

A formação de biofilme por *C. albicans* tem sido estudada mais extensivamente do que a formação desta estrutura em demais espécie de *Candida*. Há relatos de que o biofilme formado por *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, e *C. tropicalis* não é tão extensor quanto o formado por *C. albicans*; entretanto, estudos mais aprofundados de análise estrutural são necessários para descrever o desenvolvimento do biofilme por estes microrganismos (FERREIRA et al., 2009).

O desenvolvimento dos biofilmes pode ser afetado pelas condições de crescimento, pela natureza da superfície de contato, pela morfogênese da espécie de *Candida* em questão e por coinfeções por outros patógenos (EL-AZIZI et al., 2004; KOJIC; DAROUICHE, 2004).

A natureza química da superfície de contato parece influenciar a intensidade de formação de biofilme, sendo que há um aumento no desenvolvimento de biofilme em látex se comparado com cloreto de polivinila, mas há um decréscimo considerável em poliuretano e silicone 100%.(HAWSER; DOUGLAS, 1994). A arquitetura do biofilme de *C. albicans* é diferente quando este é formado em filtros de celulose e quando é formado em discos de cateter, indicando que depende muito da expressão de gene específico, induzida por contato (KOJIC; DAROUICHE, 2004).

Meios de cultura suplementados com glicose promovem a formação de biofilmes (HAWSER; DOUGLAS, 1994), particularmente de *C. parapsilosis*, o que reflete o potencial desta espécie de causar infecções em pacientes que recebem nutrição parenteral, sendo estas relacionadas aos dispositivos médicos utilizados. A hidrofobicidade da superfície também se correlaciona de maneira positiva com a formação de biofilme, assim como a suave agitação. Essas condições também são encontradas *in vivo* (como nos sistemas circulatório e urinário), favorecendo a formação de biofilme quando os dispositivos são inseridos (KOJIC; DAROUICHE, 2004).

As diferentes formas morfológicas são importantes na formação de biofilme, o que foi evidenciado em estudo que compara biofilmes formados por linhagens selvagens de *C. albicans* e por dois mutantes incapazes de desenvolver leveduras e hifas, respectivamente. O tipo selvagem produziu um biofilme com duas camadas

distintas, o mutante hifa-negativo produziu apenas a camada basal e o mutante produziu apenas a camada exterior, que era mais facilmente destacada dos discos de cateter. Isso sugere que o dimorfismo pode ser necessário para a arquitetura e estrutura do biofilme e é um fator essencial para o potencial patogênico de *C. albicans*. (BAILLIE; DOUGLAS, 1999).

A maioria das espécies de *Candida* parece produzir biofilme *in vitro*, em graus diferentes. Um estudo *in vitro* mostrou que *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, e *C. glabrata* produziram significativamente menos biofilme em discos cloreto de polivinila do que a *C. albicans* mais patogênica, conforme determinado pelo peso seco, ensaio colorimétrico e de radioisótopos (HAWSER; DOUGLAS, 1994). Outro estudo confirmou este achado quando mediu por peso seco, além de também concluir que, em microscópio, o biofilme de *C. albicans* possui morfologia mais complexa que o biofilme de *C. parapsilosis*, que era composto apenas por blastósporos agregados (KUHN et al., 2002).

A variabilidade entre linhagens na produção de biofilme difere entre espécies de *Candida*, mas os estudos ainda são inconsistentes (KOJIC; DAROUICHE, 2004). Alguns estudos têm mostrado que uma pequena variabilidade na produção de biofilme *in vitro* entre *C. albicans* isolada de infecções ativas (isolados invasivos) e *C. albicans* isolada de sítios de transporte (isolados não invasivos) (HAWSER; DOUGLAS, 1994), enquanto outros estudos constataram que *C. albicans* invasivas tem maior habilidade de formar biofilme quando comparada com isolados não invasivos, quando medidas por peso seco, mas não por ensaios bioquímicos (KUHN et al., 2002). Adicionalmente, um estudo que examinou a variação na formação de biofilme em 115 linhagens de *C. albicans* de três fontes diferentes (cavidade oral, vagina e ambiente) encontrou diferenças significantes na formação de biofilme. Isso ressalta a importância da metodologia adequada na avaliação de biofilmes, bem como a importância do fato de que há grande diversidade fenotípica entre as espécies de *Candida*, o que pode estar relacionado com sua patogenicidade (KOJIC; DAROUICHE, 2004).

1.4.3 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular de células planctônicas, comumente, tem sido avaliada pela determinação do número de colônias formadas após o cultivo de uma suspensão pré- estabelecida de células. O principal agravante desta prática, é o fato de que o microrganismo dará origem a uma colônia, mas na presença de agregados microbianos, como o que ocorre nos biofilmes, a avaliação de viabilidade poderá ser subestimada. A viabilidade celular também pode ser determinada recorrendo ao uso de fluorocromos, que se ligam a componentes celulares de células viáveis e podem ser detectados por microscopia de epifluorescência ou ainda quantificados por espectrofluorimetria. Nestes casos, o fluorocromo é reduzido a um composto fluorescente na presença de célula metabolicamente ativa. Como é o caso “do FUN-1” que é convertido numa sonda fluorescente vermelha nas células metabolicamente ativas. À medida que as células começam a perder a viabilidade, a cor vermelha transforma-se em amarela . A determinação da atividade celular também pode ser feita recorrendo a testes bioquímicos que medem a atividade de determinadas enzimas, o consumo de determinados substratos, consumo de oxigênio ou quantificação de ATP (RIESELMAN, HAZEN, CUTLER, 2000). Os métodos colorimétricos são frequentemente utilizados na avaliação da atividade celular e empregam sais de tetrazolium. Estes sais são compostos orgânicos heterocíclicos que substituem o O_2 no aceite de elétrons na cadeia respiratória. Estes sais são reduzidos e formam derivados formazanas tanto por ação enzimática quanto por ação química de transportadores artificiais de elétrons, como exemplo a menadiona ou metassulfato de fenazina, que apresentam a função de promover a reação entre as células da levedura e o sal de terazolium . Um dos sais mais comumente usados é o 2,3-bis(2-metoxi-4nitro-5-sulfofenil)-5-(fenilamnocarbonil-tetrazolium) ou XTT. Os sais de tetrazolium, de cor amarela, penetram rapidamente nas células intactas e, principalmente, nas mitocôndria e são reduzidos a formazana de cor púrpura, por ação das desidrogenases mitocondriais (HAWSER, 1996; KUHN et al., 2003).

1.4.4 Capacidade de produção de hemolisinas

A habilidade dos microrganismos patogênicos para adquirir o ferro no hospedeiro tem demonstrado ser de fundamental importância no estabelecimento da infecção (BULLEN, 1981). Alguns patógenos apresentam a capacidade de secreção de fatores hemolíticos para utilização de hemoglobina como fonte de ferro (LUO et al., 2001). Nos seres humanos, a maior parte do ferro está localizada intracelularmente na forma de ferritina ou como compostos contendo grupo heme. A pequena quantidade extracelular de ferro está ligada às proteínas de ligação de ferro e das transportadoras de ferro: transferrina e lactoferrina. Portanto, uma vez que é essencial e não tem nenhum ferro livre no organismo, os microrganismos devem adquirí-lo de um ou mais compostos contendo ferro. Numerosos microrganismos patogênicos crescem no hospedeiro utilizando a hemoglobina como fonte de ferro (OTTO; VERWEIJ-VAN VUGHT; MACLAREN, 1992). As leveduras *Candida* spp são incapazes de utilizar o ferro ligado à transferrina como fonte de ferro. Embora o soro seja rico em transferrina, as espécies *Candida* crescem no hospedeiro utilizando hemoglobina presente nos eritrócitos e ferritina como fontes de ferro (MANN; MOSSER; BUCKLEY, 1994). A produção do fator hemolítico pode ser regulada e observada na presença de glicose no meio de cultura enriquecido com sangue (WATANABE et al., 1997).

Alguns pesquisadores têm demonstrado que espécies de *Candida* são capazes de produzir um ou mais tipos de hemolisinas *in vitro* e que espécies não-*albicans* têm comportamento diferente em relação a *C. albicans*. A função das hemolisinas em relação à virulência das leveduras não está clara; mas talvez estejam associadas à disseminação das mesmas nos hospedeiros (BONASSOLI; BERTOLI; SVIDZINSKI, 2005).

1.4.5 Perfil de sensibilidade x resistência a antifúngicos

O termo resistência em um microrganismo é descrito como a persistência ou desenvolvimento de uma infecção no hospedeiro, mesmo em condições de concentração máxima da droga no sítio da infecção (PERFECT; COX, 1999). Segundo Traoré, Springthorpe e Sattar, (2002), o sucesso da resposta clínica ao tratamento depende tanto da sensibilidade e virulência do patógeno envolvido quanto de fatores do hospedeiro, como o sítio da infecção, resposta imunológica, presença de corpo estranho no local da infecção e também farmacocinética da droga.

Geralmente os pacientes que são submetidos à grandes cirurgias ou transplante de órgãos são alvos de profilaxia com antifúngicos para evitar o desenvolvimento de infecções fúngicas. A exposição de leveduras por períodos prolongados a baixas concentrações dos antifúngicos sistêmicos em geral, pertencentes à classe dos azóis ou outros antifúngicos, pode levar à seleção de isolados resistentes a essas drogas (VAZQUEZ et al., 1993). Alguns trabalhos experimentais de exposição prévia de culturas de leveduras a concentrações de drogas sustentam esta hipótese (CALVET; YEAMAN; FILLER, 1997).

Muitos autores descrevem variações de sensibilidade de isolados clínicos de *C. albicans* e espécies não-*albicans*, dependendo de fatores como o uso profilático de antifúngicos, localização geográfica dentre outros (MATSUMOTO et al., 2002).

As amostras de leveduras resistentes, em ambientes hospitalares, podem representar um perigo em potencial para os pacientes debilitados que se internam em unidades onde há contaminação com esses microrganismos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). Segundo Zhanel et al. (1997) a transmissão horizontal de paciente para paciente ou médico a paciente pode ocorrer, bem como infecção endógena e assim se faz necessária monitoração espacial e temporal de tais amostras para controle de episódios e surtos de infecção hospitalar. A resistência de isolados de *Candida* spp aos azóis é bem descrita entre indivíduos infectados por HIV apresentando quadro de candidíase orofaríngea recidivante e, também, entre adultos com estágios avançados de candidíase invasiva (MARR et al., 1999).

Assim sendo, a determinação do perfil de sensibilidade antifúngica da amostra também pode ser usada como ferramenta importante de tipagem fenotípica (DROMER et al., 1997).

1.4.5.1 Resistência aos antifúngicos

Nos últimos anos ocorreu uma mudança na ecologia fúngica em ambiente hospitalar. Atualmente, existe uma necessidade preocupante de se identificar o perfil dos microrganismos presentes no ambiente hospitalar, conhecendo principalmente seu comportamento frente aos antifúngicos. Alguns estudos mostram a ocorrência de *Candida* spp resistentes aos antifúngicos pertencentes a classe dos azóis, quando há uma exposição prolongada das leveduras a baixas concentrações de destes antifúngicos, em terapias prolongadas e usados como profiláticos. Por pressão seletiva, são selecionadas as leveduras resistentes (PONTÓN; QUINDÓS, 2006). Esta preocupação torna-se ainda maior quando se encontram, no mesmo local, paciente debilitado e ambiente com microrganismos resistentes ou portadores de sensibilidade diminuída, tornando ainda maiores os riscos de transmissões cruzadas e infecções exógenas. Isto ocorre tanto com a microbiota normal quanto com a colonização ambiental já que os microrganismos podem passar de colonizadores ambientais para microflora, rapidamente. (JARVIS, 1996). O desenvolvimento de resistência aos antifúngicos pelos fungos é inevitável, devido a grande capacidade de adaptação às mudanças ambientais que eles apresentam (PONTÓN; QUINDÓS, 2006).

A resistência aos antifúngicos ocorre de maneiras diferentes podendo ser resistência intrínseca (presente antes da exposição ao antifúngico); adquirida (desenvolvida após o contato com o antifúngico); resistência por alteração fenotípica e a capacidade de formar biofilmes (PONTÓN; QUINDÓS, 2006).

No entanto, do ponto de vista clínico é necessário considerar não só a resistência in vitro, mas também resistência clínica, isto porque o sucesso do tratamento não depende apenas da CIM dos antifúngicos, mas também de outros fatores tais como as propriedades do antifúngico: penetração e distribuição da droga, a sua natureza fungistática ou fungicida, dose apropriada, mecanismo de

ação e interação com outras drogas; Propriedades dos fungos: resistência ao antifúngico, tipo de célula e tamanho da população fúngica; Propriedades do hospedeiro: o estado imunológico do paciente, o local da infecção, comprometimento com o tratamento e presença de materiais médicos externos/invasivos (GUTIÉRREZ et al., 1996; CANUTO; RODERO, 2002).

1.4.5.2 Antifúngicos de uso convencional em esquemas terapêuticos

Os principais grupos de antifúngicos, de uso no Brasil, com ação em *Candida* sp são os poliênicos (anfotericina B e nistatina) e os azólicos imidazólicos (cetoconazol, miconazol) e triazólicos (itraconazol, fluconazol, voriconazol). A anfotericina B é considerada a droga mais efetiva, com ampla atividade fungicida “in vivo” e “in vitro”, embora possua limitação de uso de sua formulação endovenosa devido a sua elevada toxicidade renal (WHITE et al., 1997). A maioria as espécies do gênero *Candida* tem apresentado sensibilidade à anfotericina B, embora alguns estudos recentes têm apresentado isolados de *C. glabrata* e *C. krusei* para os quais deve-se aplicar dose máxima deste antifúngico. Mesmo diante destas considerações, a anfotericina B é considerada droga de primeira escolha para o tratamento de candidíase sistêmica em crianças (PAPPAS et al., 2004). Os azóis mais utilizados são o itraconazol e o fluconazol, sendo amplamente utilizados em casos de micoses subcutâneas e sistêmicas (SOJAKOVA et al., 2004). Matsumoto (2001) descreve que em relação aos azóis, *C. parapsilosis* mostrou ser bastante sensível ao itraconazol (92,8%), cetoconazol (85,7%) e fluconazol (64,3%), no entanto, uma elevada porcentagem de isolados *C. albicans* e *C. tropicalis* se mostraram resistentes a essas drogas. Segundo Ruiz (2005), *C. tropicalis* é a espécie com maior porcentagem de resistência aos imidazólicos e as espécies não-*albicans* apresentam altos índices de resistência ao fluconazol. *Candida glabrata* e *C. krusei* são espécies com alta resistência para os triazóis e sua importância tem aumentado devido a associações com sérias infecções. Em relação aos isolados de *C. glabrata* provenientes de crianças, 16% destes e 13% dos isolados a partir de adultos apresentaram resistência a este fármaco. Já *C. krusei* é espécie intrinsecamente resistente ao fluconazol (PFALLER et al., 1998). Atualmente, a

resistência de isolados de *Candida* aos azóis é bem descrita entre indivíduos infectados por HIV apresentando quadro de candidíase orofaríngea recidivante e também entre adultos com estágios avançados de candidíase invasiva (MARR et al., 1999).

Desta maneira, os testes de sensibilidade para resistência a azóis tem uso crescente na orientação do tratamento de candidíase, especialmente em situações em que há falha no tratamento empírico inicial (PAPPAS et al., 2004). O desenvolvimento de novas formulações de anfotericina B, que usam lipossomas ou complexos lipídicos como sistemas de distribuição, bem como a introdução dos compostos azólicos no final de 1980 e início de 1990 representaram um avanço importante no tratamento de infecções fúngicas, devido à sua segurança e farmacocinética favorável (COMO et al., 1994). A introdução destes novos agentes antifúngicos facilitou uma abordagem mais agressiva para a profilaxia e tratamento de infecções fúngicas levando à preocupação com o surgimento de microrganismos resistentes (GUTIERREZ et al., 1996) (QUADRO 1). No início de 1990, houve um aumento da candidíase e aparecimento da resistência ao fluconazol, que foi, posteriormente, descrita em até 41% dos pacientes nos anos seguintes (REVANKAR et al., 1996). Os mecanismos criados por *Candida* spp para desenvolver resistência aos azóis são falha no acúmulo da droga por utilização da bomba de efluxo, alteração no alvo de ação ERG 11P (SANGLARD et al., 1998), regulação da expressão de ERG 11 (MARICHAL et al., 1997) e alteração na composição do esterol de parede (NOLTE et al., 1997) (FIGURA 3). A resistência à anfotericina B surgiu em paralelo com o aumento do número de infecções invasivas, devido aos fungos chamados emergentes. Na classificação dos fungos relacionados como emergentes estão as leveduras, como *Trichosporon beigelii*, *C. lusitanae* e *C. guilliermondii*; fungos filamentosos, como *Fusarium* spp, *Scopulariopsis* spp e *Scedosporium* spp. e alguns fungos demáceos. Muitos destes fungos apresentam resistência intrínseca à anfotericina B e podem causar infecções invasivas, geralmente associadas a elevada taxa de mortalidade (BERENQUER et al., 1997). Felizmente, a resistência adquirida à anfotericina B continua a ser uma ocorrência limitada (ELLIS, 2002). No entanto, casos isolados de resistência adquirida à

anfotericina B têm sido descritos, especialmente em leveduras que causam infecções em pacientes com neoplasias (NOLTE et al., 1997).

Quadro 1. Principais doenças fúngicas e fatores que predisõem à resistência aos antifúngicos de uso convencional em esquemas terapêuticos

Antifúngicos	Infecção	Fungos	Fatores de risco
Fluconazol	Orofaringe	<i>Candida</i> spp	<ul style="list-style-type: none"> - Infecções por HIV - Uso de Fluconazol - Baixa contagem de CD4 - Uso prévio de tuberculostáticos - Uso de Antibióticos
Fluconazol	Candidemia	<i>Candida krusei</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Leucemia Aguda - Uso de Fluconazol - Severa neutropenia
Fluconazol	Candidemia	<i>Candida glabrata</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Neoplasia hematológica - Acesso venoso central permanente - Porta de entrada abdominal - Neutropenia - Uso de Fluconazol - Uso de Anfotericina B - Uso de Antibióticos
Anfotericina B	Infecções Invasivas	<i>Fusarium</i> spp	<ul style="list-style-type: none"> - Neoplasias hematológicas - Severa e prolongada neutropenia - Uso de Antibióticos de amplo espectro
Anfotericina B	Infecções Invasivas	<i>Scedosporium</i> spp	<ul style="list-style-type: none"> - Leucemia Aguda - Severa e prolongada neutropenia - Uso de Antibióticos de amplo espectro
Anfotericina B	Doenças disseminadas	<i>Aspergillus terreus</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Leucemia Aguda - Severa e prolongada neutropenia

Fonte: Canuto; Rodero, 2002

Isolados de *C. albicans* podem adquirir resistência à anfotericina B ou azóis em pacientes que recebem tratamento com estes antifúngicos. O desenvolvimento de resistência a poliênicos em espécies como *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii* tem sido descrito durante o tratamento com anfotericina B (KRCMERY et al.; 1998).

1.4.5.3 Avaliação da sensibilidade aos antifúngicos de espécies de *Candida* spp

A resistência aos antifúngicos é um fato preocupante nos tempos atuais e existe necessidade de identificar o isolado resistente. Desta forma, os perfis de sensibilidade dos isolados aos antifúngicos podem ser utilizados como ferramentas de tipagem fenotípica e avaliação do perfil associado à virulência dos isolados (DROMER et al., 1997). Os testes de sensibilidade às drogas, *in vitro*, para fungos, fornecem informações valiosas quanto à pesquisa de novas substâncias, resistência aos antifúngicos de uso freqüente, controle terapêutico de infecções e caracterizações de amostras fúngicas (SHADOMY; PFALLER, 1991). Nos anos 90, o CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (anteriormente denominado NCCLS- National Committee for Clinical Laboratory Standards) estabeleceu propostas de padronização dos testes de sensibilidade antifúngica para leveduras na tentativa de obtenção de resultados rápidos, confiáveis e reprodutíveis que pudessem ser usados no monitoramento terapêutico (CUENCA-ESTRELLA et al., 2001). Em 1997, com a publicação do documento M27-A, deu-se passo fundamental no alcance destes ideais. Padronizaram-se os métodos de macrodiluição, diluição em Agar, difusão em disco, difusão em fita, e recentemente, a nova versão do teste de microdiluição em microplacas (M27-A3, CLSI, 2008) para os testes de sensibilidade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Levando-se em consideração a importância das leveduras do gênero *Candida* como agentes infecciosos e colonizadores, sua diversidade de padrões de atividade enzimática, a ocorrência de amostras resistentes aos principais agentes antifúngicos e necessidade de descrever a cadeia epidemiológica da candidíase em ambiente hospitalar, o objetivo deste trabalho é comparar os perfis associados à virulência e a sensibilidade a antifúngicos em amostras de *Candida* spp associadas a situações de colonização e infecção hospitalares.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar amostras de leveduras de fontes de infecção (hemoculturas, ponta de cateter e escarro) e de fontes de colonização [ar ambiente, leitos, maçanetas de porta, interruptores, bandejas de preparo de medicamentos, estetoscópios, mãos e aventais (coletes) de profissionais da saúde] em hospital da cidade de Alfenas-MG.
- Avaliar e comparar a habilidade de formação de biofilme pelas amostras de *Candida albicans* e *Candida* não-*albicans*.
- Avaliar e comparar a habilidade de formação de biofilme entre amostras de *Candida* spp provenientes de fontes de infecção e fontes de colonização hospitalar.
- Avaliar a atividade metabólica dos biofilmes formados por *Candida albicans* e não-*albicans* provenientes de colonização e infecção hospitalar.
- Determinar e comparar a atividade hemolítica de *Candida* spp provenientes de colonização e infecção hospitalar.
- Verificar o comportamento de *Candida* spp de situações de colonização de ambiente hospitalar e infecção hospitalar frente aos antifúngicos de uso convencional em esquemas terapêuticos (fluconazol e anfotericina B).

-Estabelecer e comparar as concentrações inibitórias mínimas dos isolados de amostras de *Candida* spp provenientes de fontes de colonização e de amostras de fontes de infecções.

-Correlacionar os achados laboratoriais de *Candida* spp de casos de colonização e casos de infecção hospitalar no intuito de estabelecer a cadeia epidemiológica das infecções por *Candida* spp, conhecer os perfis associado à virulência e de sensibilidade a antifúngicos da microbiota fúngica do hospital sob avaliação.

3 METODOLOGIA

O trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), no Laboratório de Microbiologia e Imunologia básicas em parceria com um hospital da cidade de Alfenas, Minas Gerais.

3.1 AMOSTRAS

Foram analisadas 70 amostras (8,96%) sugestivas de leveduras do gênero *Candida* spp, de um total de 781 amostras coletadas e isoladas em duas situações principais:

A. Colonização hospitalar: as coletas foram realizadas por amostragem do ar dos ambientes hospitalares, leitos, maçanetas de porta, interruptores, bandejas de preparo de medicamentos, estetoscópios, mãos e aventais (coletes) de funcionários e profissionais da saúde do Centro de Tratamento Intensivo Neonatal e Centro Cirúrgico. Foram coletadas 103 amostras e analisadas 45 amostras sugestivas de leveduras.

B. Infecção hospitalar: as amostras de hemoculturas negativas para presença de bactérias ou com indicação direta de candidemia e amostras de ponta de cateter foram analisadas. A candidemia foi definida como o isolamento de *Candida* spp em uma ou mais hemoculturas obtidas de veia periférica após 48 horas da admissão do paciente, conforme proposto por Garner et al. (1988). Foram obtidas 678 amostras e analisadas 25 sugestivas de leveduras. Estas amostras foram coletadas apenas após consentimento expresso do paciente ou responsável e ou do hospital (APÊNDICE A).

As amostras foram obtidas, semanalmente, durante os meses de Agosto/2009 a Junho/2010 e mantidas na Micoteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia básicas da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) a 4°C. Foram analisadas 25 amostras de *Candida* spp provenientes de fontes de infecção (hemocultura, ponta de cateter, escarro) e 45 amostras de *Candida* spp provenientes de fontes de colonização hospitalar (APÊNDICES B e C).

3.1.1 Dados sobre os pacientes: critérios de inclusão

O hospital atende a pacientes de diferentes faixas etárias, em todos os níveis de atendimento: berçário, clínica cirúrgica, clínica médica, maternidade, moléstias infecciosas, pediatria, pronto socorro, queimados, UTI adulto, UTI pediátrica, UTI neonatal, ortopedia e nefrologia. Como critério de inclusão adotou-se o diagnóstico de infecção hospitalar fúngica ou predisposição para este tipo de infecção durante a permanência no hospital.

3.1.2 Coleta das amostras

Amostras originadas de fontes de infecção hospitalar: As amostras de hemoculturas sem crescimento bacteriano após 7 dias de incubação, foram retiradas da ampola de hemocultura através da perfuração de sua tampa com auxílio de uma agulha e 150 µL foram semeados na superfície de agar Sabouraud. Nas amostras de ponta de cateter, colônias com morfologia sugestiva de leveduras foram retiradas de placas de Agar sangue após 24 horas de incubação e semeados na superfície de agar Sabouraud. A amostra de escarro foi semeada diretamente na superfície de agar Sabouraud.

Amostras originadas de fontes de colonização em ambiente hospitalar: As amostras de superfícies ambientais foram coletadas com *swabs* estéreis umedecido em solução fisiológica estéril suplementada com cloranfenicol 0,5 g/L e estes acondicionados em caldo BHI suplementado com cloranfenicol 0,5 g/L até transporte ao laboratório. Os *swabs* foram passados sobre as superfícies citadas por 3 vezes a cada 100 cm² e, após, acondicionados como citado acima. As amostras das mãos dos profissionais envolvidos com os pacientes foram coletadas com *swab* estéril umedecido em solução fisiológica suplementada com cloranfenicol 0,5 g/L e estes acondicionados em caldo BHI suplementado com cloranfenicol 0,5 g/L até transporte ao laboratório. Os *swabs* foram passados sobre as palmas e regiões interdigitais da mão direita dos mesmos. As amostras dos jalecos (coletes) dos profissionais foram coletadas pressionando placa de Petri de 4cm de diâmetro, contendo Agar BHI suplementado com cloranfenicol 0,5 g/L, sobre a frente do jaleco(colete) 5 cm acima

dos bolsos. As amostras isoladas do ambiente hospitalar e das mãos e jalecos(coletes) dos enfermeiros, médicos, técnicos e estagiários foram transportadas e processadas no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Básicas da UNIFAL-MG.

3.2 PROCESSAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os *swabs* em caldo BHI suplementado com cloranfenicol 0,5 g/L foram incubados em estufa a 37°C por 48 h. Após o período de 48 h, as amostras que apresentavam as características macroscópicas de leveduras foram isoladas em meio Agar Sabouraud dextrose suplementado com cloranfenicol 0,5 g/L e armazenadas a 4°C para posterior identificação.

3.2.1 Identificação

Realizou-se o teste de coloração de Gram para observação das características microscópicas das amostras. As culturas sugestivas para leveduras foram semeadas em Meio de cultura cromogênico Chromagar® *Candida* (Difco, EUA) para observação da pureza da colônia e avaliação das espécies pertencentes ao gênero *Candida* (TABELA 1 e FIGURA 3). Aliado a este teste, foram realizadas as análises macro e micromorfológicas, reprodutivas e fisiológicas, além do teste de fermentação de fontes de carbono (zimograma) e o teste de assimilação de fontes de carbono e de nitrogênio (auxanograma) para confirmação dos resultados obtidos em meio de cultura cromogênico (KURTZMAN; FELL, 1998). Para alguns isolados não identificados pelo métodos tradicional, foi realizada a identificação comercial através do “kit” comercial API 20C (Biomerieux, EUA) conforme instruções do fabricante.

Tabela 1. Coloração apresentada por diferentes espécies do gênero *Candida* semeadas em meio cromogênico Chromagar® *Candida*.

Levedura	Coloração típica da colônia
<i>Candida albicans</i>	Verde
<i>Candida krusei</i>	Rosa claro com bordas cotonosas
<i>Candida tropicalis</i>	Azul-acinzentado
<i>Candida glabrata</i>	Rosa, roxo
<i>Candida parapsilosis</i>	Rosa claro
<i>Candida</i> spp	Branco para rosa

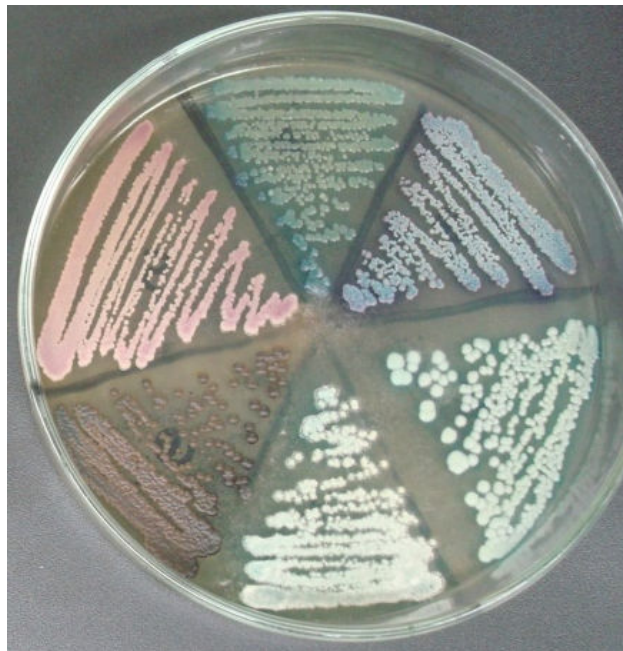


Figura 3. Avaliação do crescimento e análise das espécies de leveduras, isoladas do ambiente hospitalar, em meio de cultura cromogênico Chromagar *Candida*®.

3.3 IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA DE *Candida dubliniensis*

Existe um alto grau de similaridade fenotípica e genotípica entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Gales (1999) propôs uma metodologia indireta para identificar *C. dubliniensis*. Apesar de se observar uma diferença de tonalidade em sua cor, *C. dubliniensis* se apresenta com um verde mais escuro quando comparada à *C. albicans*, como apresentado na figura 4, mais há necessidade de técnica complementar pois, muitas vezes, esta cor não se mantém estável (KIRKPATRICK, W.R. et al., 1998). Todas as amostras identificadas como *C. albicans* foram cultivadas em meio Agar Sabouraud dextrose (Difco, EUA) por 24 horas e, após, novamente por mais 24 horas a 35° C em meio Agar Sabouraud dextrose para viabilização celular. Foram preparados inóculos na escala 2,0 de Mac Farland, os quais foram semeados na superfície do meio Agar Sabouraud dextrose e incubados a 45°C por 24 horas. *C. albicans* consegue se desenvolver, enquanto que *C. dubliniensis* tem seu crescimento inibido a esta temperatura.



Figura 4. Diferenças de tonalidade apresentadas por *C. albicans* (à esquerda) e *C. dubliniensis* (à direita) em Chromagar *Candida*[®].

3.4 PESQUISA DE FATORES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA DE *Candida spp*

3.4.1 Avaliação da capacidade de formação de biofilme

Os ensaios de formação de biofilmes por *Candida spp* foram desenvolvidos em placas de poliestireno de fundo chato com 96 poços para microtitulação, pré-esterilizadas, disponíveis comercialmente (FIGURA 4). Primeiramente, desenvolveu-se a etapa de sensibilização das placas, a qual consistiu na adição de 100µL de soro fetal humano em cada um dos poços, o qual permaneceu por 24 horas a 37°C. Após este intervalo, todo o soro foi removido cuidadosamente e 300 µL de suspensão celular, na escala 5,0 Mac Farland, em caldo YNB (Difco, EUA) suplementado com 100 mM de glicose, concentração recomendada por Ramage et al. (2001), foram adicionados nos poços previamente sensibilizados. As suspensões foram preparadas a partir de amostras subcultivadas, por 2 vezes em meio Agar Sabouraud dextrose, durante 24 horas. Após acréscimo dos inóculos, as placas foram incubadas por 72 h, a 37°C e sob agitação de 75 rpm. Posteriormente as suspensões celulares foram aspiradas e avaliou-se a presença ou ausência de biofilmes através de leituras espectrofotométricas a 405 nm (SHIN et al., 2002). As determinações de formação de biofilme foram realizadas em triplicatas com 2 blocos de repetições em dias diferentes e os resultados foram expressos a partir da média dos valores obtidos.

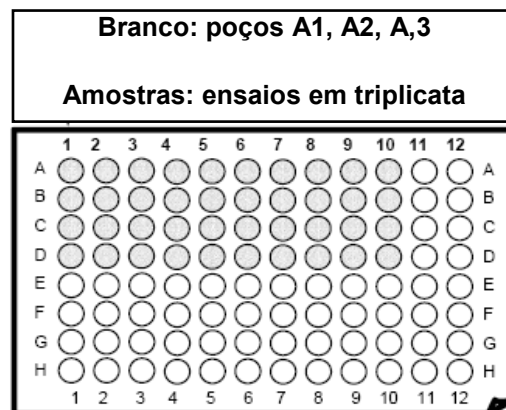


Figura 5. Representação esquemática do ensaio de formação de biofilme em placa de microtitulação de 96 poços, composta de poliestireno.

3.4.1.1 Quantificação da biomassa do biofilme

O sobrenadante foi retirado, a placa foi seca durante 15 minutos de exposição à temperatura ambiente e a formação de biofilme foi avaliada quantitativamente através do estabelecimento da densidade óptica a 405nm conforme proposto por Shin e colaboradores com algumas modificações (SHIN et al, 2002) .

3.4.2 Avaliação da viabilidade dos biofilmes formados por *Candida spp* por ensaio de redução do XTT

O método do XTT permite avaliar a atividade metabólica das células, sendo possível observar a ocorrência de um aumento da intensidade de atividade metabólica, com o crescimento do biofilme, devido ao aumento do número de células metabolicamente ativas. Com o método turbidimétrico não é possível distinguir a fase de maturação do biofilme porque este método quantifica toda a biomassa que constitui o biofilme.

O ensaio de redução do XTT (Sigma, EUA) foi realizado conforme proposto por Kuhn et al. (2002) e Ramage et al. (2001), porém com algumas modificações. Previamente, uma solução de XTT (Sigma, St. Louis, MO) a 1 mg/ml em solução PBS foi preparada, esterilizada por filtração e armazenada a -70°C. A solução de menadiona (Sigma, EUA) foi preparada, no momento do uso, a 0,4 mM. Antes de cada ensaio, a solução de XTT foi descongelada e misturada a uma proporção de 5 partes da solução de XTT para 1 parte à solução de menadiona para formar a solução reagente.

Os biofilmes, após a etapa final de formação, foram lidos a 490 nm, Após leitura espectrofotométrica, adicionaram-se, a cada poço (teste e controle), 200 µL de tampão PBS e mais 12 µL da solução reagente (XTT-menadiona), sendo a microplaca acondicionada ao abrigo da luz por 2 horas. Seguindo-se à etapa de incubação, 100 µL de solução presente nos poços foram transferidos para novos poços e a alteração de cor da solução foi medida espectrofotometricamente, a 490 nm, através da utilização de um leitor de microplacas (Anthos, Zenith 200 rt,

Cambridge, UK). A mudança na coloração, de incolor para diferentes tonalidades de cor laranja, é proporcional ao número de células vivas e pode ser quantificada, portanto, quanto maior a absorbância, maior o número de células metabolicamente ativas. Os valores de absorbância obtidos para os poços controle, nos quais a solução PBS-XTT-Menadiona permaneceu incolor, foram subtraídos dos valores dos poços teste (JIN et al., 2003). Os ensaios foram realizadas em triplicatas com 2 blocos de repetições em dias diferentes e os resultados foram expressos a partir da média dos valores obtidos.

3.4.3 Pesquisa de ação das hemolisinas sobre hemáceas

A atividade hemolítica de *Candida* spp foi pesquisada e analisada através da determinação da produção de hemolisinas segundo proposto por Luo; Samaranyake; Yau (2001) com algumas modificações. As amostras armazenadas foram repicadas de 24 em 24 horas por dois dias em meio Agar Sabouraud dextrose para viabilizar a amostra. Posteriormente, foram preparados inóculos de cada amostra comparáveis a escala 5,0 de Mac Farland. 2,0 µL de cada inóculo foi depositado em ponto previamente estabelecido na superfície do meio Agar Sangue de Carneiro (Oxoid, EUA) suplementado com 3% de glicose e composto de 7% de sangue de carneiro. A incubação ocorreu a 35° C por 24 horas, período após o qual, foi realizada a primeira leitura. Após 48, 72 e 96 horas foram realizadas as leituras subseqüentes. As atividades das hemolisinas foram classificadas conforme ausência de hemólise (atividade hemolítica do tipo γ), hemólise parcial (atividade hemolítica do tipo α) e hemólise total das hemácias (atividade hemolítica do tipo β). O isolado *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), possuidor de atividade hemolítica tipo β , foi utilizado como controle positivo. Os ensaios foram realizados em duplicata com 2 blocos de repetições em dias diferentes.

3.4.4 Teste de sensibilidade aos antifúngicos

3.4.4.1 Determinação da CIM dos antifúngicos por difusão em fita (Etest®- AB Biodisk, Solna, Suécia)

Os testes foram executados e interpretados conforme proposto no documento M44-A2 (CLSI, 2009), M27A3 (CLSI, 2008) e critérios do fabricante (AB BIODISK Solna, Suécia). Os isolados foram repicados de 24 em 24 horas por 2 dias a 35° C em meio Agar Sabouraud dextrose para viabilização celular. A partir do cultivo das amostras em Agar Sabouraud dextrose, preparou-se inóculo com turbidez de 0,5 na escala Mac Farland. O inóculo foi semeado no meio de cultura agar Mueller Hinton, suplementado com 0,5 µg/mL de azul de metileno. Após 15 minutos, as fitas plásticas, com gradiente definido e contínuo de antifúngicos, foram colocadas na superfície do meio de cultura e as placas incubadas a 37° C por 24 horas. Foram utilizadas fitas de Fluconazol, as quais apresentam gradiente de concentração correspondente a 0,016 a 256 µg/mL e de Anfotericina B, com gradiente de concentração de 0,002 a 32 µg/mL. A CIM foi estabelecida no ponto de intercepção do halo de inibição de crescimento com a fita graduada (FIGURA 5). As amostras padrões de *C. krusei* (ATCC 6258) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019) foram empregadas como controle. Os perfis de sensibilidade x resistência aos antifúngicos analisados foram interpretados conforme proposto no documento M27 A3 (CLSI, 2008) (QUADRO 2).

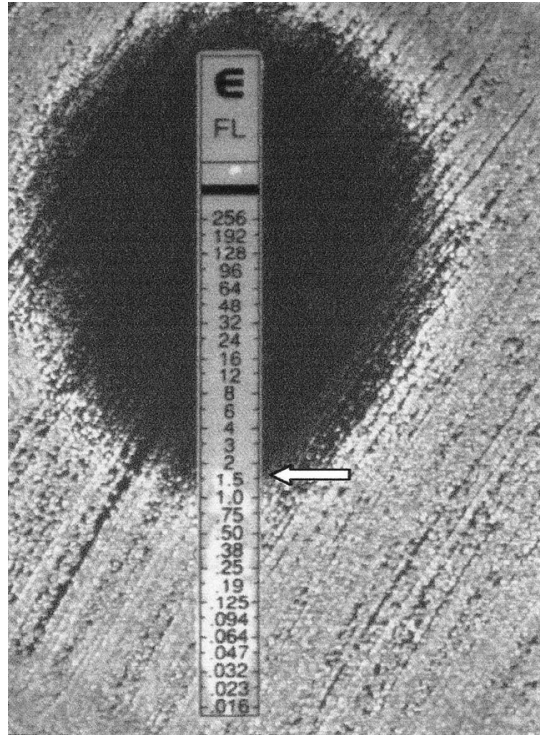


Figura 6. Esquema metodológico de interpretação da fita “Etest” com gradiente de droga antifúngica dado em $\mu\text{g/mL}$.

Quadro 2. Interpretação do perfil de sensibilidade antifúngica de amostras de *Candida* spp conforme valores apresentados de CIM frente a fluconazol e anfotericina B

Antifúngico ($\mu\text{g/mL}$)	Sensibilidade	Sensibilidade dependente da dose (SDD)	Resistência
Fluconazol	≤ 8	16-32	≥ 64
Anfotericina B	≤ 1	-	≥ 2

4 RESULTADOS

4.1 IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram analisadas 45 amostras de fontes decolonização e 25 amostras de fontes de infecção (hemocultura, ponta de cateter e escarro). Do total de amostras coletadas, 79 foram positivas para leveduras e distribuídas nos seguintes gêneros: 70 isolados de *Candida* spp, 04 isolados de *Cryptococcus* spp, 02 isolados de *Rhodotorula* spp, 03 isolados de *Malassezia* spp. Os resultados da identificação das espécies de *Candida* spp, pelos métodos tradicional e comercial, encontram-se dispostos nos Apêndices B e C.

4.2 DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES DE *Candida* spp

Foram isoladas 25 amostras de *Candida* spp oriundas de fontes de infecção e 45 amostras oriundas de fontes de colonização do ambiente hospitalar, no período de Agosto de 2009 a Junho de 2010. A distribuição das espécies encontra-se detalhada na Tabela 2 e 2.1, Figuras 6 e 7.

Tabela 2. Distribuição das amostras de *Candida* spp isoladas em fontes de infecção, de Agosto de 2009 a Junho de 2010.

Sítios de isolamentos das leveduras de fontes de infecção						
Espécies isoladas	Hemocultura		Ponta de cateter		Escarro	
	N	%	N	%	N	%
<i>Candida albicans</i>	1	1,42	6	8,52	1	1,42
<i>Candida ciferri</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Candida famata</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Candida guilliermondii</i>	1	1,42	-	-	-	-
<i>Candida krusei</i>	1	1,42	-	-	1	1,42
<i>Candida lusitaniae</i>	2	2,84	3	4,26	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	3	4,26	2	2,84	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	1	1,42	3	4,26	-	-

N = Número de amostras isoladas.

Tabela 3 Distribuição das amostras de *Candida* spp isoladas em fontes colonização de Agosto de 2009 Junho de 2010.

Local de isolamentos das leveduras de fontes de colonização														
Espécies isoladas	AA		BM		INT		JAL		LC		MP		MF	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>C. albicans</i>	1	1,42					3	4,26	1	1,42				
<i>C. ciferri</i>			1	1,42							2	2,84	1	1,42
<i>C. famata</i>	1	1,42			1	1,42								
<i>C. guilliermondii</i>							1	1,42						
<i>C. krusei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. lusitaniae</i>					4	5,68	6	8,52	1	1,42	2	2,84	3	4,26
<i>C. parapsilosis</i>					1	1,42	2	2,84			3	4,26		
<i>C. tropicalis</i>					3	4,26	3	4,26			4	5,68	1	1,42

AA-Ambiente hospitalar; BM-Bandeja de medicamentos; INT-Interruptores; JAL-Jalecos(Coletes); LC-Lençois; MP-Maçaneta de porta; MF-Mãos de Profissionais da saúde; N – Número de amostras isoladas.

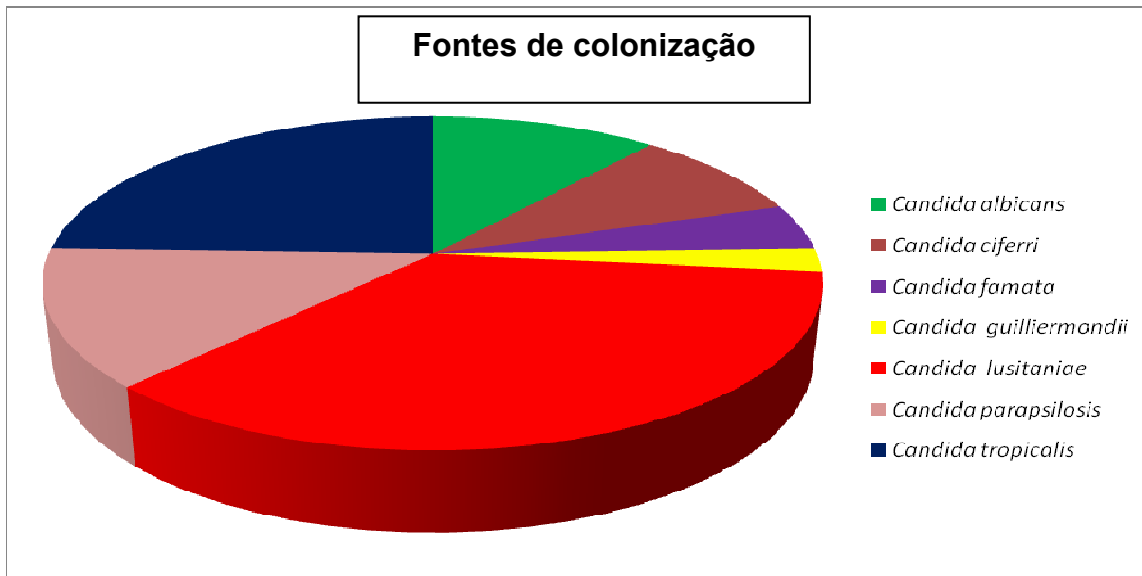


Figura 7. Distribuição das espécies de *Candida* spp oriundas de fontes de Colonização.

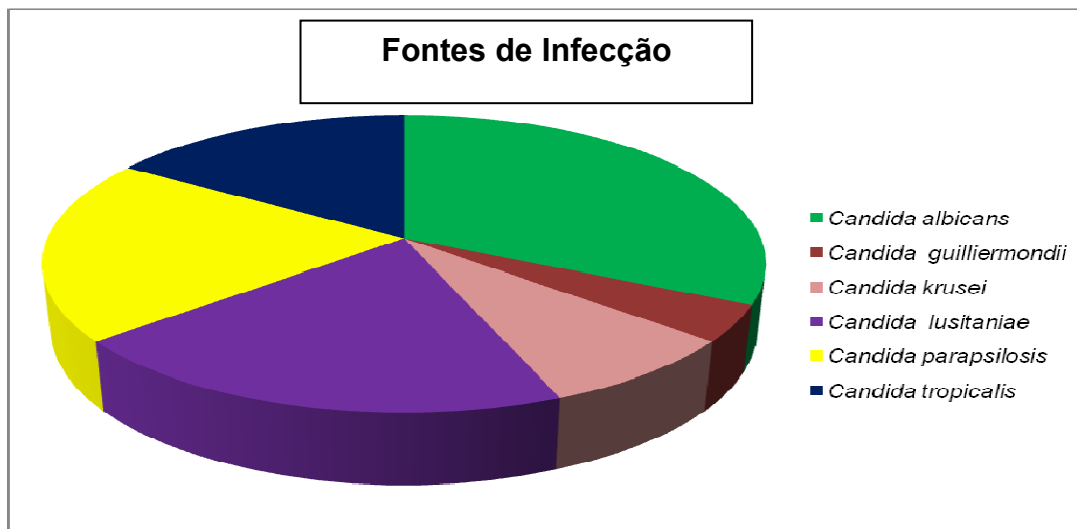


Figura 8. Distribuição das espécies de *Candida* spp oriundas de fontes de infecção.

4.2.1 Distribuição dos isolados das fontes de infecção

As amostras foram isoladas a partir de três fontes e suas distribuições estão dispostas na Tabela 3 e Figura 8.

Tabela 4. Fontes de infecção a partir das quais ocorreram isolamento de *Candida* spp

Origem do Material	N ^{o*}	%
Hemocultura	09	36,0
Ponta de Cateter	14	56,0
Escarro	02	8,0
TOTAL	25	100,0

*número de isolados positivos para *Candida* spp

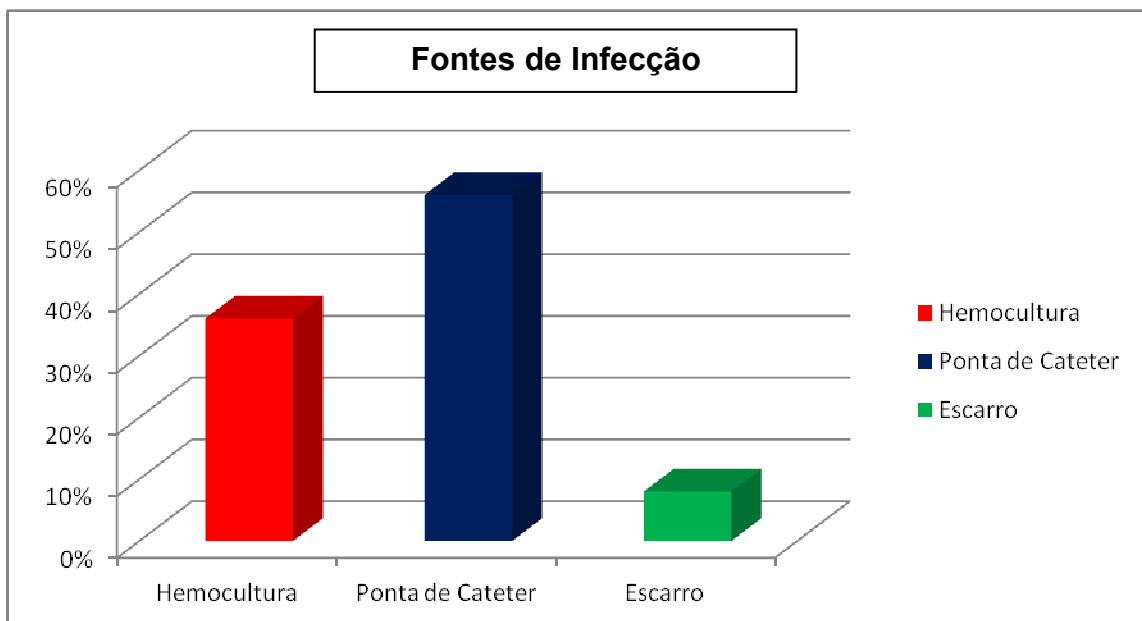


Figura 9. Distribuição das amostras de fontes de infecção de *Candida* spp quanto à fonte de isolamento.

4.2.2 DISTRIBUIÇÃO DOS ISOLADOS DE FONTES DE COLONIZAÇÃO

As amostras oriundas de colonização foram isoladas a partir de diversas fontes e estão dispostas na Tabela 4 e Figura 9.

Tabela 5. Fontes de colonização a partir das quais ocorreram isolamentos de *Candida* spp.

Setores de Coleta				
Local	CTI – Pediátrico		Centro Cirúrgico	
	Nº	%	Nº	%
Ar ambiente	2	8	0	0
Bandeja de preparo de medicamentos	1	4	0	0
Canto Interno de Incubadora sem paciente	0	0	0	0
Canto Interno de Incubadora com paciente	0	0	0	0
Interruptores	4	16	5	25
Jaleco de funcionário	6	24	9	45
Lençol de colchonete	2	8	0	0
Maçaneta de porta	5	20	6	30
Mão direita de funcionário	5	20	0	0
TOTAL	25	100	20	100

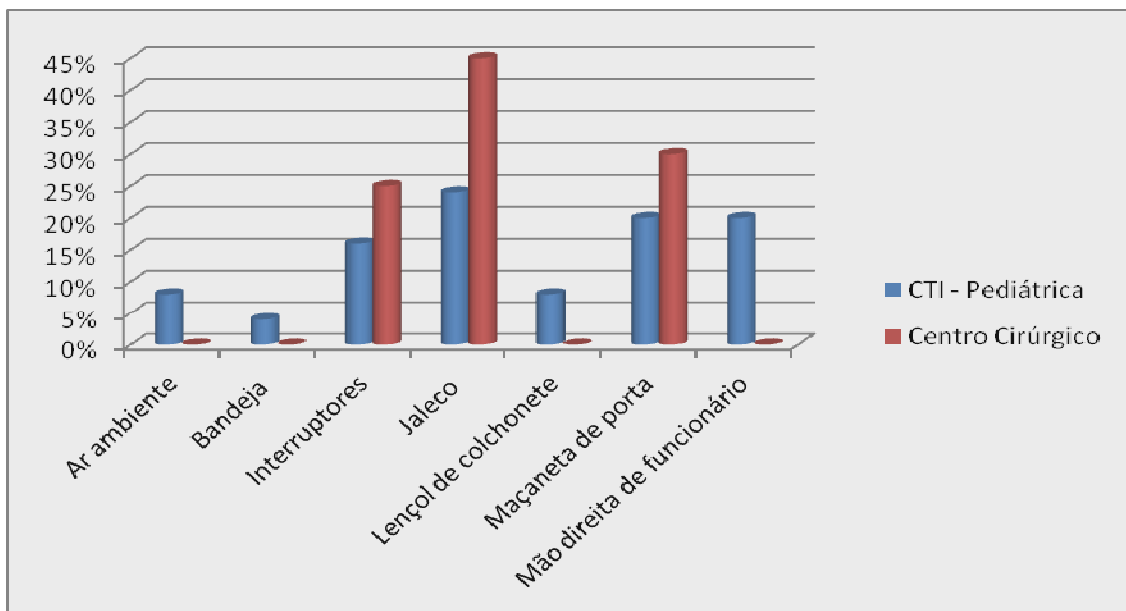


Figura 10. Distribuição das amostras de colonização de *Candida* spp quanto à fonte de isolamento.

4.2.3 Distribuição dos isolados *Candida albicans* x *Candida* não-*albicans*.

A comparação da distribuição dos isolados de *Candida albicans* e não-*albicans* encontra-se nas Tabelas 5 e 6, Figuras 10 e 11.

Tabela 6. Distribuição percentual de *Candida albicans* e *Candida* não-*albicans* em amostras de origem clínica.

Espécie	Hemocultura	Ponta de cateter	Escarro
<i>Candida albicans</i>	11,11%	50%	50%
<i>C. não-albicans</i>	88,89%	50%	50%

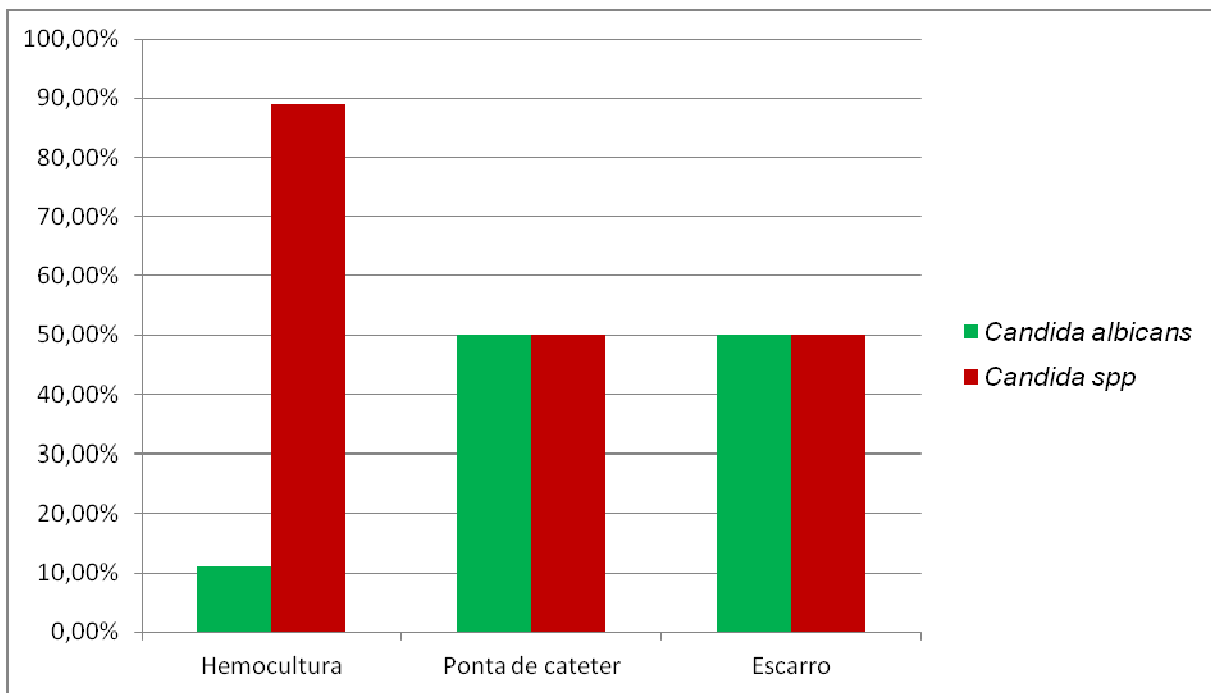


Figura 10. Comparação da distribuição de *Candida albicans* e *Candida* não-*albicans* em fontes de infecção..

Tabela 7. Distribuição percentual de *Candida albicans* e *Candida* não-*albicans* em amostras de colonização.

Espécie	Diversas fontes (%)
<i>Candida albicans</i>	8,89
<i>Candida</i> não- <i>albicans</i>	91,11

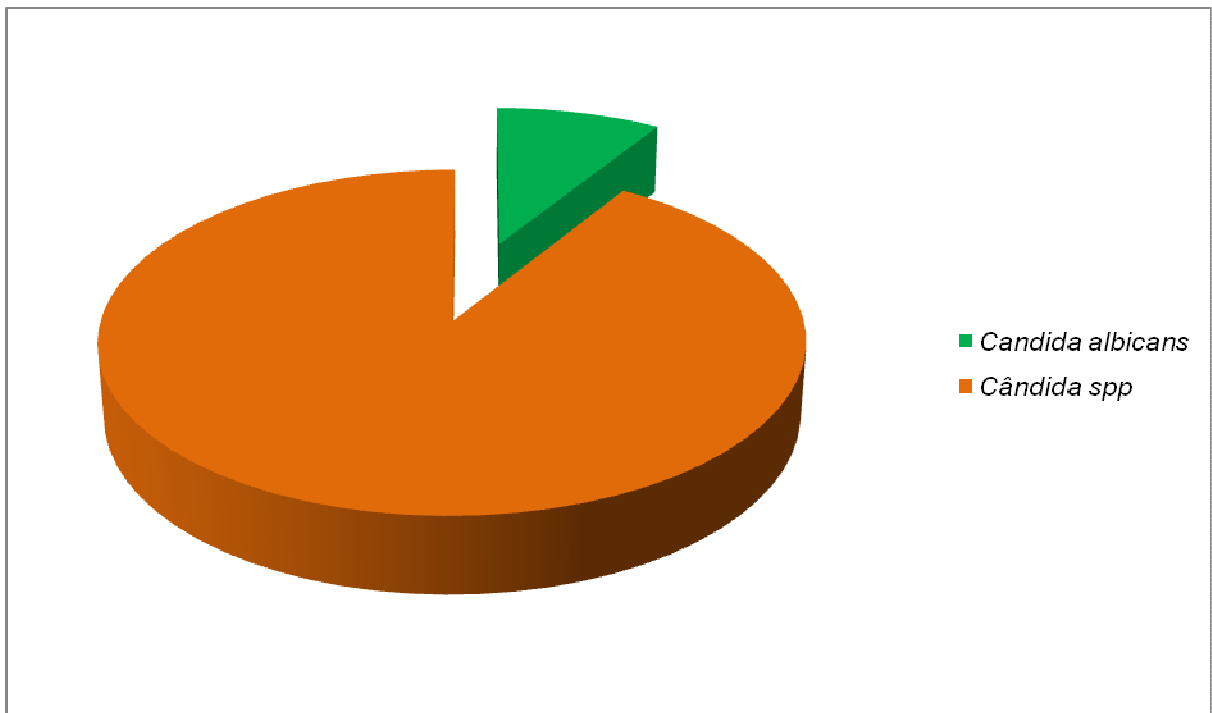


Figura 12. Comparação da distribuição de *Candida albicans* e *Candida* não-*albicans* em fontes de colonização do ambiente hospitalar.

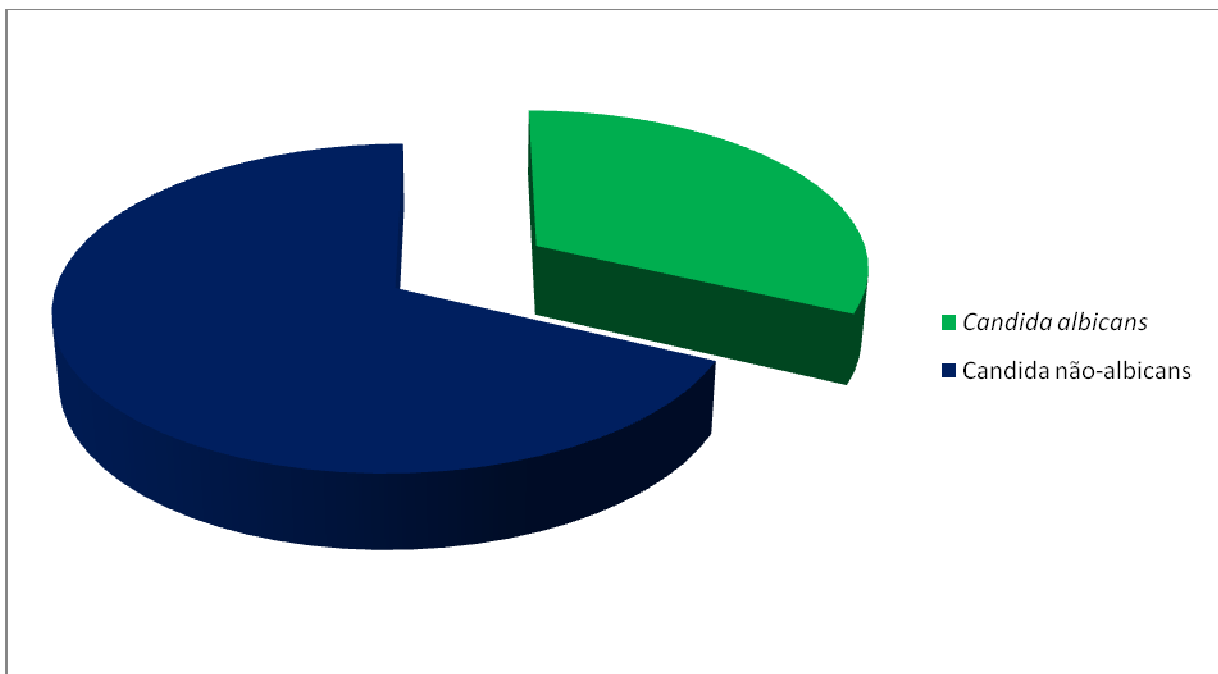


Figura 13. Comparação da distribuição de *Candida albicans* e *Candida* não-*albicans* em fontes de infecção.

4.3 IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA DE *Candida dubliniensis*

Todas as amostras classificadas como *C. albicans* foram confirmadas, não havendo a presença de *C. dubliniensis* dentre os isolados.

4.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DO BIOFILME

A avaliação da intensidade de produção de biofilme de acordo com a origem das espécies, ficou associado a um índice, que foi obtido relacionando a maior absorvância ao índice 100 e os demais foram encontrados por relação proporcional, sendo descritos da seguinte forma: Fracamente positivo (-) com índice < 5, positivo (+) com índice 5 a 40, positivo (++) com índice 41 a 70 e positivo (+++) com índice > 70 e encontra-se exposto na Tabela 8 e Figura 14.

Tabela 8. Avaliação da capacidade de produção de biofilme de acordo com a origem das espécies de *Candida* spp

Espécies	Fontes de Infecção*				Fontes de Colonização**			
	(-) ^a	(+) ^b	(++) ^c	(+++) ^d	(-) ^a	(+) ^b	(++) ^c	(+++) ^d
<i>C. albicans</i>	0	2	4	2	0	0	3	2
<i>C. ciferri</i>	0	0	0	0	0	0	3	1
<i>C. famata</i>	0	0	0	0	0	0	2	0
<i>C. guilliermondii</i>	0	0	1	0	0	0	1	0
<i>C. krusei</i>	0	0	0	2	0	0	0	0
<i>C. lusitaniae</i>	1	1	3	0	1	2	8	5
<i>C. parapsilosis</i>	0	1	1	3	0	1	1	4
<i>C. tropicalis</i>	0	0	1	3	0	0	4	7

*espécies oriundas de fontes de infecção (hemocultura, cateter e escarro); ** espécies oriundas de fontes de colonização (ambiente hospitalar; jaleco e mãos de funcionários); a: espécie com mínima capacidade de biofilme; b: espécie com baixa capacidade de formação de biofilme; c: espécie com capacidade intermediária de formação de biofilme; d: espécie com elevada capacidade de formação de biofilme.

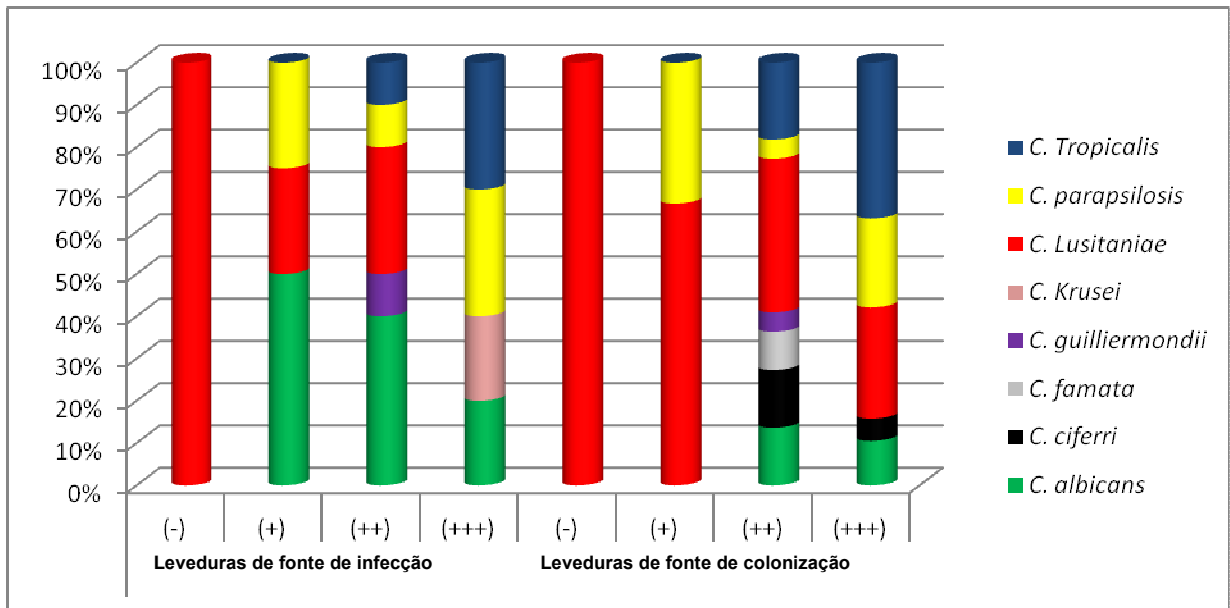


Figura 14. Distribuição das espécies de *Candida* spp quanto à intensidade de produção de biofilme de acordo com a fonte de origem.

4.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DOS BIOFILMES

A determinação da quantidade de células viáveis no interior do biofilme maduro, através da avaliação da atividade metabólica utilizando técnica colorimétrica de redução do XTT encontra-se nas Tabelas 8 e 9. Estabeleceu-se valor igual a 100 para o maior valor de absorbância obtido. O valor 100 corresponde ao isolado com maior atividade metabólica do biofilme. A atividade metabólica dos outros isolados foi determinada a partir da relação com o maior valor de absorbância obtido, sendo classificada em três grupos: atividade metabólica baixa (< 25), moderada (entre 25-50), alta (>51). Nas tabelas 7 e 8 pode se observar a correlação entre intensidade de produção de biofilme e atividade metabólica das leveduras quanto à sua origem.

Tabela 9. Correlação entre a intensidade de produção de biofilme e atividade metabólica nas leveduras de *Candida* spp provenientes de fontes de infecção.

Leveduras de fontes de Infecção												
Biofilme	Fracamente Positivo (-)			Positivo(+)			Positivo(++)			Positivo(+++)		
Atividade Metabólica	< 25	25-50	> 51	< 25	25-50	> 51	< 25	25-50	> 51	< 25	25-50	> 51
<i>C.albicans</i>				1	2		2	1		1	1	
<i>C.ciferri</i>												
<i>C. famata</i>												
<i>C.guillermundii</i>									1			
<i>C. krusei</i>											1	1
<i>C. lusitaniae</i>		1			2			1	2			
<i>C. parapsilosis</i>									2		2	
<i>C. tropicalis</i>							1			2	1	

Tabela 10. Correlação entre a intensidade de produção de biofilme e atividade metabólica nas leveduras de *Candida* spp de fontes de colonização.

Leveduras de fontes de colonização												
Biofilme	Fracamente Positivo (-)			Positivo(+)			Positivo(++)			Positivo(+++)		
Atividade Metabólica	< 25	25-50	> 51	< 25	25-50	> 51	< 25	25-50	> 51	< 25	25-50	> 51
<i>C.albicans</i>							2	1		2		
<i>C.ciferri</i>								1	2		1	
<i>C. famata</i>								1	1			
<i>C.guillermundii</i>									1			
<i>C. krusei</i>												
<i>C. lusitaniae</i>	1	1			1			3	4		2	3
<i>C. parapsilosis</i>					1				1		3	2
<i>C. tropicalis</i>							2	2		4	2	1

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

O perfil hemolítico das 70 amostras de *Candida* spp encontra-se descrito no Quadro 3 e Figuras 14 e 15. A representação esquemática do teste encontra-se na Figura 16.

Quadro 3. Perfil de atividade hemolítica entre as diferentes espécies de *Candida* spp isoladas de fontes de infecção e colonização hospitalares

Espécie	Colonização			Infecção		
	Hemólise			Hemólise		
	α	β	γ	α	β	γ
<i>Candida albicans</i>	2	1	2	3	5	0
<i>Candida ciferri</i>	1	0	3	0	0	0
<i>Candida famata</i>	0	1	1	0	0	0
<i>Candida guilliermondii</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Candida krusei</i>	0	0	0	1	0	1
<i>Candida lusitaniae</i>	3	1	12	1	0	4
<i>Candida parapsilosis</i>	0	1	5	2	1	2
<i>Candida tropicalis</i>	1	2	8	1	2	1

α -Atividade hemolítica parcial; β -Atividade hemolítica total; γ -Ausência de atividade hemolítica

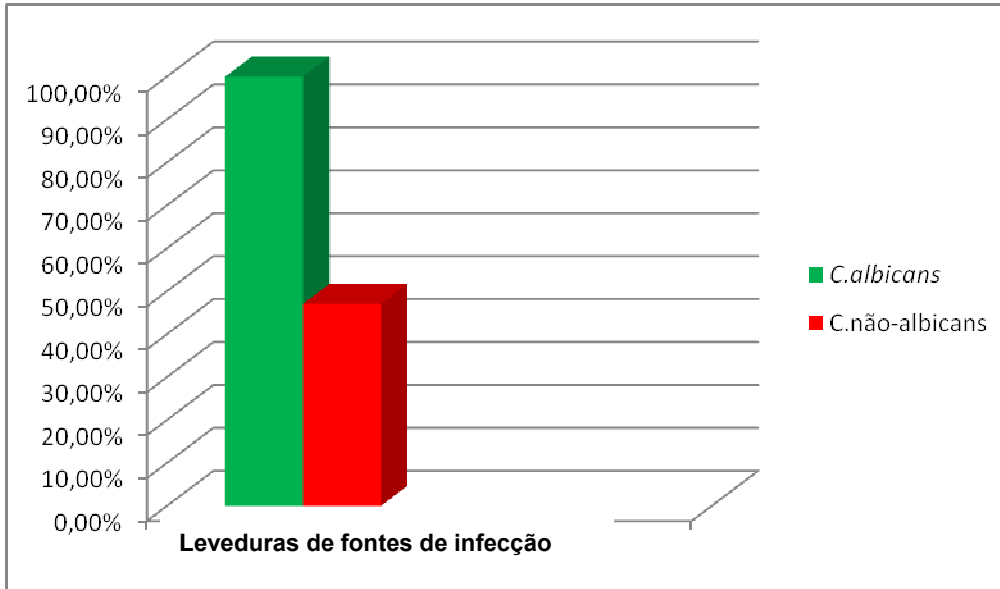


Figura 15. Distribuição percentual das leveduras *C. albicans* e não-*albicans*, das leveduras de fontes de infecção, produtoras de hemolisinas.

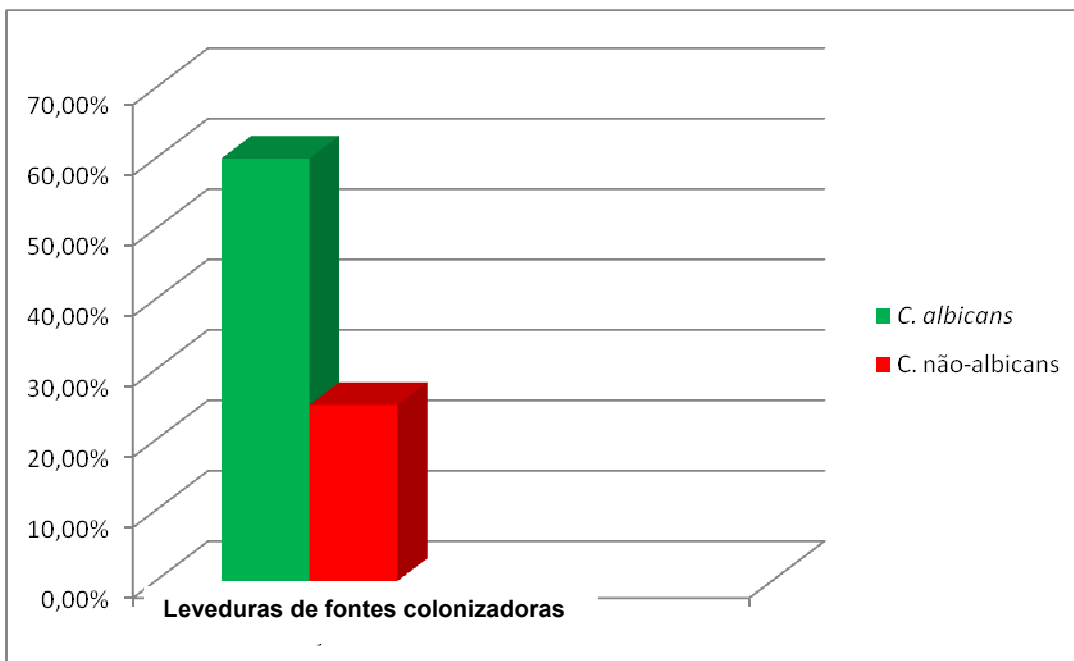


Figura 16. Distribuição das leveduras *C. albicans* e não-*albicans*, provenientes de fontes de colonização, produtoras de hemolisinas.

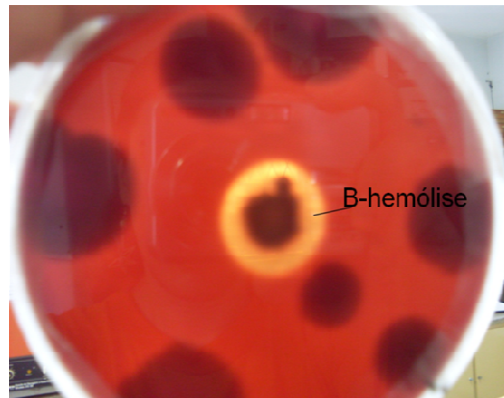


Figura 17. Halo de hemólise de *Candida* spp em meio de cultura Agar sangue de carneiro.

4.7 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE A DROGAS ANTIFÚNGICAS

As leituras do desempenho das leveduras frente aos antifúngicos anfotericina B e fluconazol, através da metodologia “E test”, foram analisadas após 24 e 48 horas (FIGURA 17). Os valores de inibição de 80% do crescimento (IC80) para a droga azólica fluconazol e de 100% do crescimento para a droga poliênica anfotericina B (IC100) encontram-se detalhados no Apêndice B e C. Os perfis de sensibilidade antifúngica e os valores de concentração inibitória mínima (CIM) encontram-se nas Tabelas 10 e 11, respectivamente.

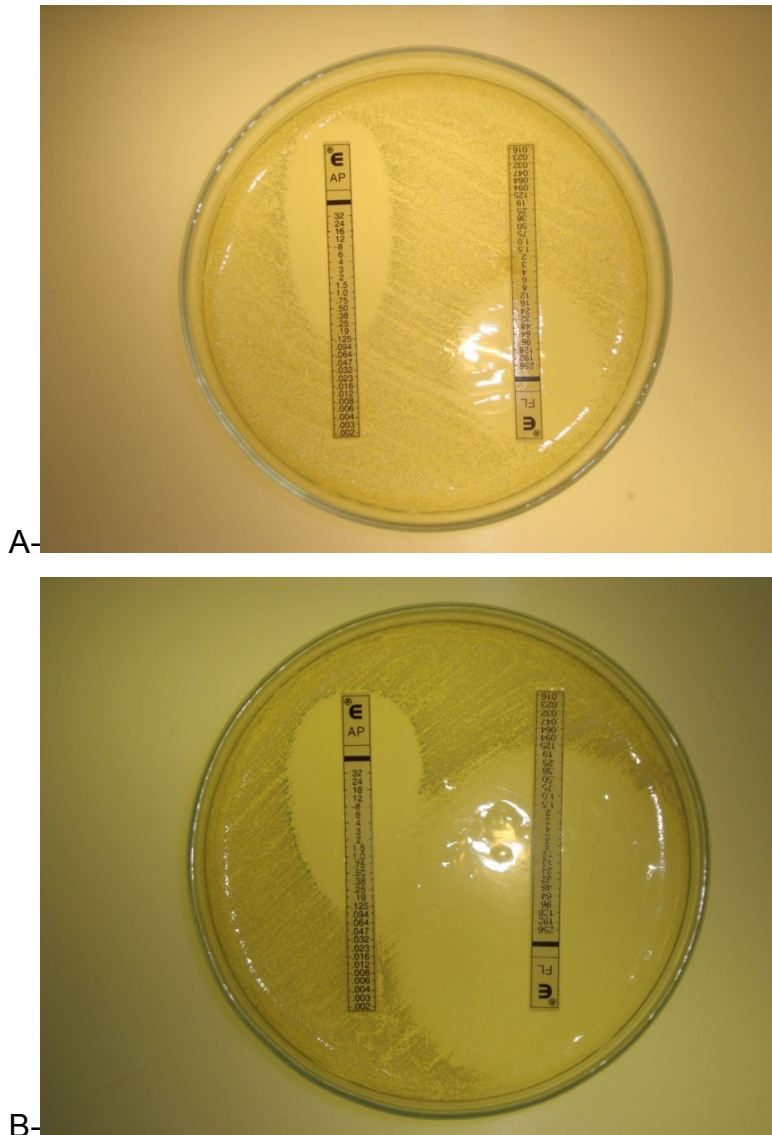


Figura 18. A e B: Avaliação da sensibilidade aos antifúngicos através da metodologia de difusão em teste “E test”.

Tabela 11. Perfil de sensibilidade *in vitro* das espécies de *Candida* spp frente aos antifúngicos anfotericina B e fluconazol.

Antifúngico	Sensibilidade	Resistência Intermediária	Resistência
Anfotericina B	100,00%	-	-
Fluconazol	98,57%	1,43%*	-

**Candida parapsilosis* (amostra 210) isolada de hemocultura.

Tabela 12. Concentração inibitória mínima do crescimento *in vitro* de 50% (CIM50) e 90% (CIM90) dos 70 isolados de *Candida* spp.

Espécies (n° de Isolados) Drogas antifúngicas		CIM E test (µg/mL)		
		Varição da CIM	CIM 50	CIM 90
<i>C. albicans</i>	(13)			
	Anfotericina B	0,047-0,190	0,0690	0,1218
	Fluconazol	0,047-1,500	0,1350	1,0600
<i>C. ciferri</i>	(04)			
	Anfotericina B	0,250-0,500	0,3800	0,2550
	Fluconazol	0,250-1,500	0,2500	0,6000
<i>C. famata</i>	(02)			
	Anfotericina B	0,190-0,190	0,0950	0,1710
	Fluconazol	0,500-0,500	0,2500	0,4950
<i>C. guilliermondii</i>	(02)			
	Anfotericina B	0,190-0,380	0,1900	0,3420
	Fluconazol	0,750-1,500	0,7500	1,3500
<i>C. krusei</i>	(02)			
	Anfotericina B	0,125-0,125	0,0625	0,1125
	Fluconazol	0,380-2,000	0,3800	0,6840
<i>C. lusitaniae</i>	(21)			
	Anfotericina B	0,094-0,380	0,1230	0,2110
	Fluconazol	0,094-6,000	0,1230	3,9790
<i>C. parapsilosis</i>	(11)			
	Anfotericina B	0,094-0,500	0,0780	0,1881
	Fluconazol	0,094-12,00	1,6500	4,4000
<i>C. tropicalis</i>	(15)			
	Anfotericina B	0,064-0,500	0,0938	0,1970
	Fluconazol	0,094-8,000	0,4687	2,0770

5 DISCUSSÃO

5.1 DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES *C. albicans* e não-*albicans*

Neste estudo foram analisadas 70 amostras (8,93%) de *Candida* spp coletadas em hospital de médio porte na cidade de Alfenas-MG, destas 25 amostras foram isoladas de possíveis fontes de infecção hospitalar (Hemocultura, ponta de cateter e escarro) e as outras 45 amostras são provenientes de colonização hospitalar, tanto ambiental (ar e superfícies) quanto da vestimenta e mãos de funcionários da saúde que têm contato direto e ou indireto com os pacientes, índice semelhante (9,85%) ao encontrado por Khouri (2010). A comparação entre a distribuição das espécies e fatores associados à virulência dos isolados de colonização e de infecção hospitalar foram os principais alvos deste trabalho.

Candida albicans (32%) foi a espécie mais comum dentre os isolados provenientes de fontes de infecção hospitalar, seguida de *C. lusitaniae* (20%) e *C. parapsilosis* (20%), *C. tropicalis* (16%), *C. Krusei* (8%) e *C. guilliermondii* (4%). Por outro lado, esta predominância dentre as não-*albicans* de *C. lusitaniae* não é conhecida, no entanto os altos índices de isolamento das espécies não-*albicans* *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* estão semelhantes a outros estudos brasileiros (FRANÇA et al. 2008, AQUINO et al. 2005). Esta inversão de distribuição, com predomínio das espécies não-*albicans* é fato que tem sido relatado em diversos trabalhos (OSORIO et al., 2008; PAPPAS et al., 2003). Neste estudo a prevalência das espécies não-*albicans* foi de 68%, índice superior aos apresentados em estudos citados (FRANÇA et al. 2008, AQUINO et al. 2005), mais semelhantes aos encontrados por Paula et al 2007, com índice de 69,14%. Se analisarmos isoladamente as fontes das quais nossas amostras foram isoladas, notaremos uma diferença ainda maior nos isolados originários das hemoculturas chegando ao predomínio de 88,89% de espécies não-*albicans*, mas este índice extremamente alto contradiz algumas pesquisas que têm sido desenvolvidas (COLOMBO, GUIMARÃES, 2003; HEIRICHSEN et al. 2008) nas quais relata-se a predominância de espécies não- *albicans* com índices 71% em casos de infecção. Em nossa pesquisa, *C. albicans* teve prevalência em apenas 11,11% dos isolados. Nos isolados de ponta de cateter e escarro houve distribuição

equilibrada, com 50% para as não-*albicans* e 50% para *Candida albicans*, dados estes contrários aos encontrados por Mesiano, Merchán-Hamann, 2007 para ponta de cateter e Furlaneto-Maia et al 2007 para escarro, que em suas pesquisas encontraram predomínio de *C.albicans*.

Nos últimos anos verifica-se um aumento no número de infecções causadas por espécies de *Candida* não-*albicans*, fato bastante preocupante já que estas espécies não apresentam perfis de sensibilidade aos antifúngicos bem como fatores de virulência, totalmente elucidados. *C. parapsilosis* é considerada a espécie não-*albicans* mais comum nos hospitais da América do Sul enquanto na América do Norte verifica-se prevalência de *C. glabrata*. (SILVA, 2007).

Nos isolados provenientes de fontes de colonização, as espécies não-*albicans* predominaram com 88,89% dos isolados distribuídos da seguinte forma: *C. lusitaniae* (24,44%) e *C. tropicalis* (24,44%), *C. parapsilosis* (13,31%), *C. ciferri* (8,89%), *C. famata* (4,45%), *C. guillermondii* (2,25%) e apenas 11,11% para os isolados de *C. albicans*.

Em relação às fontes das quais os isolados de colonização foram coletados, no CTI Pediátrico houve a distribuição de ar ambiente (8%), bandeja de preparação (4%), interruptores (16%), jalecos (24%), lençóis (8%), maçanetas (20%) e mãos de profissionais do setor (20%). Esta distribuição é extremamente preocupante, pois pode se observar que 80% das leveduras encontradas estão direta ou indiretamente passando pelas mãos dos profissionais; mão no interruptor, mão na maçaneta; mão no jaleco. Na literatura, os dados de leveduras encontradas nas mãos de profissionais de saúde são bastante díspares, encontrando-se desde ausência a índices que variam de 17 a 80% (MARTINS-DINIZ, 2005). É consenso que medidas gerais de controle têm como objetivo principal evitar a disseminação de microrganismos através dos profissionais de saúde e visitantes. Esses cuidados devem ser incorporados nas atitudes dos profissionais para não se acarretar mais um problema ao paciente.

De acordo com os dados obtidos não podemos afirmar o sentido em que ocorre a contaminação, se é das mãos para interruptores, maçanetas e jaleco ou se em sentido contrário, mas podemos afirmar que as técnicas básicas de prevenção de infecção hospitalar não estão sendo realizadas adequadamente. Segundo Hota

(2004) o simples ato de higienizar as mãos pode reduzir a transmissão cruzada de leveduras. Passos et al. (2005) afirmam que mãos de profissionais colonizadas com leveduras podem servir como fonte de infecções, através da translocação do microrganismo para os pacientes pela própria manipulação ou por contaminar superfície de cateteres.

Nos isolados encontrados no centro cirúrgico, a distribuição seguiu a seguinte proporção: interruptores (25%), jalecos (45%) e maçanetas (30%). Nas mãos de profissionais do setor não foram encontradas leveduras, talvez pelo rigor na higienização das mãos que é exigido dos profissionais deste setor em situações pré-cirúrgicas.

Ao observarmos as leveduras predominantes em fontes de colonização, *C. lusitaniae* (24,44%), *C. tropicalis* (24,44%) e *C. parapsilosis* (13,31%) e compararmos com as leveduras encontradas com maior frequência em fontes de infecção nota-se que dentre as leveduras não-*albicans* há também o predomínio de *C. lusitaniae* (20%), *C. parapsilosis* (20%) e *C. tropicalis* (16%). Esta análise demonstra a elevada possibilidade de as leveduras colonizantes serem as mesmas que contaminam pacientes e causam infecções hospitalares, embora a certeza desta afirmativa só poder ser estabelecida após análises genotípicas associadas aos resultados de avaliações fenotípicas como as que foram realizadas nesta pesquisa e seguem-se abaixo.

Foi detectada grande disseminação de leveduras do gênero *Candida* em todo ambiente hospitalar, além de uma contaminação elevada das mãos e jalecos dos profissionais envolvidos com os pacientes. Esse elevado índice de colonização pode estar intimamente relacionado com a instalação da infecção, que por sua vez, relaciona-se com os altos índices de morbidade, mortalidade e altos custos hospitalares.

5.2 CAPACIDADE HEMOLÍTICA

A capacidade dos microrganismos patogênicos em produzir exoenzimas hemolíticas é notadamente comprovada. A observação de espécies de *Candida* spp capazes de produzir hemolisinas *in vitro* nos fornece uma provável correlação com

seus potenciais de virulência e talvez também estejam associadas à disseminação das mesmas nos hospedeiros. As hemolisinas permitem aos microrganismos a utilização de hemoglobina como fonte de ferro (MANNS; MOSSER; BUCKLEY, 1994) e esta necessidade de captação deste metal pode estar diretamente associada à instalação da infecção (BULLEN, 1981; OTTO; VERWEIJ-VAN VUGHT; MACLAREN, 1992). Apesar de pouco estudadas, Bonassoli; Bertoli; Svidzinski (2005) demonstram que espécies de *Candida* podem expressar hemolisinas além de outras exoenzimas. As hemolisinas produzidas pelas espécies de *Candida* podem ser de um ou mais tipos e a atividade enzimática pode sofrer variações de acordo com a espécie (LUO; SAMARANAYAKE; YAU, 2001).

Neste trabalho foi possível observar uma diferença na produção de hemolisinas pelas leveduras quando relacionadas às fontes de isolamento (colonização e Infecção) . Luo et al. (2001) relatam que diferenças de atividades hemolíticas podem ocorrer entre isolados de colonização e infecção. As leveduras provenientes de fontes de infecção apresentaram um índice hemolítico de 64% enquanto as amostras de fontes de colonização obtiveram positividade em apenas 16%. Nos isolados de fontes de infecção, *C. albicans* apresentou 100% de positividade para hemólise, resultados compatíveis aos encontrados por Negri et al (2010), seguidas de *C. tropicalis* (75%) índices também similares aos encontrados por França et al (2010), *C. parapsilosis* (60%), *C. krusei* (50%) e *C. guilliermondii* não apresentou atividade hemolítica. As amostras isoladas em sítios de colonização apresentaram uma distribuição distinta, sendo 75% das *C. albicans* positivas para o teste de hemólise seguidas de *C. famata* (50%), *C. tropicalis* (33,33%) *C. ciferri* (25%), *C. lusitaniae* (25%), *C. parapsilosis* (16,66%) e *C. guilliermondii* não apresentou capacidade de hemólise. Estes dados nos permitem inferir que a produção de hemolisinas não está associada somente a estas exoenzimas conforme já fora demonstrado por Bonassoli (2005). Em estudo realizado por França et al. (2010) do total de 28 isolados de *C. tropicalis* analisados, 100% promoveram hemólise em meio Sabouraud suplementado com 7% de sangue de carneiro. Deste total, 40% dos isolados de sangue e 16,7% de isolados de outras fontes clínicas apresentaram baixa atividade hemolítica, com exceção aos isolados de secreção traqueal, os quais apresentaram os maiores níveis de hemólise.

Em nosso estudo, as hemólises apresentaram um padrão de homogeneidade na maioria dos isolados, os quais apresentaram atividade hemolítica total ou parcial. Em 2 amostras (389 e a 221-V) provenientes de fontes de infecção não se observou capacidade hemolítica quando crescidas distantes do microrganismo *S. aureus*, empregado como padrão de atividade hemolítica, mas quando crescidas a uma distância inferior a 1,5 cm de *S. aureus*, houve considerável atividade hemolítica observada a partir da formação de grande halo de hemólise ligado ao halo formado pela bactéria padrão. Este fato releva a preocupação de co-infecções microbianas e sugere a necessidade de avaliações de perfis de virulência de microrganismos tanto em comunidades de mesma espécie quanto a expressão destes mesmos fatores em comunidades constituídas por gêneros, espécies e grupamentos microbianos distintos.

5.3 FORMAÇÃO E VIABILIDADE DE BIOFILMES

Em relação à capacidade de formação do biofilme, Douglas (2003) em seu trabalho informa que está esta diretamente associada à virulência microbiana ¹, uma vez que, biofilmes são intrinsecamente resistentes às drogas antifúngicas, incluindo Anfotericina B e Fluconazol (BACHMANN et al., 2003), podendo contribuir para patogênese de candidíase sistêmica e superficial (HASAN et al., 2009), sendo claramente mais resistentes do que as células planctônicas (DONLAN; COSTERTON, 2002). Tais características fazem com seja difícil a remoção e ou a destruição do microrganismo tanto em casos de colonização ambiental quanto em casos de infecção, levando assim a um aumento das taxas de morbi-mortalidade associados a estes agentes microbianos.

Nos isolados encontrados 97,15%, das amostras encontradas nas duas fontes relacionadas apresentaram potencial para formar biofilmes (PB). Nas espécies de *C. albicans*, tanto de fontes de infecção, quanto de fontes de colonização 100% dos isolados apresentaram PB com diferentes intensidades de biomassa (IB), nos isolados de ponta de cateter 1,42% apresentaram baixa IB (+), 4,26% apresentaram IB moderada (++) e 2,84% apresentaram elevada IB (+++), nas amostras originadas de hemocultura e escarro 1,42% apresentaram IB moderada

(++), já nas fontes de colonização as 1,42% das *C. albicans* originadas de lençol e ar ambiente apresentaram IB (++) , enquanto que 2,84% e 1,42% das amostras vindas de jalecos apresentaram IB (++) e elevada (+++) respectivamente. Para as espécies não-*albicans* de fontes de infecção e colonização, 94,12% e 96,5%, respectivamente, apresentaram PB. Dos isolados de fontes de infecção, relacionando com suas origens, com seus índices e seus respectivos IB, em hemoculturas : *C. tropicalis* (1,42%/+++), *C. parapsilosis* (2,84%/+++, 1,42%/+), *C. krusei* (1,42%/++), *C. guilliermondii* (1,42%/++) e *C. lusitaniae* (1,42%/++,1,42%/-), nos isolados originados de ponta de cateter *C.tropicalis* (2,84%/+++ , 1,42%/++), *C. lusitaniae* (1,42%/+ , 1,42%/++,1,42%/+++) e *C. parapsilosis* (1,42%/++,1,42%/+++), enquanto que para escarro *C.krusei* (1,42%/+++). Dentre as espécies não-*albicans* 51,42% dos isolados de fontes de colonização demonstraram capacidade para formar biofilme de IB (++) e (+++), *C. tropicalis* foi a espécie que mais apresentou IB elevada (+++) nos diversos locais de isolamento; nos jalecos, maçaneta de porta, interruptores e mão de profissionais da saúde, dado este preocupante pois já se reconhece estes locais como reservatórios ambientais e com IB elevado, esta espécie está criando condições para sobreviver mesmo na presença de antifúngicos. *C. lusitaniae* apresentou uma variação na IB associada ao local de isolamento, dos isolados de jaleco 7,1% apresentaram IB (+++) e apenas 2,84% IB (+), 2,84% dos isolados de maçaneta de porta obtiveram IB (+++) e 1,42% IB (++) , nos interruptores 2,84% apresentaram IB (+++) e 1,42% IB (++) , nas amostras oriundas das mãos de profissionais de saúde e 1,42% obtiveram IB (+) e (-) , com 1,42% IB (++) , 1,42% com IB (++) em isolado de lençol. *C. parapsilosis* 7,1% apresentaram IB (+++) em jaleco, maçanetas de portas e interruptores, apenas 1,42%, de outra linhagem, dos isolados, em maçaneta de porta, apresentaram IB (+). *C. famata* nos isolados de ar ambiente (1,42%) e interruptor (1,42%) apresentaram IB (++) . *C. ciferri* de isolados de maçaneta de porta 1,42%, bandeja de medicamentos (1,42%) e mão de profissionais da saúde (1,42%) apresentaram IB (++) e IB (+++) em amostras originadas de maçaneta de porta. *C. guilliermondii* isolado de jaleco apresentou IB (++) . Os locais nos quais foram isoladas leveduras com as maiores produções de biofilmes em ordem crescente foram: Interruptores, maçanetas de porta, jalecos e

mãos de profissionais da saúde e as espécies predominantes nestes locais foram: *C. lusitaniae*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*.

A medida da atividade metabólica (AM) é uma forma de se obter indiretamente a quantidade de células viáveis existentes no interior da biomassa do biofilme maduro intacto, sem alterar a sua estrutura (KUHNS et al., 2003). Bachmann et al. (2003) afirma em seu trabalho que o biofilme é intrinsicamente resistente aos antifúngicos Anfotericina B e Fluconazol. Hawser (1996) mostra que a medida colorimétrica da atividade metabólica pelo XTT está diretamente relacionado com o número de células viáveis, com estas informações podemos concluir que quanto maior a biomassa do biofilme e mais alta o número de células viáveis, maior a propensão de falha terapêutica.

Neste estudo, 100% das leveduras *C. albicans*, de ambas as fontes de isolamentos, apresentaram potencial para desenvolver biofilmes com intensidades diferentes, mais apresentaram AM baixa em 5,68% dos isolados de fontes de infecção contra 5,68% dos isolados de fontes de colonização. 5,68% dos isolados de fontes de infecção apresentaram AM moderada, contra 1,42% dos isolados de fontes de colonização tendo com isso menor propensão a falha terapêutica (BACHMANN et al., 2003; KUHNS et al., 2003). As relações entre IB no biofilme e AM para as espécies não-albicans originadas de fontes de infecções são: *C. guilliermondi* 1,42% (++)/alta); *C. krusei* 1,42% (+++)/alta) e 1,42% (++)/moderada); *C. lusitaniae* 1,42% (-)/moderada), 2,84% (+)/moderada), 1,42% (++)/moderado) e 2,84% (++)/alta); *C. parapsilosis* 2,84% (++)/alta) e 2,84% (++)/moderada); *C. tropicalis* 1,42% (++)/baixa), 2,84% (+++)/baixa) e 1,42% (+++)/moderada). Com estes dados podemos concluir que as espécies de *C. tropicalis*, apesar de ter uma produção de biomassa considerável em biofilme, seu número de células viáveis é baixo, o que pode ser verificado através da baixa atividade metabólica, podendo haver propensão menor em ter falha na terapêutica (BACHMANN et al., 2003; KUHNS et al., 2003). A situação é contrária em relação a linhagens, com origem em hemoculturas, tais como *C. guilliermondi*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* e *C. parapsilosis*, linhagens estas que tiveram origem em ponta de cateter, tais, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* que apresentaram biofilmes com intensidades variáveis mas com elevada atividade metabólica e conseqüentemente número de

células viáveis também elevado, podendo ter dificuldades em responder ao tratamento com os antifúngicos (BACHMANN et al., 2003; KUHN et al., 2003). Ficaram assim distribuídas as leveduras quando se associa o IB com AM das amostras originárias em fontes de colonização: *C. ciferri* 1,42% (++/moderada), 2,84% (++/alta), 1,42% (+++/moderada); *C. famata* 1,42% (++/moderada), 1,42% (++/alta); *C. guillermondii* (++/alta); *C. lusitaniae* 1,42%(-/baixa), 1,42% (-/moderada), 1,42%(+/moderada), 4,26% (++/ moderada), 5,68% (++/alta), 2,84% (+++/moderada) e 4,26% (+++/alta); *C. parapsilosis* 1,42% (+/moderada), 1,42%(++/alta), 4,26% (+++/moderada) e 2,84% (+++/alta); *C. tropicalis* 2,84%(++/baixa), 2,84% (++/moderada), 5,68% (+++/baixa), 2,84% (+++/moderada) e 1,42% (+++/alta) . Observando as amostras de *C. tropicalis* que obtiveram um número de isolamentos expressivos (21,43%) e apesar de produzir biomassa, na maioria das linhagens, com intensidade ++/+++, apresentou atividade metabólica baixa, tendo menor possibilidade de apresentar falha terapêutica se estas vierem a promover infecção em pacientes (BACHMANN et al., 2003; KUHN et al., 2003). Das espécies relacionadas às linhagens de *C.lusitaniae* devido ao alto índice de isolamento, *C. ciferri*, *C. guillermondii*, *C. parapsilosis* são as mais preocupantes, isto porque mesmo produzindo biofilmes em diversas intensidades, apresentaram atividade metabólica alta e estes dados são ainda mais agravantes quando relacionamos estas informações à sua origem, a qual consiste de locais onde ocorre ciclo de mãos, tais como: jaleco, interruptores, maçaneta de porta e mãos de funcionários da saúde podendo, com isso, haver maiores possibilidades de falha terapêutica se vierem a desenvolver infecções em pacientes (BACHMANN et al., 2003; KUHN et al., 2003).

5.4 SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA

O número de drogas antifúngicas disponíveis para tratamento destas infecções ainda é modesto, quando comparado às drogas antibacterianas. No entanto, com o arsenal antifúngico disponível, o aparecimento de resistência nas leveduras *Candida* spp e a necessidade de tratamento rápido e orientado houve a

necessidade de criar protocolos a fim de padronizar testes de sensibilidade *in vitro* para orientar a escolha terapêutica (ARENDRUP et al., 2001).

O CLSI tem, ao longo dos anos, estabelecido padronizações de avaliação do perfil de sensibilidade antifúngica tais como os documentos M27A3 para microdiluição (CLSI, 2008) e M44A2 para difusão em Agar e em fita (CLSI, 2009).

Dentre os principais antifúngicos adotados no tratamento e controle das candidíases, destacam-se a anfotericina B e fluconazol tanto em formulações convencionais quanto lipossomais juntamente com voriconazol e caspofungina (KOCH et al., 2005). O fluconazol é bastante utilizado no tratamento e profilaxia das infecções fúngicas. Entretanto, existe uma tendência para se evitar o uso profilático do fluconazol em doses baixas, a fim de se prevenir o surgimento de isolados resistentes e surgimento de infecções causadas por espécies naturalmente resistentes a este antifúngico como *C. glabrata* e *C. krusei*. A anfotericina B é considerada, em ambiente hospitalar, a droga referência para o tratamento da maioria das infecções fúngicas, porém apresenta alta toxicidade e sua indicação deveria ser restrita somente às infecções sistêmicas (FERRAZA et al., 2005).

Neste estudo utilizou, as 70 amostras de leveduras do gênero *Candida* spp, de modo geral, demonstraram-se sensíveis à anfotericina B e fluconazol, sendo o intervalo de CIM de 0,047 a 0,500 µg/mL para anfotericina B e 0,047 a 12,000 µg/mL para fluconazol.

Nos isolados provenientes de fontes de infecção, o valor de inibição de crescimento (IC) para *C. albicans* foi de 0,190 µg/mL para anfotericina B (IC100) e 1,500 µg/mL para fluconazol (IC80). Já para as espécies não-*albicans*, o valor IC 100 para anfotericina B foi de 0,500 µg/mL e IC80 para fluconazol, de 12,00 µg/mL, mostrando que as espécies não-*albicans* provenientes de fontes de infecção apresentaram valores superiores de IC80 e IC100 quando comparadas com as espécies de *C. albicans*, resultados semelhantes aos encontrados por NEGRI, 2006. Nas amostras provenientes de fontes de colonização observou-se comportamento semelhante. *C. albicans* apresentou IC100 de 0,190 µg/mL para anfotericina B e IC80 de 0,190 µg/mL para fluconazol enquanto para as espécies não-*albicans* o IC100 e IC80 foram 0,750 µg/mL e 6,00 µg/mL para anfotericina B e fluconazol, respectivamente.

A prevalência das espécies não-*albicans* em fontes de colonização é bem visível, nota-se tolerância maior aos antifúngicos usados, talvez pelo contato contínuo com estas drogas em doses baixas, podendo esta prática de manutenção da espécie sob pressão da droga, ao longo do tempo, levar ao desenvolvimento de algum mecanismo de resistência a estes antifúngicos. No entanto, destaca-se que dentre as leveduras que apresentaram $IC_{80} \geq 1,500 \mu\text{g/mL}$ para fluconazol, 78,57% formaram biofilme com IB positivo (++) e positivo (+++) com atividade metabólica alta ou muito alta, em 14,28 % dos isolados houve formação de biofilme com IB positivo (++) e positivo (+++) com atividade metabólica baixa ou moderada e somente em 7,15 % das amostras houve baixíssima intensidade de formação de biofilme e com atividade metabólica baixa. Ressalta-se que a produção de biofilme também pode estar relacionada ao aumento de CIM nestas amostras.

Os resultados de sensibilidade para anfotericina B foram de 100%, os quais corroboram com os estudos de GIUSIANO et al. (2006), que relatam os mesmos índices.

5.5 COMPARAÇÃO ENTRE AS FONTES DE INFECÇÃO E COLONIZAÇÃO PELAS ESPÉCIES DE *Candida* spp. (APÊNDICE E)

A- *C.albicans* - Quando comparamos o isolado de ponta de cateter (221-V) com isolado de ar ambiente (505), observamos que possuem características semelhantes para os fatores associados à virulência (FAV), são β -hemolíticos, possuem índice de biomassa (IB) positivo (+++) com atividade metabólica (AM) baixa e suas CIMs apresentam-se próximas para os isolado de fontes de infecção e colonização com 0,047/0,064 $\mu\text{g/mL}$ contra 0,064/0,190 $\mu\text{g/mL}$ de Antericina B (AFB) e fluconazol (FLU) respectivamente. Os isolados de ponta de cateter (31) e jaleco (1020) são, também, semelhantes quanto aos FAV, são β -hemolíticos, IB (++) com AM moderada e CIM para AFB de 0,125/0,190 $\mu\text{g/mL}$ e diferem apenas na CIM para FLU, sendo estas de 1,00/0,094 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Já os isolados de ponta de cateter (289) e jaleco (521) possuem algum grau de semelhança, ambos produzem IB (++) com AM moderada, o isolado 289 é α -hemolítico com CIM para AFB e FLU de

0,047/0,500 µg/mL respectivamente, enquanto que o isolado 521 é β-hemolítico com CIM para AFB e FLU de 0,094/0,064 µg/mL.

Os isolados de fontes de colonização encontrados em lençol (500) e jaleco (1020) apresentaram características semelhantes quanto aos FAV, diferindo apenas na produção de enzimas hemolíticas. Ambos possuem IB ++ com AM baixa, CIM para AFB de 0,190 µg/mL e para FLU de 0,125/0,094 µg/mL respectivamente.

As amostras encontradas em ar ambiente (505) e jaleco (1020) ambas são β-hemolíticas, IB ++ com AB baixa e valores de CIM aproximados. Já nos isolados de hemocultura (120) e ponta de cateter 221-V são β-hemolíticas, IB (+++) com AB baixa, mas com valores de CIM para AFB aproximados (0,094/0,047 µg/mL) e discrepantes para FLU (1,500/0,500 µg/mL) respectivamente.

Os demais isolados de *C. albicans* apresentaram características particulares quanto ao FAV não sendo possível estabelecer uma comparação entre as fontes de infecção e colonização.

B- *C.iferri* – não é levedura patogênica, encontrada apenas em fontes de colonização, principalmente nos seguintes locais (02 em Maçaneta de porta (MP),01 em mão de profissionais da saúde (MF) e 01 em bandeja de medicamento (BM)) e as características que apresentaram quanto aos FAV são preocupantes. Os isolados 513 (MP) e 542 (MF) apresentaram IB (+++) com AM altas, entretanto a amostra 513 não possui atividade hemolítica e apresentou CIM para AFB e FLU 0,190/0,250 µg/mL enquanto a amostra 542 apresentou α-hemólise e CIM de 0,250/1,500 µg/mL para AFB e FLU respectivamente.Os isolados 528(MP) e 535(BM) apresentaram IB (+++)(++) com AM moderada , não são hemolíticos e apresentaram CIM para AFB e FLU de 0,250/0,500 e 0,750/0,190 respectivamente. Nota-se que há uma produção de biofilme e AM relevantes em todas amostras desta espécie e uma CIM para FLU nas amostras 542 de 1,500 µg/mL e CIM para AFB na amostra 535 de 0,750 µg/mL, valores estes considerados altos em relação aos outros isolados de colonização deste trabalho e apesar de não se ter relatos de sua patogenicidade é uma espécie que a longo prazo poderá vir a desenvolver esta característica.

C- *C.famata*- também não é considerada patogênica e só foi isolada de fontes de colonização. As amostras 506 (ar ambiente) e 534 (interruptor) ambas apresentam

IB (++) , com AM alta/ moderada e atividade hemolítica β/γ .As CIMs para AFT e FLU foram idênticas.

D- *C. guilliermondii* – Os 2 isolados encontrados, hemocultura(100) e jaleco(1017), apresentaram características semelhantes quanto a IB (++)(++), AM (alta/alta) e sem atividade hemolítica, ambas diferenciam-se apenas nas CIMs para AFB (0,190/0,380 $\mu\text{g/mL}$) e FLU (0,750/1,500 $\mu\text{g/mL}$) respectivamente.

E- *C. krusei* – amostra encontrada somente em fontes de infecção, sendo em hemocultura (28) e escarro (678-2) não havendo comparações nos FAV dos dois isolados.

F-*C. lusitaniae* – foi a espécie com maior número de isolados (27,14%), sendo que, os isolados de fontes de colonização provenientes dos interruptores (531,1009,1046) apresentaram IB (+++) com AM alta sem atividade hemolítica (1009 e 1046) e moderada (531) com β -hemólise, o isolado 1014 apresentou IB (++) com moderada AM e sem hemólise. Os isolados provenientes de jalecos apresentaram IB (+++) com AM alta (1018-B, 1021-B) e IB(++) com AM alta (523,1021-A), já as amostras 524 e 1022-B apresentaram IB + com AM moderada e IB (++) com AM alta respectivamente e não apresentaram atividade hemolítica. Das amostras provenientes de mãos de profissionais da saúde, os isolados 537 e 540 ambos apresentaram IB (+) mas com AM moderada/ baixa, e somente amostra 537 apresentou atividade hemolítica (α). A amostra 541 apresentou IB (++) com AM alta, sem atividade hemolítica. Das amostras encontradas em MP, a 1006, apresentou IB (++) e AM moderada e sem atividade hemolítica, enquanto o isolado 1034 apresentou IB (+++) e AM alta e atividade hemolítica parcial (α). O isolado de lençol (501) apresentou IB (++) e AM moderada e α -hemólise. De forma geral as amostras de *C. lusitaniae* originadas de fontes de colonização apresentaram CIM para AFB < 0,380 $\mu\text{g/mL}$, entretanto as CIM para FLU em algumas amostras se destacaram por serem CIM mais altas, 1018-B e 1021- 1,500 $\mu\text{g/mL}$, amostra 1034 apresentou CIM de 6,00 $\mu\text{g/mL}$, amostras 540,1006,1009,1014,1022-B de 4,00 $\mu\text{g/mL}$. Com estes dados, referentes aos isolados de fontes de colonização, se compararmos com os achados nas fontes de infecção iremos observar que possuem similaridade entre as amostras 1021-A e 295, 1018-B e 288, 534 e 219, 1006 e 389 sendo que as diferenças existentes estão relacionadas a CIM apresentada para AFB e FLU.

G- *C. parapsilosis*- Os isolados de fontes de colonização de jaleco (1019,1022-B e 1003) apresentaram IB (+++) com, AM alta, valores maiores quando comparados aos isolados de MP 1012 (IB +/-AM moderada), já os isolados 1002 de MP e 1007 de interruptor apresentaram IB (+++) e AM moderada. Com exceção da amostra 1019 que se apresentou como β -hemolítica, as demais não apresentaram atividade hemolítica.

Houve reprodutibilidade de comportamento dos isolados desta espécie, originados de fontes de colonização, frente ao antifúngico AFB, sendo que todos apresentaram CIM < 0,125, entretanto para FLU houve uma variação na CIM, os isolados de MP apresentaram as seguintes CIMs 1002 (2,00 $\mu\text{g/mL}$), 1005 (1,50 $\mu\text{g/mL}$) e 1012 (4,00 $\mu\text{g/mL}$); interruptores 1007 (4,00 $\mu\text{g/mL}$); jalecos 1019 (1,50 $\mu\text{g/mL}$), 1022-A (0,75 $\mu\text{g/mL}$). Se compararmos com os isolados desta espécie de fontes de infecção observaremos que existe uma similaridade nas características de FAV entre as amostras 315 de hemocultura e 1022-A de jaleco, com variação pequena na CIM para FLU (0,380/0,750 $\mu\text{g/mL}$), a amostra 280 de hemocultura e 1007 de interruptor se diferem na produção de enzimas hemolíticas e sua CIM frente aos antifúngicos AFB e FLU é de 0,064/6,00 $\mu\text{g/mL}$ e 0,094 e 4,00 $\mu\text{g/mL}$. Dado importante é que um dos isolados desta espécie, 210 de hemocultura, foi o único a apresentar CIM dose dependente, de 12,00 $\mu\text{g/mL}$.

H- *C. tropicalis* – Das amostras isoladas de fontes de colonização MP (529,532), interruptor (532) e mão de profissionais da saúde apresentaram IB (+++) e AM baixa. Amostras oriundas de MP (530) e interruptor (1013) apresentaram IB (++) com AM baixa; Os isolados de jaleco (504 e 522) tiveram IB (++) e AM moderada; somente a amostra de MP (1008) apresentou IB (+++) e AM moderada entretanto os isolados de interruptor (538) e jaleco (1018-A) apresentaram IB (+++) com AM alta. Com exceção das amostras 530 e 504 que se apresentaram como β -hemolíticas e a amostra 539 como α -hemolíticas, todos os outros isolados desta espécie não apresentaram atividade hemolítica. Esta espécie frente a AFB apresentou CIM < 0,190 $\mu\text{g/mL}$ para isolados de fontes de colonização e no caso de fontes de infecção apenas as amostras 397 de ponta de cateter e 539 de mãos de profissionais da saúde apresentaram CIM de 0,500 $\mu\text{g/mL}$. Os isolados desta espécie oriundos de fontes de colonização se comparados aos isolados de fonte de infecção,

apresentaram algumas similaridade nos FAV, as amostras 391 de ponta de cateter e 398 de hemocultura com amostras 532 interruptor e 529 de MP todas apresentaram IB (+++) com AM baixa e sem atividade hemolítica, diferenciando-se apenas nas CIMs apresentadas para FLU, que para as amostras de fontes de infecção foram 4,00 e 1,00 µg/mL e para as amostras de fontes de colonização foram de 0,19 e 0,500 µg/mL; a CIM para AFB foi < 0,19 µg/mL para isolados de fontes de colonização e infecção. Os isolados 124 de ponta de cateter e o 530 de MP também apresentaram características semelhantes, ambas apresentaram IB (++) e AM baixa, β-hemólise e diferenciaram-se nas CIM de FLU, sendo que o isolado de fonte de infecção apresentou CIM de 2,00 µg/mL e o de colonização, CIM 0,094 µg/mL mas para AFB ambas apresentaram CIM < 0,190 µg/mL.

Diante da discussão apresentada, ressalta-se que *C. albicans* ainda é a espécie mais conhecida e estudada do gênero e considerada a de maior interesse clínico por corresponder ao principal agente de infecções fúngicas em humanos. No entanto, as espécies *C. não-albicans* têm sido consideradas emergentes em várias partes do mundo, sendo que nossos dados corroboram com esta afirmativa, e o aumento e predomínio desses agentes em infecções pode estar associado à maior capacidade de expressão dos fatores associados à virulência.

Há ainda a necessidade emergente de programas de vigilância sanitária para monitorar possíveis mudanças na distribuição de espécies de leveduras, bem como estabelecer o perfil de sensibilidade comparativo entre isolados planctônicos e isolados em biofilmes, além de estabelecer a cadeia epidemiológica das infecções, para que interferências no ciclo infecção-colonização possam ser realizadas. Ademais, um maior número de estudos nos hospitais brasileiros e investimentos na capacitação profissional devem ser realizados para prevenir e controlar contaminação/colonização e infecções nosocomiais fúngicas com ou sem risco aparente de morbidade e mortalidade

6 CONCLUSÕES

- Foram isoladas 70 amostras de *Candida* spp de um total de 781 amostras de fontes de infecção e colonização.
- Os isolados de leveduras encontrados em fontes de infecção, *C. albicans* foi a espécie mais encontrada com 32%, enquanto que todas as espécies não-*albicans* perfizeram um índice de 68%. De forma geral nos isolados de fontes de colonização e de infecção, houve predomínio das espécies não-*albicans* (81,43%), com distribuição de *C. lusitaniae* (30%), *C. tropicalis* (21,99%), *C. parapsilosis* (15,72%), *C. ciferri* (5,72%), *C. famata* (2,86%), *C. guillermondii* (2,86%), *C. krusei*, (2,86)%.
- Colonização considerável de locais onde ocorre ciclo de mãos dos profissionais envolvidos diretamente com os pacientes: mãos (11,12%), jalecos (33,3%), interruptores (20,0%), maçanetas (24,45%).
- Todas as amostras provenientes de fontes de infecção apresentaram potencial para formar biofilme com resultados equilibrados entre *C. albicans* (75%) e não-*albicans* (76,47%) para biofilme de grau intermediário a elevado. *C. albicans* e não-*albicans*, de fontes de colonização, produziram biofilme de intensidade intermediária a alta em 100% e 90% dos casos, respectivamente.
- Os isolados de *C. albicans* tanto de fontes de infecções quanto de fontes de colonização, em seus biofilmes, apresentaram baixa e moderada atividade metabólica. Para *C. não-albicans*, observou-se elevada atividade metabólica em 35,3% e 37,5% das amostras de fontes de infecção e colonização, respectivamente.
- Todos isolados de *C. albicans*, de fontes de infecção e 60% de fontes de colonização, apresentaram atividade hemolítica. Das espécies não-*albicans* de fontes de infecção houve atividade hemolítica em 47% dos isolados contra 20% das espécies de fontes de colonização.
- *C. albicans* tanto de fontes de infecção quanto de colonização apresentaram IC100 para Anfotericina B e IC80 para Fluconazol menores que as não-*albicans*.Entretanto as amostras de não-*albicans* de fontes colonizantes apresentaram uma tolerância maior aos antifúngicos quando comparadas à *C.albicans*.

- Das amostras de fontes de infecção e colonização houve sensibilidade a Anfotericina B em 100% das mesmas e 98,57% a Fluconazol
- Apenas 1,43% de *C. não-albicans*, de amostra de hemocultura, apresentaram sensibilidade dependente da dose a Fluconazol.
- Visualizando a proposta do trabalho, observa-se que as amostras de fonte de colonização quando relacionadas com as de fonte de infecção, apresentam semelhanças nos fatores associados à virulência e perfil de sensibilidade quando relacionadas por espécies. Em etapas futuras, análises moleculares serão propostas com a finalidade de diferenciação de algumas espécies intimamente relacionadas tais como as leveduras pertencentes ao complexo “ortho-meta-para-psilosis” e *C. glabrata* de *C. nivariensis* e *C. bracarensis*, além de *C. albicans* de *C. dubliniensis*. Estes estudos adicionais permitirão o estabelecimento da cadeia epidemiológica de *Candida* spp no ambiente hospitalar analisado.

7 REFERÊNCIAS

- ABI SAID, D.; ANNAISSIE, E. Epidemiology of Non-*albicans* Candida spp. **Clinical Infectious Disease**, v.7, p. 1131-1133, 1998.
- AL-DHAHERI, R.S.; DOUGLAS, L. J. Absence of Amphotericin B-Tolerant Persister Cells in Biofilms of Some *Candida* Species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n.5, p. 1884-1887, 2008.
- ÁLVARES, C.A.; SVIDZINSKI, T.I.E.; CONSOLARO, M.E.L. Candidíase vulvovaginal: Fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.43, n.5, p.319-327, 2007.
- AQUINO, V.R. et al. Prevalence, Susceptibility Profile for Fluconazole and Risk Factors for Candidemia in a Tertiary Hospital in Southern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.9, p. 411-418, 2005.
- ARENDRUP, M. et al. Comparison of Etest and a tablet diffusion test with the NCCLS broth microdilution method for fluconazole and amphotericin B susceptibility testing of *Candida* isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.47, n.5, p.521-526, 2001.
- ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; FRADE, J.P. Antifungal Drug Resistance: Clinical Importance, in vitro Detection and Implications for Prophylaxis and Treatment. **Issues Infectious Disease**, v. 6, p. 138–153, 2010.
- BACHMANN, S.P.; et al. Antifungal combinations against *Candida albicans* biofilms in vitro 2003. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**; v.47, n.11, p.3657-3659, 2003.
- BAILLIE, G.S.; DOUGLAS, L.J. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v. 48, p.671–679, 1999.
- BARRETT-BEE, K. et al. A Comparison of Phospholipase Activity, Cellular Adherence and Pathogenicity of Yeasts. **Journal of General Microbiology**, v.131, p. 1217-1221, 1985.
- BASSETTI, M. et al. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. **BMC Infectious Diseases**, v.6, p.21, 2006.
- BERENQUER, J. et al. Deep infections caused by *Scedosporium prolificans*. **Reviews In Molecular Medicine**, v.76 ,n.4, p.256-265, 1997.

BERZAGHI, R. et al. New Approach for Diagnosis of Candidemia Based on Detection of a 65-Kilodalton Antigen. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.16, n.11, p.1538-1545, 2009.

BISHOP, J.A. et al. *Candida bracarensis* detected among Isolates of *Candida glabrata* by peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization: susceptibility data and documentation of presumed infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.2, p. 443-446, 2008.

BLOOMBERG, H.M.; DARVIS, W.R.; WENZEL, R.P.; The nemis study group. Risk factors for *Candida* bloodstream infections in surgical ICUs. Abstract No. 102, Abstracts of the IDSA 36th Annual Meeting. **Clinical Infectious Disease**, v.27, p. 939, 1998.

BONASSOLI, L.; BERTOLI, M.; SVIDZINSKI, T. High frequency of on the hands of healthy hosts. **Journal of Hospital Infection**, v.59, n.2, p.159-162, 2005.

BORMAN, A.M. et al. *Candida nivariensis*, an Emerging Pathogenic Fungus with Multidrug Resistance to Antifungal Agents. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.3, p. 933-938, 2008.

BRASIL. Ministério de Estado da Saúde. Portaria 2616, de 1998. Publicação D. O. U. de 13 de maio de 1998. **Programa de Controle de Infecção Hospitalar**. Anexo II: Conceitos e critérios diagnósticos das IHS. São Paulo, p.5, 1998.

BULLEN.; J. J. The significance of iron in infection. **Reviews of Infectious Diseases**, v.3, n.6, p.1127-1138, 1981.

CAGGIANO. G. et al. Observational study on candidaemia at a university hospital in southern Italy from 1998 to 2004. **Mycoses**, v.51, p.123–128, 2008.

CALDERONE, R.A.; FONZI, W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v.9, n.7, p.327-335, 2001.

CALVET, H.M.; YEAMAN, M.R.; FILLER, S.G. Reversible fluconazole resistance in *Candida albicans*: a potential in vitro model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.41, n.3, p.535-539, 1997.

CANUTO, M.; RODERO, F. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. **The Lancet Infectious Diseases**, v.2, n.9, p.550-563, 2002.

CARPENTIER, B.; CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **Journal of Applied Bacteriology**, v.75, n.6, p.499–511, 1993.

CHAFFIN, W.L. et al. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function and expression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.1, p.130-180,1998.

CHANDRA, J. et al. Antifungal Resistance of Candidal Biofilms Formed on Denture Acrylic in vitro. **Journal of Dental Research**, v.80, n.3, p.903-908, 2001.

CHANG, M.R. et al. Surveillance of pediatric infections of a pedagogic hospital in Mato Grosso de Sul, Brazil. **Brazilian Journal Infectious Disease**, v.7, n.2, p.149-160, 2003.

CHEN, Y.C. et al. Stable susceptibility of *Candida* blood isolates to fluconazole despite increasing use during the past 10 years. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v.52, n.1, p.71-77, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 3rd ed. Approved standard. CLSI M27-A3 (28)**. Wayne, PA, USA, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. Approved Guideline-Second Edition. M44-A2**. Wayne, PA, USA: CLSI, 2009.

COLOMBO, A.L. et al. Susceptibility profile of 200 bloodstream isolates of *Candida* spp collected from Brazilian tertiary care hospitals. **Medical Mycology**, v.41, p. 235-239, 2003.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.5, p.599-607, 2003.

COMO, J.A.; DISMUKES, W.E. Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. **The New England Journal of Medicine**, v.330, p.263–272,1994.

CORREIA, A. et al. *Candida bracarensis* sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to *Candida glabrata*. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.313-317, 2006.

COSTERTON, J. W.; GEESEY, G. G.; CHENG, G. K. How bacteria stick. **Scientific American**, v.238, p.86–95,1978.

COSTERTON, J.W.; LAPPIN-SCOTT, H. Microbial Biofilm:Growth of microorganism on surface. Cambridge, 2003. Cap. 1, p.15-46.

CUENCA-ESTRELLA, M. et al. Detection of resistance to amphotericin B in *Candida* isolates by using Iso-Sensitest broth. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.45, p. 2070–2074, 2001.

DE OLIVEIRA, R.D.R.; MAFFEI, C.M.L.; MARTINEZ, R. Infecção urinária hospitalar por leveduras do gênero *Candida*. **Revista de Associação Médica Brasileira**, v.47 n.3, p.231-235, 2001.

DONLAN, R. M. Biofilm formation: A clinically relevant microbiological process. **Clinical Infectious Diseases**, v.33, p.1387-1392, 2001.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms **Clinical microbiology reviews**, v.15, n.2, p.167-193, 2002 .

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Disease**, v.8, n.9, p.881–890, 2002 .

DOUGLAS, L. J. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.19, p.139–143, 2002.

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

DROMER, F. et al. Oral transmission of *Candida albicans* between partners in HIV-infected couples could contribute to dissemination of fluconazole-resistant isolates. **Official Journal of the international AIDS society**, v.11, n.9, p.1095-1101, 1997.

DUNNE, W.M. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? **Clinical Microbiology Reviews** v.15, n.2, p.155-66, 2003.

EL-AZIZI, M.A.; STARKS, S.E.; KHARDORI, N. Interactions of *Candida albicans* with other *Candida* spp. and bacteria in the biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, p.1067-1073, 2004.

ELLIS, D. Amphotericin B: spectrum and resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** , v.49 (suppl A), p. 7–10, 2002.

FERRAZA, M.H. et al. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.27, p.58-63, 2005.

FERREIRA, J.A.G. et al. Biofilm formation and effect of caspofungin on biofilm structure of *Candida* species bloodstream isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, n.10, p.4377-4384, 2009.

FRANÇA, J.C.B.; RIBEIRO, C.E.L.; QUEIROZ-TELLES, F. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, freqüência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, p.23-28, 2008.

FRANÇA, E.J.G. et al. Hemólise produzida por *Candida tropicalis* isoladas de amostras clínicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v.43, n.3, p.318-321, 2010.

Furlaneto-Maia, L. et al. Estudo da incidência de amostras clínicas do gênero *Candida* isoladas de diversos sítios anatômicos. **Acta Sci. Health Sci**, v.29, n.1, p.33-37, 2007.

GAGNEUR, A. et al. Low rate of *Candida parapsilosis* related colonization and infection in hospitalized preterm infants: a one year prospective study. **Journal of Hospital Infection**, v.48, n.3, p.193-197, 2001.

GALES, A.C. et al. Identification of *Candida dubliniensis* Based on Temperature and Utilization of Xylose and α -Methyl-D-Glucoside as Determined with the API 20C AUX and Vitek YBC Systems. **Journal of clinical microbiology**, v.37, n.12, p.3804-3808, 1999.

GARCIA-EFRON, G. et al. A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in FKs1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. V.52, n.7, p.2305-2312, 2008.

GARNER, J.S. et al. CDC definitions for nosocomial infections. **Infection Control and Applied Epidemiology**, V.17, n.1,p. A1-A20, 1996.

GIUSIANO, G. et al . Etiology of fungaemia and catheter colonization in Argentinean paediatric patients, **Mycoses**, v.49, n.1, p.49-54, 2006.

GUTIERREZ, F.; WALL, P.G.; COHEN, J. An audit of the use of antifungal agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** , v.37, p.175–185, 1996.

Hasan, F.; et al. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. **Microbes and Infection**, v.11,753-761,2009.

HAWSER, S.P.; DOUGLAS, L.J. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. **Infection and Immunity**, v. 62, n.3, p.915-921, 1994.

HAWSER, S. Comparisons of the susceptibilities of planktonic and adherent *Candida albicans* to antifungal agents: a modified XTT tetrazolium assay using synchronized

C. albicans cells. **Journal of Medicine Veterinary Mycology**, v.34, p.149–152,1996.

HAWSER, S. Adhesion of different *Candida* spp. to plastic: XTTformazan determinations. **Journal Medicine Veterinary Mycology**, v. 34, p.407–410, 1996.

HINRICHSEN, S.L. et al. Candidemia em hospital terciário do nordeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 394-398, 2008.

HOGAN, D. A.; VIK, A.; KOLTER, R. A *Pseudomonas aeruginosa* quorum- sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. **Molecular Microbiology**, v.5, n.9, p.1212-1223, 2004.

HORNBY, J. et al. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. **Applied and environmental microbiology**, v.67, n.7, p.2982-2992, 2001.

HOTA, B. Contamination, disinfection, and cross-colonization: Are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infections? **Clinical Infectious Diseases**, v.39, p.1182-1189, 2004.

JABRA-RIZKI, M.A. et al. Cell surface hydrophobicity associated adherence of *Candida dubliniensis* to human buccal epithelial cells. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.18, p.17-22, 2001.

JAMES, D.A. Invasive *Candida* species infection: the importance of adequate empirical antifungal therapy. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v.60, n.3, p. 459-460, 2007.

JARVIS, W.R. The epidemiology of colonization. **Infection control and hospital epidemiology**, v.17, p.47-52, 1996.

JIN, Y. et al. Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of Human Immunodeficiency Virus infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.7, p.2961-2967, 2003.

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

KIRKPATRICK, W.R. et al. Detection of *Candida dubliniensis* in Oropharyngeal Samples from Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients in North America by Primary CHROMagar *Candida* Screening and Susceptibility Testing of Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.10, p.3007-3012, 1998.

KOCH, S. et al. Diagnostik und therapie invasiver Pilzinfektionen auf der intensive station. **Anaesthesist**, v.54, n.10, p.1047-1064, 2005.

KOJIC, E. M.; DAROUICHE, R. O. *Candida* infections of medical devices. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, p.255-267, 2004.

KRAMER, A.; SCHWEBKE, I.; KAMPF, G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. **BMC infectious Diseases**, v.6, p. 130, 2006.

KRCMERY, V. JR. et al. Nosocomial breakthrough fungaemia during antifungal prophylaxis or empirical antifungal therapy in 41 cancer patients receiving antineoplastic chemotherapy: analysis of a etiology risk factors and outcome. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.41, n. 3, p. 373-380, 1998

KRCMERY, V. JR. Candidemia in cancer patients: Risk factors and outcome in 140 episodes from a single cancer institution. **Acta Chemotherapy**, v.5, p.133-145, 1999.

KRCMERY, V. JR.; BARNES, A. J. Non-albicans *Candida* sp. Causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **Journal Hospital Infectious**, v.50, p.243–260, 2002.

KUHN, D.M. et al. Comparison of Biofilms Formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on Bioprosthetic Surfaces. **Infection and immunity**, v.70, n.2, p.878-888, 2002.

KUHN, D.M. et al. Uses and Limitations of the XTT Assay in Studies of *Candida* Growth and Metabolism. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.1, p.506-508, 2003.

KUNG, H.C. et al. Community-onset candidemia at a university hospital, 1995–2005. **Journal Microbiology Immunology Infectious**, v.40, p.355–363, 2007.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The Yeasts, a Taxonomic Study**, 4thed. Amsterdam: Elsevier, 1998.

LACAZ, S.C. et al. **Tratado de micologia médica**, 9^a.ed. São Paulo, Savier: 2002.

LAFLEUR, M.D.; KUMAMOTO, C.A.; LEWIS, K. *Candida albicans* Biofilms Produce Antifungal-Tolerant Persister Cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, n.11, p.3839–3846, 2006.

LEVIN, A. S. et al. *Candida parapsilosis* fungemia associated with implantable and semi-implantable central venous catheters and the hands of healthcare workers. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.30, n.4, p.243-249, 1998.

LEWIS, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. **Nature Reviews Microbiology**, v.5, p.48–56, 2007.

LI, X.; YAN, Z.; XU, J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. **Microbiology**, v.149, p.353-362, 2003.

LOCKHART, S.R. et al. Identification of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in a Large Global Collection of *Candida glabrata* Isolates: Comparison to the Literature. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, n.4, p. 1216-1217, 2009.

LUO, G.; SAMARANAYAKE, L.P.; YAU, J.Y.Y. *Candida* Species Exhibit Differential In Vitro Hemolytic Activities. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.8, p. 2971-2974, 2001.

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

MANNS, J. M.; MOSSER, D. M.; BUCKLEY, H.R. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v.62, p.5154–5156, 1994.

MARICHAL, P. et al. Molecular biological characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.41, p.2229–2237, 1997.

MARR, K. A. et al. The trailing end point phenotype in antifungal susceptibility testing is pH dependent. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.43, n.6, p.1383-1386, 1999.

MARTINI, A. et al. Procalcitonin levels in surgical patients at risk of candidemia. **Journal of Infection**, v.60, n.6, p. 425-430, 2010.

MARTINS-DINIZ, J.N. et al. Monitoramento de fungos anemofílicos e de leveduras em ambiente hospitalar. **Revista de Saúde Pública**, v.39, n.3, p.398-405, 2005.

MATSUMOTO, F.E. et al. Yeasts isolated from blood and catheter in children from a Public Hospital of São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v.154, p.63–69, 2001.

MELO, A.S. et al. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. **Medical Mycology**. 2010 (epub ahead of print).

MENDIRATTA, D.K. et al. *Candida* colonization in preterm babies admitted to neonatal intensive care unit in the rural setting. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v.24, n.4, p.263-267, 2006.

MESIANO, E.R.A.B; MERCHÁN-HAMANN², E. Infecções da corrente sanguínea em pacientes em uso de cateter venoso central em unidades de terapia intensiva. **Revista Latino-americana de enfermagem**.v.15, n.3, 2007.

MORAGUES, M.D. et al. A monoclonal antibody directed against a *Candida albicans* cell wall mannoprotein exerts three anti-*C.albicans* activities. **Infection and Immunity**, v.71, n.9, p. 5273-5279, 2003.

NEGRI, M.F.N. et al. Hemolytic activity and production of germ tubes related to pathogenic potential of clinical isolates of *Candida albicans*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.31, p.89-93, 2010.

NEGRI, M.F.N. Leveduras do gênero *Candida* isoladas de colonização e infecção hospitalar: caracterização fenotípica e sensibilidade aos antifúngicos. 2006. 107f. dissertação (mestrado em microbiologia)-Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

NETT, J. et al. Putative Role of β -1,3 Glucans in *Candida albicans* Biofilm Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, n.2, p.510-520, 2007.

NOLTE, F.S. et al. Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.41, p.196–199, 1997.

NUNN, M.A. et al. Enviromental source of *Candida dubliniensis*. **Emerging Infectious Disease**, v.13, n.5, p.747-750, 2007.

OSORIO, J.J.C.; RIVERO, A.; CISNEROS, J.T. Epidemiology of invasive fungal infection. **Journal of antimicrobial agents**, v.32, p.103-109, 2008.

OSTROSKY-ZEICHNER, L. et al. Antifungal Susceptibility Survey of 2,000 Bloodstream *Candida* Isolates in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n.10, p. 3149-3154, 2003.

O'TOOLE, G.A.; DAVEY, M.E. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, n.4, p.847-867, 2000.

OTTO, B. R.; VERWEIJ-VAN VUGHT, A.M.J.J.; MACLAREN, D.M. Transferrins and heme compounds as iron sources for pathogenic bacteria. **Critical Reviews Microbiology**, v.18, n.3, p.217-233, 1992.

PAPPAS, P.G. et al. A Prospective Observational Study of Candidemia: Epidemiology, Therapy, and Influences on Mortality in Hospitalized Adult and Pediatric Patients. **Clinical Infectious Diseases**, v.37, p.634-643, 2003.

PAPPAS, P.G. et al. Guidelines for treatment of candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v.38, p.161-189, 2004.

PASSOS, X.S. et al. Candida colonization in intensive care unit patients urina. **Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n.8, p.925-928, 2005.

PAULA, C.R. et al. Infecção hospitalar fúngica: Expêriencia em hospitais públicos de São Paulo. **Prática hospitalar**, v.9, n.8, p.63-66, 2007.

PAULA, C.R.; MATSUMOTO, F.E.; MELO, T.A. Possible catheter-related infections in public children's hospital of São Paulo, Brazil. **ASM Conference on Candida and Candidiasis**, 1999, p.35, Charleston, Sputh Carolina, USA.

PERFECT, J.R.; COX, G.M. Drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Drug Resistance Updates**, v.2, n.4, p. 259-269, 1999.

PERLROTH, J.; CHOI, B.; SPELLBERG, B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. **Medical mycology**, v.45, n.4, p.321-346, 2007.

PERUMAL, P.; MEKALA, S.; CHAFFIN, W.L. Role for Cell Density in Antifungal Drug Resistance in *Candida albicans* Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, n.7, p. 2454-2463, 2007.

PFALLER, M. Epidemiology of candidiasis. *Journal of Hospital Infection*, v.30, p.329-338, 1995.

PFALLER, M.A. et al. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to species of *Candida* other than *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE program. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.30, p.121-129, 1998.

PFALLER, M.; WENZEL, R. **The epidemiology of fungal infections**. Elsevier Science, New York, 2003.

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

PHELPS, M.; AYLIFFE, G.; BABB, J. An outbreak of candidiasis in a special care baby unit: the use of a resistogram typing method. **Journal of Hospital Infection**, v.7, n.1, p.13-20, 1986.

PONTÓN, J.; QUINDÓS, G. Mechanism of resistance to antifungal therapy. **Medicina clínica**, v.126, n.1, p.56-60, 2006.

RAMAGE, G. et al. *Candida* Biofilms: an Update. **Eukaryotic Cell**, v.4, n.4, p. 633–638, 2005.

REVANKAR, S.G. et al. Detection and significance of fluconazole resistance in oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients. **Journal of Infectious Disease**, v.174, p.821–827, 1996.

RIBEIRO, E.L. et al. Detecção de *C. albicans* fosfolipidolíticas isoladas da saliva de crianças com síndrome de Down. **Acta Médica Portuguesa**, v.15, n.3, p.171-174, 2002.

RIESELNAN, M.H.; HAZEN, K.C.; CUTLER, J.E. Determination of Antifungal MICs by a Rapid Susceptibility Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.1, p. 333-340, 2000.

RORIG, K. C. O.; COLACITE, J.; ABEGG, M. A. Produção de fatores de virulência *in vitro* por espécies patogênicas do genero *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, p.225-227, 2009.

RUIZ, L.S. et al. Fungemia by yeasts in Brazil: occurrence and phenotypic study of strains isolated at the Public Hospital, Botucatu, São Paulo. **Journal of Medical Mycology**, v.15, n.1, 13-21, 2005.

SANGLARD, D. et al. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14-alpha-demethylase (Cyp51a1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.42, p.241–253, 1998.

SCHMID, J.S. et al. Evidence for a general-purpose genotype in *Candida albicans*, highly prevalent in multiple geographical regions, patient types and types of infection. **Pathogenicity and Medical Microbiology**, v.145, p.2405-2413, 1999.

SELITRENNIKOFF, C.P.; Antifungal Proteins. **American Society for Microbiology**. v.67, n.7, p. 2883-2894, 2001.

SENEVIRATNE, C.J. et al. Cell density and cell aging as factors modulating antifungal resistance of *Candida albicans* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, n.9, p.3259–3266, 2008.

SHADOMY, S; PFALLER, M.A. **Manual of microbiology**: Laboratory studies with antifungal agents: susceptibility tests and quantitation in body fluids. p. 1173-1183. 5. ed. American Society for microbiology. Washington, 1991.

SHARP, A.M.; ODDS, F.C.; EVANS, E.G. *Candida* strains from neonates in a special care baby unit. **Archives of disease in childhood**, v.67, p.48-52, 1992.

SHIN, J.H. et al. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of blood stream isolates with isolates from other sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.4, p.1244-1248, 2002.

SILVA, E. H. Candidúria em hospital público infantil de São Paulo, Brasil: Identificação de leveduras, fatores relacionados a virulência, biotipagem “killer” e sensibilidade aos antifúngicos. 2005.113f dissertação (mestrado em microbiologia) – Instituto de ciências biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

SINGH, K. et al. Yeast colonization and fungemia in preterm neonates in a tertiary care center. **Journal Medical Research**, v. 110, p.169-173, 1999.

SOJAKOVA, M. et al. Fluconazole and itraconazole susceptibility of vaginal yeast isolates from Slovakia. **Mycopathologia**, v.157, p.163–169, 2004.

SPRUNG, C.L. et al. An evaluation of systemic inflammatory response syndrome signs in the Sepsis Occurrence in Acutely ill Patients (SOAP) study. **Intensive Care Medicine**, v.32, n.3, p.421-427, 2006.

ST-GERMAIN, G. et al. Prevalence and antifungal susceptibility of 442 *Candida* isolates from blood and other normally sterile sites: results of a 2-year (1996 to 1998) Multicenter Surveillance Study in Quebec, Canada. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.3, p.949-953, 2001.

TAMURA, N. K., A. GASPARETTO, A.; T.I.E. SVIDZINSKI, T.I.E. Evaluation of the adherence of *Candida* species to urinary catheters. **Mycopathologia**, v.156, n.4, p.269-272, 2003.

TAMURA, N.K. et al. Fatores de virulência de *Candida* spp isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, n.1, p.91-93, 2007.

THEIN, Z.M.; SAMARANAYAKE, Y.H.; SAMARANAYAKE, L.P. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. **Archives of oral biology**, v.51, n.8, p.672-680, 2006.

TRAORE, O.; SPRINGTHORPE, V.S.; SATTAR, S.A. A quantitative study of the survival of two species of *Candida* on porous and non-porous environmental surfaces and hands. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, p.549-555, 2002.

VANDENBOSCH, D. et al. Fungicidal activity of miconazole against *Candida* spp. biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.65, p.694–700, 2010

- VAZQUEZ, J.A. et al. Nosocomial acquisition of *Candida albicans*: an epidemiologic study. **The Journal of Infectious Diseases**, v.168, p.195–201, 1993.
- VAZQUEZ, J.A. et al. Nosocomial *Candida glabrata* Colonization: an Epidemiologic Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.2, p.421-426, 1998.
- VISCOLI, C. et al. Candidemia in cancer patients: A prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). **Clinical Infectious Disease**, v.28, p.1071-1079, 1999.
- WARNOCK, D.W. Trends in the Epidemiology of Invasive Fungal Infections. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v.48, n.1, p.01-12, 2007.
- WATANABE, T. et al. Hemoglobin is utilized by *Candida albicans* in the hyphal form but not yeast form. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.232, p.350-353, 1997.
- WHITE, M.H. et al. Amphotericin B colloidal dispersion vs. amphotericin B as therapy for invasive aspergillosis. **Clinical Infectious Disease**, v.24, p.635-642, 1997.
- YANG, Y.L. et al. . Virulence factors of *Candida* species. **Journal Microbiology Immunology Infectious**, v.36, p.223–228, 2003.
- ZARAGOZA, R. et al. Clinical significance of the detection of *Candida albicans* germ tube-specific antibodies in critically ill patients. **Revista Iberoamericana de micologia**. v.23, p.59-63, 2006.
- ZHANEL, G.G. et al. In vitro activity of a new semisynthetic echinocandin, LY-303366, against systemic isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, and *Aspergillus* species. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.41, p.863-865, 1997.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de consentimento

Eu,

.....
abaixo assinado (a), tendo sido informado do assunto e do fim da pesquisa **Comparação do perfil associado à virulência e da sensibilidade antifúngica entre amostras de CANDIDA sp em casos de colonização e infecção hospitalar** a ser realizado em parceria com a UNIFAL-MG, e devidamente informado, previamente, do modo como essa pesquisa deverá ser feita, **declaro que estou livre e inteiramente de acordo em participar dela**, sabedor (a) de que será guardada em segredo qualquer informação que eu fornecer sobre minha pessoa e podendo deixar de participar dela quando bem quiser.

Portanto, concordo em participar desta pesquisa, renunciando neste ato, a qualquer indenização por danos morais e concordando que as amostras obtidas sejam utilizadas com a finalidade de pesquisa e que os dados resultantes sejam divulgados desde que seja preservada minha identidade.

Alfenasdede

.....
 (assinatura do participante ou de seu responsável)

Profa Dra Amanda L. T. Dias

Orientadora

Alessandro Vieira Ferreira

Mestrando

APÊNDICE C - Ensaios com *Candida* spp provenientes de fontes de colonização

N°	Amostra	Chromagar Candida Interpretação	<i>E-Test</i> µg/mL				Hemólise				Biofilme			
			1ª Leitura		2ª Leitura		1ª	2ª	3ª	4ª	405 nm		XTT 490 nm	
			Fluc	Anfo	Fluc	Anfo					Abs	Índice	Abs	Índice
500	L.C	<i>C.albicans</i>	0,125	0,190	0,125	0,190	γ	γ	α	α	0,138	68,7	0,050	16,0
501	L.C.	<i>C.lusitaniae</i>	0,500	0,125	0,500	0,125	γ	γ	γ	α	0,110	54,7	0,138	44,2
504	Jaleco	<i>C.tropicalis</i>	1,000	0,094	0,750	0,190	γ	γ	β	β	0,120	59,7	0,126	40,4
505	A.A	<i>C.albicans</i>	0,190	0,064	0,047	0,064	α	β	β	β	0,144	71,6	0,065	20,8
506	A.A	<i>C.famata</i>	0,500	0,190	0,500	0,190	γ	α	β	β	0,132	65,7	0,248	79,5
513	MP	<i>C.ciferri</i>	0,250	0,190	0,250	0,190	γ	γ	γ	γ	0,127	63,2	0,284	91,0
521	Jaleco	<i>C.albicans</i>	0,064	0,064	0,064	0,094	γ	γ	γ	γ	0,115	57,2	0,110	35,3
522	Jaleco	<i>C. tropicalis</i>	0,500	0,125	0,500	0,125	γ	γ	γ	γ	0,133	66,2	0,082	26,3
523	Jaleco	<i>C. lusitaniae</i>	0,380	0,190	0,380	0,125	γ	γ	γ	γ	0,138	68,7	0,196	62,8
524	Jaleco	<i>C. lusitaniae</i>	0,250	0,190	0,250	0,190	γ	γ	γ	γ	0,066	32,8	0,152	48,7
526	Jaleco	<i>C. albicans</i>	0,094	0,094	0,094	0,094	γ	γ	γ	γ	0,155	77,1	0,058	18,6
528	MP	<i>C.ciferri</i>	0,500	0,190	0,500	0,250	γ	γ	γ	γ	0,165	82,1	0,106	34,0
529	MP	<i>C.tropicalis</i>	0,500	0,094	0,500	0,125	γ	γ	γ	γ	0,162	80,6	0,050	16,0
530	MP	<i>C.tropicalis</i>	0,125	0,094	0,094	0,094	γ	γ	β	β	0,120	59,7	0,068	21,8
531	Interruptor	<i>C. lusitaniae</i>	0,125	0,380	0,125	0,380	γ	γ	β	β	0,194	96,5	0,116	37,2
532	Interruptor	<i>C.tropicalis</i>	0,190	0,190	0,190	0,190	γ	γ	γ	γ	0,192	95,5	0,006	1,9
533	MP	<i>C.tropicalis</i>	0,380	0,190	0,500	0,190	γ	γ	γ	γ	0,168	83,6	0,044	14,1
534	Interruptor	<i>C. famata</i>	0,250	0,250	0,500	0,190	γ	γ	γ	γ	0,135	67,2	0,098	31,4
535	Bandeja	<i>C. ciferri</i>	0,125	0,750	0,190	0,750	γ	γ	γ	γ	0,133	66,2	0,111	35,6
537	Mão	<i>C.lusitaniae</i>	0,250	0,125	0,094	0,125	γ	γ	α	α	0,026	12,9	0,110	35,3
538	Interruptor	<i>C. tropicalis</i>	0,500	0,125	0,750	0,125	γ	γ	γ	γ	0,182	90,5	0,208	66,7
539	Mão	<i>C. tropicalis</i>	0,380	0,500	0,380	0,500	γ	γ	α	α	0,188	93,5	0,064	20,5
540	Mão	<i>C.lusitaniae</i>	4,000	0,094	4,000	0,094	γ	γ	γ	γ	0,006	3,0	0,065	20,8
541	Mão	<i>C. lusitaniae</i>	1,000	0,190	0,750	0,250	γ	γ	γ	γ	0,138	68,7	0,192	61,5
542	Mão	<i>C. ciferri</i>	1,500	0,125	1,500	0,250	γ	γ	α	α	0,135	67,2	0,235	75,3
1002	MP	<i>C.parapsilosis</i>	1,500	0,064	2,000	0,094	γ	γ	γ	γ	0,169	84,1	0,123	39,4
1003	MP	<i>C.parapsilosis</i>	1,500	0,125	1,500	0,125	γ	γ	γ	γ	0,141	70,1	0,296	94,9
1006	MP	<i>C. lusitaniae</i>	2,000	0,064	3,000	0,125	γ	γ	γ	γ	0,140	69,7	0,100	32,1
1007	Interruptor	<i>C.parapsilosis</i>	3,000	0,064	3,000	0,094	γ	γ	γ	γ	0,153	76,1	0,115	36,9
1008	MP	<i>C. tropicalis</i>	0,500	0,125	0,750	0,125	γ	γ	γ	γ	0,155	77,1	0,155	49,7
1009	Interruptor	<i>C. lusitaniae</i>	3,000	0,064	3,000	0,094	γ	γ	γ	γ	0,156	77,6	0,100	32,1
1012	MP	<i>C.parapsilosis</i>	2,000	0,094	3,000	0,094	γ	γ	γ	γ	0,068	33,8	0,098	31,4
1013	Interruptor	<i>C. tropicalis</i>	0,380	0,125	0,380	0,125	γ	γ	γ	γ	0,139	69,2	0,060	19,2
1014	Interruptor	<i>C. lusitaniae</i>	3,000	0,064	4,000	0,094	γ	γ	γ	γ	0,120	59,7	0,117	37,5

Continua...

Quadro 2 (Continuação)

1017	Jaleco	<i>C.guilliermondii</i>	1,500	0,250	1,500	0,380	γ	γ	γ	γ	0,138	68,7	0,205	65,7
1018-A	Jaleco	<i>C.tropicalis</i>	0,250	0,047	0,250	0,094	γ	γ	γ	γ	0,149	74,1	0,157	50,3
1018-B	Jaleco	<i>C. lusitaniae</i>	1,500	0,064	1,500	0,190	γ	γ	γ	γ	0,153	76,1	0,212	67,9
1019	Jaleco	<i>C. parapsilosis</i>	1,500	0,094	1,500	0,094	β	β	β	β	0,140	69,7	0,282	90,4
1020	Jaleco	<i>C. albicans</i>	0,094	0,190	0,094	0,190	γ	γ	γ	β	0,134	66,7	0,029	9,3
1021-A	Jaleco	<i>C. lusitaniae</i>	1,000	0,190	1,500	0,250	γ	γ	γ	γ	0,140	69,7	0,279	89,4
1021-B	Jaleco	<i>C. lusitaniae</i>	0,750	0,250	1,000	0,250	γ	γ	γ	γ	0,148	73,6	0,185	59,3
1022-A	Jaleco	<i>C. parapsilosis</i>	0,750	0,125	0,750	0,125	γ	γ	γ	γ	0,150	74,6	0,238	76,3
1022-B	Jaleco	<i>C. lusitaniae</i>	4,000	0,094	4,000	0,094	γ	γ	γ	γ	0,085	42,3	0,621	199,0
1034	MP	<i>C. lusitaniae</i>	6,000	0,125	6,000	0,125	γ	α	α	α	0,201	100,0	0,245	78,5
1046	Interruptor	<i>C. lusitaniae</i>	0,190	0,094	0,190	0,094	γ	γ	γ	γ	0,146	72,6	0,700	224,4

APÊNDICE E - Comparação entre as fontes de infecção e colonização pelas espécies de *Candida* spp

Amostra	Origem	Chromagar Candida		45°	E-Test µg/mL				Hemólise				Biofilme			
					1ª Leitura		2ª Leitura						405 nm		XTT 490 nm	
					Nº	Interpretação	Cor	Fluc	Anfo	Fluc	Anfo	1ª	2ª	3ª	4ª	Abs
221-V	PC	<i>Candida albicans</i>	Verde	P	0,094	0,064	0,064	0,047	α	β	β	β	0,145	72,1	0,026	8,3
505	A.A	<i>Candida albicans</i>	Verde	P	0,190	0,064	0,047	0,064	α	β	β	β	0,144	71,6	0,065	20,8
31	PC	<i>Candida albicans</i>	Verde	P	0,750	0,047	1,000	0,125	β	β	β	β	0,170	84,6	0,109	34,9
1020	Jaleco	<i>Candida albicans</i>	Verde	P	0,094	0,190	0,094	0,190	γ	γ	γ	β	0,134	66,7	0,029	9,3
100	Hemo	<i>Candida guilliermondii</i>	Branca		0,750	0,064	0,750	0,190	γ	γ	γ	γ	0,136	67,7	0,166	53,2
1017	Jaleco	<i>Candida guilliermondii</i>	Branca		1,500	0,250	1,500	0,380	γ	γ	γ	γ	0,138	68,7	0,205	65,7
295	Hemo	<i>Candida lusitanae</i>	Branca		0,380	0,064	0,500	0,094	γ	γ	γ	γ	0,130	64,7	0,270	86,5
1021-A	Jaleco	<i>Candida lusitanae</i>	Branca		1,000	0,190	1,500	0,250	γ	γ	γ	γ	0,140	69,7	0,279	89,4
288	PC	<i>Candida lusitanae</i>	Branca		0,380	0,064	0,250	0,094	γ	γ	γ	γ	0,138	68,7	0,229	73,4
1018-B	Jaleco	<i>Candida lusitanae</i>	Branca		1,500	0,064	1,500	0,190	γ	γ	γ	γ	0,153	76,1	0,212	67,9
389	PC	<i>Candida lusitanae</i>	Branca		0,500	0,064	0,190	0,125	γ	γ	γ	γ	0,140	69,7	0,112	35,9
1006	Mão	<i>Candida lusitanae</i>	Branca		2,000	0,064	3,000	0,125	γ	γ	γ	γ	0,140	69,7	0,100	32,1
315	Hemo	<i>Candida parapsilosis</i>	Branca		0,750	0,032	0,380	0,125	γ	γ	γ	γ	0,142	70,6	0,212	67,9
1022-A	Jaleco	<i>Candida parapsilosis</i>	Branca		0,750	0,125	0,750	0,125	γ	γ	γ	γ	0,150	74,6	0,238	76,3
280	Hemo	<i>Candida parapsilosis</i>	Branca		S/L	S/L	6,000	0,064	α	β	β	β	0,158	78,6	0,138	44,2
1007	Interruptor	<i>Candida parapsilosis</i>	Branca		3,000	0,064	3,000	0,094	γ	γ	γ	γ	0,153	76,1	0,115	36,9
391	PC	<i>Candida tropicalis</i>	Azul		4,000	0,032	4,000	0,064	γ	γ	γ	α	0,191	95,0	0,016	5,1
398	Hemo	<i>Candida tropicalis</i>	Azul		1,000	0,125	1,000	0,125	γ	γ	γ	γ	0,173	86,1	0,065	20,8
532	Interruptor	<i>Candida tropicalis</i>	Azul		0,190	0,190	0,190	0,190	γ	γ	γ	γ	0,192	95,5	0,006	1,9
529	Mão	<i>Candida tropicalis</i>	Azul		0,500	0,094	0,500	0,125	γ	γ	γ	γ	0,162	80,6	0,050	16,0
124	PC	<i>Candida tropicalis</i>	Azul		1,000	0,064	2,000	0,094	α	α	α	β	0,110	54,7	0,050	16,0
530	Mão	<i>Candida tropicalis</i>	Azul		0,125	0,094	0,094	0,094	γ	γ	β	β	0,120	59,7	0,068	21,8

ANEXO

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da UNIFAL-MG



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 - Alfenas/MG - CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000 - Fax: (35) 3299-1063

**DECLARAÇÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alfenas UNIFAL- MG declara para os fins que se fizerem necessário que o projeto de pesquisa **COMPARAÇÃO DO PERFIL ASSOCIADO À VIRULÊNCIA E DA SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA ENTRE AMOSTRAS DE *Candida sp* EM CASOS DE COLONIZAÇÃO E INFECÇÃO HOSPITALAR** da Profa. Dra. Arianda Latércia Tanches Dias protocolo nº 23087.003445/2009-81 foi devidamente apreciado e aprovado por este Comitê.

Por ser verdade, firmo a presente Declaração.

Alfenas, 17 de setembro de 2009.


Profa. Elisabeth Pizzamiglio Vieira
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
UNIFAL-MG