



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

NATÁLIA DE SOUZA BOTELHO

**CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE
DIALISATO E MORCEGOS URBANOS**

Londrina
2008

NATÁLIA DE SOUZA BOTELHO

**CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE
DIALISATO E MORCEGOS URBANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Sueli Fumie Yamada Ogatta.

Londrina
2008

NATÁLIA DE SOUZA BOTELHO

**CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE DIALISATO E
MORCEGOS URBANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Sueli Fumie Yamada Ogatta.
UEL – Londrina – PR

Prof^a. Dr^a. Terezinha I. Estivalet Svidzinski
UEM – Maringá – PR

Prof. Dr. Luciano Aparecido Panágio
UEL – Londrina – PR

Londrina, ____ de _____ de 2008.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e minha irmã, que mesmo a mais de 1000 km de distância, sempre me ajudam a ser uma pessoa melhor.

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo amor, confiança e apoio.

À Prof.^a Dr.^a Sueli Fumie Yamada Ogatta por todos os ensinamentos, por ser um exemplo de dedicação e amor à ciência. Obrigada por fazer parte da minha vida.

Prof.^a Dr.^a Terezinha I. Estivalet Svidzinski e ao Prof.Dr. Luciano Aparecido Penágio pelas correções e sugestões preciosas.

Às professoras Viviane Krominski Graça de Souza e Lucy Megumi Yamauchi, por toda ajuda no laboratório, pelos conselhos e amizade.

À todos os professores e funcionários da UEL, pelo esforço no cumprimento de seus trabalhos.

A todos os colegas de laboratório, obrigada pela companhia, ajuda (principalmente com camundongos...), pelas risadas e amizade. O tempo no laboratório passa muito rápido quando existem pessoas como vocês por perto. Vou sentir saudades de todos! Agradecimento especial ao Ediel, por toda ajuda e sempre com um sorriso.

Também não poderia deixar de agradecer à panelinha das leveduras:

Suelen, minha companheira de caçadas noturnas! Muito obrigada! Como eu sempre digo: o que seria de mim sem você!!!

Renatinha! Se você não existisse, eu te inventava! Obrigada pelas “placas emprestadas”, pelas risadas e dicas “fashion”.

Vanessa, o que eu posso dizer? Vou sentir muita falta de todos nossos momentos juntas... Foram tantos e tão divertidos! Obrigada pela amizade de todas as horas (até de madrugada!), pela ajuda no laboratório, pelas macarronadas e pelos abraços também!

Aos meus companheiros de mestrado... Muita sorte para todos nós!

Aos morcegueiros: Lorena Bália e Isaac Passos. Obrigada pelos ensinamentos “noturnos” e pela grande paciência! Vocês me fizeram amar cada vez mais nossos amiguinhos peludos.

Ao meu namorado, Juliano, pelo carinho, por estar ao meu lado e me ajudar a ver sempre o lado bom das coisas.

As minhas amigas Fabíola, Nilse e Ana pela companhia durante esse ano. E à Haruka por ser a gatinha mais carinhosa que já existiu...

Aos queridos Eugênio, Lídia, Marília, Angelica e Andréia pelas cartas, telefonemas e conversas na internet, esforço para que a distância não atrapalhasse nem um pouco nossa amizade.

Agradeço a Deus, pela oportunidade que me foi dada, por eu ter uma família maravilhosa, e por todas essas pessoas já citadas, que fazem a minha vida ser cada vez mais feliz.

"Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante."

Albert Schweitzer (Nobel da Paz –(1952)

BOTELHO, Natália de Souza. **Caracterização de leveduras isoladas de dialisato e morcegos urbanos**. 2008. 104 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

As leveduras são organismos eucariotos, unicelulares, presentes nos mais diversos ambientes. Em pessoas saudáveis, as leveduras vivem como comensais, mas, na presença de certos fatores de risco esses microrganismos podem levar ao desenvolvimento de infecções localizadas ou sistêmicas. Em vista do exposto, o principal objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial patogênico de leveduras isoladas de dois ambientes distintos. Nos dois trabalhos, a identificação das leveduras foi realizada através de métodos fenotípicos padrões. Em geral, foram ainda analisados os seguintes parâmetros: perfil de sensibilidade a agentes antimicrobianos, fatores de virulência como, atividade de protease, fosfolipase e hemolisina, e formação de biofilme. No primeiro trabalho, foi estudada uma amostra de levedura isolada de dialisato utilizado em unidade de hemodiálise. Essa amostra foi identificada como *C.famata*. No segundo trabalho, foi realizado o estudo de leveduras presentes na porção inferior do trato gastrointestinal de morcegos. Foram encontradas as seguintes espécies: *C.lusitanaeae*, *C.krusei*, *C.parapsilosis*, *C.guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *C.pelliculosa*. Independente da origem dos isolados, todos apresentaram atividade de protease, foram negativos para fosfolipase e apresentaram capacidade para formação de biofilme. Os valores médios dos isolados não diferiram significativamente entre os ensaios de protease e biofilme, embora três isolados de dialisato (D9, D12sa, D16) apresentassem alta capacidade de formação de biofilme. Em relação a atividade hemolítica, todos os isolados de morcego produziram alfa-hemólise em presença de sangue de carneiro. Somente duas amostras provenientes de dialisato apresentaram alfa-hemólise (D12 e D12sa) e as demais foram consideradas positivas (beta-hemólise). Os resultados obtidos no nosso trabalho sugerem, de uma maneira geral, um potencial patogênico para as leveduras isoladas de dialisato. Outros estudos deverão ser realizados para avaliar o papel dessas espécies no desenvolvimento de processos infecciosos no homem. Com relação os morcegos urbanos, a presença de leveduras potencialmente patogênicas nas fezes desses animais aumenta os riscos de infecção em pacientes debilitados. Portanto a presença de morcegos em centros urbanos ou habitados deve ser controlada, uma vez que podem ser fontes de infecção humana.

Palavras-chave: Leveduras. Dialisato. Morcegos.

BOTELHO, Natália de Souza. **Caracterização de leveduras isoladas de dialisato e morcegos urbanos**. 2008. 104 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

Yeasts are microorganisms eukaryotic present in many environments. In healthy people yeasts are commensals, but, there are certain risks factors that may lead to an infection. The aim of this study was to analyze the potential virulence attributes of yeasts isolated from two distinct environments. In both papers, yeasts identification was performed through standard mycological methodology. In addition, it some parameters were studied, as: antifungal susceptibility, virulence factors (enzymes production, biofilm formation). In the first study, we characterized a sample isolated from dialysate used in hemodialysis treatment. This isolate was identified as *C.famata*. In the second paper, we studied yeasts isolated from bats anus. The samples were identified as: *C.lusitanae*, *C.krusei*, *C.parapsilosis*, *C.guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *C.pelliculosa*. All isolates (including the dialysate one) presented protease production, showed no phospolipase activity and were capable to form biofilm. In the hemolins production test, all bats' isolates presented alpha-hemolysis. Only two samples obtained from dialysate presented beta-hemolysis. The results obtained in our study suggest a pathogenic potential to yeasts isolated from dialysate. Regarding to bats, the presence of potentially pathogenic yeasts in its feces increases the risk of infection in imunocompromised patients. In this way, more studies must be conducted to gain more information about those yeasts and the best way to avoid contamination.

Keywords: Yeasts. Dialysate. Bats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Aspectos morfológicos de fungos	16
Figura 2 – Morfologia de leveduras	17
Figura 3 – Crescimento de diferentes espécies de <i>Candida</i> em meio CHROMagar.	21
Figura 4 – Hifa de <i>C. albicans</i> em epitélio do estômago de camundongo.....	25
Figura 5 – Estrutura química dos derivados triazólicos em uso clínico	30
Figura 6 – Estrutura química dos derivados poliênicos.	32
Figura 7 – Esquema do processo de hemodiálise.....	35
Figura 8 – Famílias de morcegos mais comumente encontradas no Paraná...	43
Figura 9 – Microscopia de luz dos isolados de morcegos urbanos	50
Figura 10 – Curva de crescimento das leveduras isoladas de morcego	51
Figura 11 – Formação de biofilme (% de transmitância bloqueada).	52
Figura 12 – Análise da atividade proteolítica dos isolados.....	52
Figura 13 – Comparação entre as populações com relação aos fatores de virulência	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Características diferenciais entre <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i>	19
Tabela 2	– Microrganismos que apresentam resistência inata a antifúngicos ..	33
Tabela 3	– Comparação entre a composição do dialisato e do plasma sanguíneo	35
Tabela 4	– Limites aceitáveis para presença de bactéria e endotoxina em água e dialisato utilizado em tratamento de hemodiálise	36
Tabela 5	– Padrão de qualidade microbiológico e químico da água tratada para preparo de solução de diálise.	37
Tabela 6	– Exemplos de fungos isolados de excretas ou órgãos de morcegos	45
Tabela 7	– Caracterização de amostras de leveduras isoladas de dialisato e morcegos	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American type culture collection
°C	grau Celsius
Ca⁺⁺	íon cálcio
CH₂COO⁻	íon acetato
CIM	concentração inibitória mínima
Cl	íon cloreto
EDTA	ácido etileno-diamino-tetracético
EU	Unidade de endocitocinas
G	grama
HC	ácido clorídrico
K⁺	íon potássio
L	litro
Mg⁺⁺	íon magnésio
µg	micrograma
µL	microlitro
mEq	miliequivalente
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
ng	nanograma
nm	nanômetro
Na⁺	íon sódio
PBS	tampão fosfato
Rpm	rotações por minuto
S	Svedberg
SAP	aspartil-protease
SDS	dodecil sulfato de sódio
UFC	unidade formadora de colônias
V	volts
V	volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	FUNGOS	15
2.1.1	Características gerais	15
2.1.2	Gênero <i>Candida sp.</i>	17
2.1.3	Fatores de Virulência de Leveduras do Gênero <i>Candida sp.</i>	22
2.1.4	Antifúngicos	28
2.2	HEMODIÁLISE	34
2.2.1	Definição e Funcionamento	34
2.2.2	Infecções Associadas ao Tratamento de Hemodiálise	38
2.3	MORCEGOS	41
2.3.1	Características Gerais	41
2.3.2	Morcegos e Fungos Patogênicos	44
3	ANÁLISE GERAL DOS RESULTADOS	46
3.1	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS	46
3.2	CARACTERIZAÇÃO DAS LEVEDURAS	49
3.3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
	REFERÊNCIAS	55
	ANEXOS	72
	ANEXO A	73
	ANEXO B	90

1 INTRODUÇÃO

As leveduras são organismos eucariotos, unicelulares, presentes nos mais diversos ambientes. Esses microrganismos podem ser encontrados em ambientes aquáticos, no solo, no trato gastrointestinal de diversas espécies de animais e até mesmo em associação com plantas (SIDRIM; ROCHA, 2004). Uma característica marcante das leveduras é a sua capacidade de adaptação em ambientes com alta osmolaridade, ou seja, onde há grande concentração de sais ou açúcares. Além disso, apresentam outras características que possibilitam sua permanência em ambientes inóspitos. Por exemplo, adesinas são moléculas presentes na superfície celular e permitem a permanência das células sobre um substrato, mesmo em presença de fluxo de água (LOPANDIC et al., 2006).

Em pessoas saudáveis, as leveduras vivem como comensais, não causando danos e até mesmo protegendo o nosso organismo de possíveis patógenos. Mas, na presença de certos fatores de risco, como: terapia prolongada com antibióticos ou corticosteróides, presença de cateteres (hemodiálise, diálise peritoneal, sondas), nutrição parenteral (ODDS *et al.* 2007), diabetes mellitus, AIDS e funções fagocitárias alteradas (WEIG *et al.*, 1998); esses microrganismos podem levar ao desenvolvimento de infecções localizadas ou sistêmicas (WEIG *et al.*, 1998). As micoses invasivas provocam uma grande variedade de manifestações clínicas, incluindo fungemia, endoftalmite, osteomielite, endocardite, meningite, infecções esplênica e hepática. A fungemia causada por *Candida* tem sido a micose sistêmica mais freqüente nos últimos anos (QUINDOS *et al.* 2007).

Em vista do exposto, o principal objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial patogênico de leveduras isoladas de dois ambientes distintos. No primeiro trabalho, foi estudada uma amostra de levedura isolada de dialisato utilizado em unidade de hemodiálise. Pacientes em tratamento de hemodiálise apresentam risco elevado de contrair infecções oportunistas, principalmente devido ao seu estado imunológico. A presença de microrganismos na água utilizada em unidades de hemodiálise pode levar a complicações indesejadas, debilitando ainda mais o paciente. Dessa forma, é importante que haja extremo cuidado na limpeza dos equipamentos e na higiene da equipe médica, assim como o monitoramento

constante quanto à presença de microrganismos na água utilizada para o preparo do dialisato.

No segundo trabalho, foi realizado o estudo de leveduras presentes na porção inferior do trato gastrointestinal de morcegos. A região de Londrina-PR apresenta problemas ambientais relacionados à urbanização, como poluição e desmatamento. Essas situações contribuem para um desequilíbrio ecológico, favorecendo o aumento nas populações de animais como ratos, baratas, pombos e morcegos. Esses animais são cosmopolitas, são altamente móveis e podem abrigar-se em ambientes domiciliares, aumentando assim a probabilidade de contato com o homem. Morcegos e ratos são de particular interesse, pois, sendo mamíferos, possuem certas semelhanças com o homem e, portanto, podem ser susceptíveis ou ser colonizados por patógenos humanos, tornando-se transmissores ou reservatórios, respectivamente. Dessa forma, a análise da microbiota de morcegos urbanos deve ser aprofundada, de forma a alertar para a disseminação de patógenos, e evitar a contaminação através de medidas sanitárias e de urbanização controlada.

Nos dois trabalhos a identificação das leveduras foi realizada através de métodos fenotípicos padrões. Em geral, foram ainda analisados os seguintes parâmetros: perfil de sensibilidade a agentes antimicrobianos, fatores de virulência como, atividade de protease, fosfolipase e hemolisina, e formação de biofilme.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FUNGOS

2.1.1 Características Gerais

Durante muito tempo os fungos foram considerados como vegetais, sendo a partir de 1969 classificados em um reino a parte, Fungi. Suas principais características incluem: são organismos eucariotos uni ou multicelulares heterotróficos, não sintetizam pigmento fotossintético, não possuem celulose na parede, armazenam glicogênio como material de reserva e obtêm seus nutrientes por absorção.

Os fungos podem ser encontrados no solo, na água, como componente da microbiota normal de animais e em material orgânico em decomposição. Esses organismos participam de vários processos biológicos na natureza, sendo a maioria benéfica para o homem. Eles são importantes decompositores e participam na reciclagem da matéria orgânica. Podem ser empregados como controle biológico de vários fitopatógenos, contribuem na produção de alimentos, bebidas e metabólitos secundários farmacologicamente ativos, tais como vitaminas, antibióticos e substâncias imunossupressivas. Além disso, são úteis como sistema modelo para estudo de genética, fisiologia e biologia molecular de eucariotos. Entretanto, os fungos desempenham um papel importante como patógenos de plantas e de animais, inclusive o homem.

Morfologicamente, os fungos microscópicos podem se apresentar como leveduras ou filamentos (Figura 1). As leveduras são células arredondadas ou ovóides e geralmente formam colônias de aspecto cremoso em cultura em meio solidificado. Os fungos filamentosos se caracterizam por apresentar hifas vegetativas (que crescem ligadas ao substrato), responsáveis pela nutrição. Além de hifas aéreas que podem se diferenciar em estruturas reprodutivas assexuais. O conjunto de hifas, que podem ser septadas ou não, constitui o micélio. Alguns

fungos são dimórficos, isto é podem apresentar as duas formas em condições ambientes definidas (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Os critérios utilizados com maior frequência para classificação dos fungos baseiam-se na habilidade desses organismos reproduzirem-se sexualmente, assexualmente, ou por uma combinação de ambos. A classificação dos fungos baseada nas estruturas assexuais (fase anamórfica), envolve a análise de aspectos fenotípicos como morfologia e fisiologia. A segunda classificação é baseada na fase teleomórfica dos fungos, ou seja a presença de um ciclo reprodutivo sexual (GUARRO *et al.*, 1999).

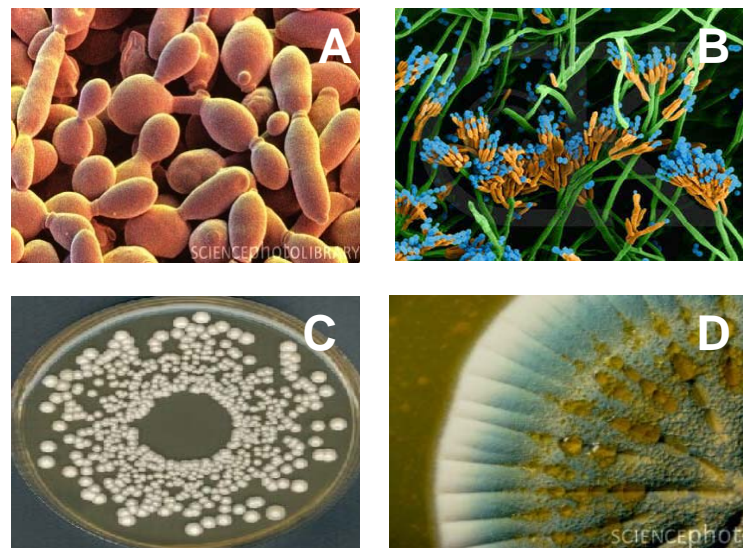


Figura 1 – Aspectos morfológicos de fungos. **A:** Blastocónídeos de *Saccharomyces cerevisiae* (x 4000); **B:** *Penicillium* spp., uma espécie de fungo filamentosos (x 1165). **C e D:** aspectos das colônias de *Saccharomyces* sp e *Penicillium notatum* respectivamente.

Fonte: Science Photo Library.

A classificação fenotípica das leveduras é baseada na presença ou ausência de cápsula, tamanho e forma das células, mecanismo de formação da célula filha (conidiogênese), formação de pseudo-hifas, hifas verdadeiras (Figura 2), formação de estruturas de resistência e reprodução. Além disso, características bioquímicas também são importantes para a identificação presuntiva das espécies. A morfologia é rotineiramente empregada para distinguir o gênero e a diferenciação

das espécies é realizada por meio da habilidade para assimilar e fermentar várias fontes de carbono e utilizar nitrato como uma fonte de nitrogênio (LACAZ *et al.*, 1991; SIDRIM; ROCHA, 2004; KURTZMAN; FELL, 1998).

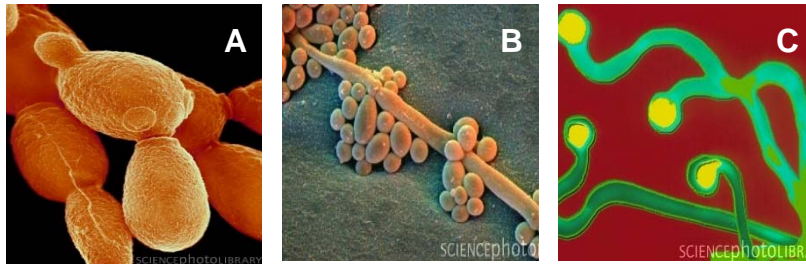


Figura 2 – Morfologia de leveduras. **A:** célula leveduriforme de *C.albicans*, apresentando regiões de brotamento (x 5500.). **B:** Blastoconídeos e pseudo-hifa de *C.albicans* (x 3000) **C:** hifas verdadeiras, responsáveis pela invasão dos tecidos do hospedeiro, *Candida* sp (aumento desconhecido).

Fonte: Science Photo Library.

2.1.2 Gênero *Candida* sp.

Algumas espécies de *Candida* fazem parte da microbiota normal de superfícies mucosas do trato gastrointestinal e genito-urinário de animais, inclusive o homem. Entretanto, podem ser responsáveis por uma variedade de quadros clínicos, desde infecções superficiais de mucosa, como candidíase vulvovaginal e orofaríngea, até infecções sistêmicas (REPENTIGNY, 2004).

Existem alguns fatores de risco relacionados ao hospedeiro que propiciam as infecções por leveduras, como: uso prolongado e indiscriminado de antimicrobianos de amplo espectro, uso de esteróides ou outras substâncias imunossupressoras, *diabetes mellitus*, AIDS e funções fagocitárias alteradas (WEIG *et al.*, 1998). Pacientes em tratamento dialítico apresentam risco elevado em adquirir infecções sistêmicas (ABBOTT; AGODOA, 2001; PASQUALOTTO *et al.*, 2005). A necessidade de se criar um acesso vascular utilizando-se de catéteres, para repetidas punções por períodos prolongados também contribui para esse quadro (POWE *et al.*, 1999; TOKARS *et al.*, 2001; SHARIFF *et al.*, 2004; SAXENA; PANHOTRA, 2005). Finalizando, alterações dos mecanismos de defesa do

hospedeiro que podem ser decorrentes de mudanças fisiológicas características da infância (prematuridade) e envelhecimento (DIGNANI; SOLOMKIN; ANAISSIE, 2003).

Espécies de leveduras do gênero *Candida*, principalmente *Candida albicans*, são os agentes oportunistas mais freqüentemente isolados dessas infecções (VAN BURIK; MAGEE, 2001). As infecções causadas por *Candida* podem ser divididas em duas classes principais: infecção superficial ou sistêmica. A candidíase superficial (mucosa ou cutânea) ocorre quando há um desequilíbrio nas condições locais, resultando em um aumento no número de células fúngicas, causando danos ou invasão do epitélio local. As infecções de mucosa são mais frequentes na cavidade oral (orofaringe - “sapinho” e esôfago – esofagite) e vaginal.

A identificação por métodos convencionais é trabalhosa e requer longo período de tempo. Estes métodos são baseados na micromorfologia das colônias, assimilação de açúcares e testes de fermentação (KURTZMAN; FELL, 1998). A formação de tubo germinativo em presença de soro *in vitro* e a produção de clamidoconídeos são utilizados em laboratório clínico como critérios preliminares para diferenciar *C. albicans* de espécies não-*albicans*.

É importante ressaltar que *C. dubliniensis* é uma nova espécie (SULLIVAN *et al.*, 1995), que produz clamidoconídeos e tubo germinativo, e durante muito tempo foi classificada como *C. albicans* atípica devido a outras características fenotípicas diferentes. A tabela 1 mostra algumas características distintas entre essas duas espécies.

Estudos epidemiológicos têm mostrado que *C. dubliniensis* está primariamente associada com colonização e infecções de orofaringe de pacientes portadores do vírus da imunodeficiência adquirida humana (HIV) ou com AIDS. Entretanto, em indivíduos saudáveis, raramente *C. dubliniensis* é isolada da microbiota oral e em casos de candidemia (SULLIVAN *et al.*, 2004). Isolados clínicos desse fungo são usualmente sensíveis aos agentes antifúngicos. Todavia, a resistência aos mesmos pode ser rapidamente induzida *in vitro* (MORAN *et al.*, 1997).

Tabela 1 – Características diferenciais entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*

Critério	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Produção de tubo germinativo	++	+
Produção de clamidosporos	+	++
Crescimento a 37 °C	++	++
Crescimento a 42 °C	++	-
Crescimento a 45 °C	+	-
Crescimento em caldo com 6,5% NaCL	+	-
Utilização de xilose	+	-
Utilização de lactato	+	-
Utilização de α -metil-D-glucosídeo	+	-
Utilização de trealose	+	±
Crescimento em CHROMagar Candida	Azul-esverdeada	Verde-escura
Crescimento em meio Pal	Colônia lisa	Colônia rugosa

++: Alto; +: Médio; -: Negativo; ±: Intermediário. Fonte: Sullivan *et al.* (2004), com modificações.

Vários meios seletivos diferenciais cromogênicos para identificação presuntiva das amostras de *Candida* foram desenvolvidos (ODDS; BERNAERTS, 1994; COOKE *et al.*, 2002; HORVATH *et al.*, 2003; ZU *et al.*, 2004). Esses meios contêm substratos que reagem com enzimas secretadas pelos fungos produzindo colônias com várias pigmentações. Essas enzimas são espécies-específicas, permitindo identificar os microrganismos através da cor e características da colônia (Figura 3).

A prevalência de outras espécies de *Candida* como agentes de candidíase tem aumentado nos últimos anos (COLOMBO *et al.*, 1999; HAYNES, 2001; GOLDAN; MARIO, 2003; GODOY *et al.*, 2003; COLOMBO *et al.*, 2006; NUCCI; COLOMBO, 2007). Um aspecto importante dessas espécies é a sensibilidade variada aos agentes antifúngicos utilizados na prática médica [derivados imidazólicos e poliênicos (MATHEMA *et al.*, 2001)]. Por exemplo, Cheng *et al.* (2005) observaram que pacientes apresentando candidemia por espécies não-*albicans* necessitavam de maiores concentrações de fluconazol para o tratamento da infecção, quando comparados com pacientes infectados por *C. albicans*. Ainda observaram que 61,5% dos pacientes infectados por *Candida glabrata* vieram a óbito, seguido por 41,2% de *C.albicans*. Além disso, alta taxa de mortalidade pode ser observada entre pacientes apresentando candidemia causada por *Candida tropicalis* (GOLDANI; MÁRIO, 2003; LEUNG *et al.*, 2002; WEINBERGER *et al.*,

2005). Em vista disso, a identificação do agente é importante para o planejamento terapêutico e estudos epidemiológicos dos quadros de candidíases.

Em uma amostragem realizada entre 1995 e 2003, em 4 hospitais de São Paulo, Da Matta *et al.* (2007) analisaram 1000 amostras de *Candida sp.* isoladas de sangue dos pacientes com fungemia. Nesse estudo, *C. albicans* permaneceu como o mais freqüente isolado mas candidas não-*albicans* contaram com 60% dos episódios de candidíase, sendo: 24.3% dos casos de *C. tropicalis*, 23.8% de *C. parapsilosis*, 4.4% de *C. glabrata*, 3% de *C. guilliermondii*, e 2.5% de *C. rugosa*.

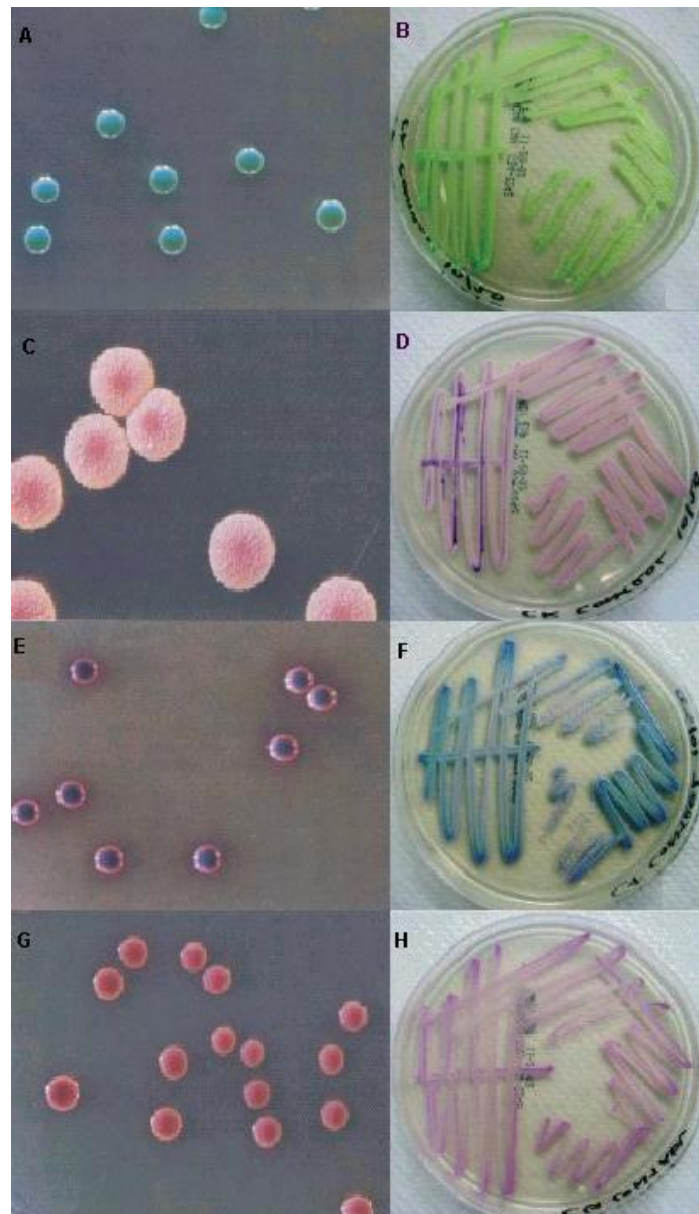


Figura 3 – Crescimento de diferentes espécies de *Candida* em meio CHROMagar. **A-B**: Colônias de *C. albicans* são lisas e verde-claras. **C-D**: *C. krusei* crescem formando colônias grandes, rugosas e de coloração rosa. **E-F**: Colônias azuis apresentando um halo de pigmentação púrpura ao seu redor são características de *C. tropicalis*. **G-H**: *C. glabrata* formam colônias pequenas, lisas e rosas.

Fonte: A, C, E, G – Odds & Bernaerts, (1994), com modificações. B, D, F, H – Horvath *et al.*, (2003), com modificações.

2.1.3 Fatores de Virulência de Leveduras do Gênero *Candida*

Estima-se que existam aproximadamente 100.000 espécies de fungos, sendo que pouco mais de 200 espécies são conhecidas como patógenos primários de humanos (SIDRIM & ROCHA, 2004). Entretanto com o avanço da medicina, a sobrevivência de pacientes debilitados vem aumentando com o decorrer dos anos. Realmente, infecções invasivas causadas por *Candida* spp. têm sido descritas em todo o mundo e estão se tornando uma importante causa de mortalidade em pacientes imunocomprometidos (PFALLER *et al.*, 1998; KAO *et al.*, 1999; COLOMBO *et al.*, 1999; DIEKEMA *et al.*, 2002; AL-HEDAITHY, 2003; HAJJEH *et al.*, 2004; LAUPLAND *et al.*, 2005; NUCCI & COLOMBO, 2007; VALENTIN *et al.*, 2007). A fonte mais comum de infecção são os próprios pacientes, especialmente a região do trato gastrointestinal e a pele. Os vetores exógenos de infecção são as mãos dos funcionários hospitalares e equipamentos médicos contaminados (RÜZICKA *et al.*, 2007). Como poucos fungos são conhecidos como “patógenos profissionais” os mecanismos de patogenicidade tendem a ser mais complexos e em geral representam adaptações de características pré-existentes no seu modo de vida comensal (VAN BURIK & MAGEE, 2001).

Os fatores de virulência são determinados geneticamente, porém expressos pelos microrganismos quando submetidos a condições específicas (TAMURA *et al.* 2007). Vários fatores de virulência têm sido estudados extensivamente, principalmente em *C. albicans*.

Entre os fatores de virulência de *Candida* spp. encontram-se a adesão às células e tecidos dos hospedeiros, secreção de enzimas hidrolíticas (proteases, fosfolipases e lipases), alteração fenotípica da morfologia celular e da colônia (switching fenotípico) e dimorfismo (CALDERONE; FONZI, 2001). Além desses fatores a formação de biofilme em superfícies bióticas e abióticas parece contribuir na patogenicidade das espécies de *Candida* (DOUGLAS, 2003; RAMAGE *et al.*, 2006).

O evento inicial na patogênese das doenças infecciosas é a adesão microbiana aos tecidos do hospedeiro. Alguns microrganismos permanecem aderidos à superfície epitelial enquanto outros promovem a invasão tecidual. Fatores

de adesão são importantes para a persistência de *C. albicans* na mucosa epitelial (STEHR *et al.*, 2000).

Vários genes que codificam proteínas com atividade de adesinas foram descritos na literatura. A expressão de α INT1 (GALE *et al.*, 1996) uma proteína transmembrana, promove a adesão de *S. cerevisiae* enquanto a inativação dos dois alelos α INT1 em *C. albicans* diminui significativamente a sua capacidade de adesão às células epiteliais cervicais humanas (HeLa). Além disso, a inativação de α INT1 inibe a formação de hifas e diminui a virulência do fungo em modelo de infecção intravenosa (GALE *et al.*, 1998). A família gênica ASL (“agglutinin sequence-like”) codifica glicoproteínas de superfície celular (HOYER *et al.*, 1998b) que estão ligadas às β 1,6-glucanas da parede celular. Esses genes são diferencialmente regulados por condições fisiologicamente relevantes *in vitro*, tais como, crescimento em meios de culturas diferentes (HOYER *et al.*, 1998a) e durante infecção experimental utilizando epitélio humano reconstituído oral (GREEN *et al.*, 2004). Hwpl (“hyphal wall protein I”) é uma manoproteína de parede celular com o domínio N-terminal exposto na superfície celular. Sua expressão é regulada durante a morfogênese de *C. albicans*, sendo diferencialmente expresso em tubos germinativos e formas filamentosas (STAAB *et al.*, 1996). A inativação do gene *HWPI* gera células fúngicas incapazes de formar complexos estáveis com as células epiteliais bucais do hospedeiro, sugerindo a participação da proteína Hwpl nesse processo. Além disso, esses mutantes apresentam capacidade reduzida em causar candidíase sistêmica em camundongos (STAAB *et al.*, 1999).

Os eventos que ocorrem após a adesão do fungo às células do hospedeiro não são completamente conhecidos. Provavelmente, a conversão das formas leveduriformes para hifas e pseudohifas e a secreção de enzimas hidrolíticas promovem a invasão dos tecidos subepitelial e subendotelial, atingindo o compartimento vascular.

A diferenciação celular entre forma leveduriforme para filamentososa (dimorfismo/morfogênese) de *C. albicans* pode ser induzida *in vitro*. Até o momento, nenhum fator específico indutor da diferenciação celular foi identificado. Alguns fatores ambientais podem favorecer a filamentação nessa levedura, tais como: temperatura entre 37 a 40 °C, pH ao redor de 7,0, células em fase estacionária de crescimento (AHRENS *et al.*, 1983), meio de cultura suplementado com 10 mM de

AMPc (BAHN; SUNDSTROM, 2001) e a presença de algumas substâncias químicas como N-acetil-D-glucosamina (CHO *et al.*, 1994), aminoácidos, biotina, compostos sulfidrilas, grupo heme, zinco e o soro. E ainda, altas concentrações de fosfato (superior a 600 mM) induzem o desenvolvimento de pseudohifas, que são observadas em baixa frequência em culturas *in vitro* (HORNBY *et al.*, 2004). Algumas observações conduzem a hipótese de que o dimorfismo é um fator de virulência para os fungos:

1. A formação de filamentos é estimulada a 37 °C, pelo soro e em pH 7,0, condições que mimetizam o ambiente humano.
2. Os tubos germinativos são mais aderentes às células de mamíferos quando comparadas às formas leveduriformes. A deleção do gene *HWP1* (STAAB *et als.*, 1999) produz um mutante incapaz de aderir a células epiteliais humanas.
3. As formas filamentosas são resistentes à lise pelos macrófagos. Após infecção de macrófagos (40 a 60 minutos) as células leveduriformes de *C. albicans*, transformam-se em pseudohifas que continuam o crescimento até o rompimento dos mesmos (LO *et al.*, 1997).
4. Para a maioria dos fungos dimórficos, as formas filamentosas parecem favorecer a invasão tecidual do hospedeiro. O crescimento das hifas pode gerar uma pressão significativa para a penetração dos tecidos [BRANDT *et al.*, 2007 (Figura 4)].
5. Expressão diferencial de genes que codificam para aspartil proteases, outro fator de virulência, durante a fase de filamentação (CHEN *et al.*, 2003) e correlação com capacidade de degradar e causar danos teciduais (SCHALLER *et al.*, 1999) e invasão de órgãos (FELK *et al.*, 2002).
6. A inativação de genes que participam do processo de filamentação diminui a virulência do fungo em modelos animais, tal como ocorre para os genes *TUP1* (BRAUN; JOHNSON, 1997) e *INT1* (GALE *et al.*, 1998).

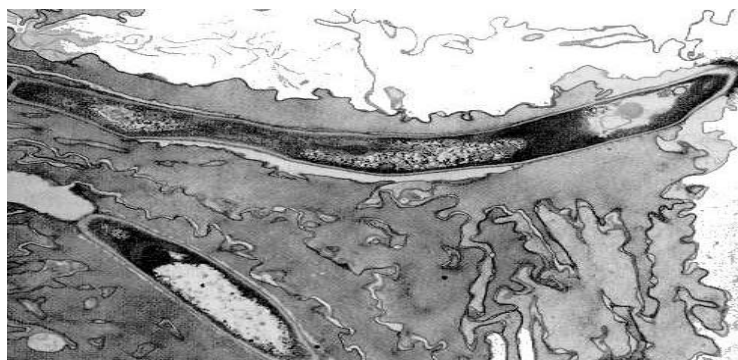


Figura 4 – Hifa de *C. albicans* em epitélio do estômago de camundongo (X 4.250).

Fonte: <http://www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch073.htm>.

Além da transição levedura-hifa, *C. albicans* é capaz de sofrer um tipo de mudança morfológica denominada “switching” fenotípico, facilmente visualizado através da morfologia colonial. Uma célula pode se multiplicar e dar origem a vários tipos de colônias diferentes, mesmo em ausência de um sinal específico. Esse fenômeno ocorre espontaneamente em frequência relativamente maior que a mutação. Antony *et al.* (2007) realizaram um estudo comparativo da expressão de fatores de virulência entre as diferentes morfologias coloniais de *C. albicans*. Esse trabalho mostrou que há uma variação no potencial virulento, dependendo da forma apresentada pela levedura. Além disso, essa elevada variação morfológica aumenta a chance de adaptação e sobrevivência em diversos ambientes dessas cepas, apresentando, portanto, certa vantagem em relação a outras menos variáveis.

As enzimas hidrolíticas estão envolvidas em processos nutricionais e metabólicos. Em processos infecciosos essas enzimas podem degradar moléculas e contribuir na invasão das células e tecidos do hospedeiro. Os danos teciduais e celulares nos sítios onde se encontram os organismos são características de muitas infecções causadas por fungos. Entre os fatores que contribuem para esse processo estão proteases, fosfolipases e lipases (van BURIK; MAGEE, 2001).

As aspartil proteases são enzimas da família pepsina, principais responsáveis pela atividade proteolítica extracelular de *C. albicans*. Os componentes dessa família caracterizam-se pela presença de dois domínios contendo o motivo Asp-Thr/Ser-Gly (ácido aspártico-treonina/serina-glicina) no qual os resíduos de ácido aspártico participam da atividade catalítica. Geralmente apresentam melhor

atividade em pH ácido e são especificamente inibidas por pepstanina A (DUNN, 2002). São diferencialmente expressas em processos infecciosos (STAIB *et al.*, 2000), e em condições ambientes distintas, por exemplo, expressão de Sap2 é mais acentuada em pH ácido, enquanto de Sap4/6 ocorre em pH neutro (HUBE *et al.*, 1994).

Secreção de proteases parece ter um papel importante na virulência de *C.albicans* (ANTONY *et al.* 2007). Sua função é lesar a integridade de proteínas estruturais e afetar o padrão arquitetônico dos tecidos (JAYATILAKE *et al.* 2006) e moléculas de defesa do hospedeiro (KAMINISHI *et al.*, 1995). Podem ainda, contribuir para a adesão ao tecido do hospedeiro (WATTS *et al.*, 1998; BORG-von ZEPPELLIN *et al.*, 1999). O uso de organismos mutantes tem mostrado que as SAP1, SAP2 e SAP3 contribuem significativamente na invasão do epitélio oral, vaginal e cutâneo (De BERNARDIS *et al.*, 1999a; SCHALLER *et al.*, 1999, 2000), enquanto as SAP4, SAP5 e SAP6 são importantes para infecções sistêmicas (FELK *et al.*, 2002; SANGLARD *et al.*, 1997). Vilanova *et al.* (2004) avaliaram Sap 2 como vacina em camundongos e obtiveram proteção imune contra infecção sistêmica por *C.albicans*.

Atividade proteolítica também foi encontrada na maioria das outras espécies de *Candida*, incluído *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (ZAUGG *et al.*, 2001; OKSUZ *et al.*, 2007).

O termo fosfolipases descreve um grupo heterogêneo de enzimas com habilidade de hidrolisar uma ou mais ligações éster em glicerofosfolipídeos. Essas enzimas também são secretadas por outros fungos, como *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans*, e ainda por muitas bactérias e protozoários patogênicos, como *Listeria* sp, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxoplasma gondii* e *Entamoeba histolytica* (SCHALLER *et al.*, 2005).

Ibrahim *et al.*, (1995) mostraram que isolados clínicos de *C. albicans* provenientes do sangue de pacientes com candidíase disseminada apresentaram maior atividade de fosfolipase quando comparado aos isolados de cavidade oral de indivíduos saudáveis (comensais). Por outro lado, Ribeiro *et al.* (2004) mostraram que amostras de *Candida* isoladas do trato respiratório de pacientes com candidíase sistêmica produzem maiores quantidades de fosfolipases do que as isoladas de sangue. Leidich *et al.*, (1998) mostraram que a deleção do gene *PLB1* reduz drasticamente a capacidade de invasão do fungo nas células hospedeiras.

O contato da levedura com uma superfície pode gerar, além da invasão tecidual, a formação de biofilme. Biofilmes são comunidades complexas de microrganismos ligados “irreversivelmente” a um substrato abiótico ou biótico, e embebidos em uma matriz de polímeros extracelulares (EPS) produzida pelos mesmos. Esses microrganismos podem apresentar fenótipo alterado em relação à taxa de crescimento e sensibilidade a determinados agentes antimicrobianos, estresse ambiental e fagocitose (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Segundo Chandra *et al.* (2001), a formação do biofilme de *C. albicans* ocorre basicamente em três fases distintas na superfície de uma lâmina de polimetilmetacrilato. Na fase inicial (0 a 11 horas), ocorre a predominância de blastoconídeos aderidos à superfície da lâmina, que aumentam em número com o decorrer do tempo, formando uma camada espessa de células (microcolônias do fungo). A fase intermediária (aproximadamente 12 a 30 horas) é caracterizada pela emergência e predominância de material não celular que recobre as microcolônias. Durante a fase de maturação, além dos blastoconídeos, hifas podem ser visualizadas em grande quantidade. A produção da EPS aumenta com o tempo de incubação e as comunidades estão completamente cobertas pela mesma. Essa EPS contém carboidratos, principalmente glicose, proteínas, fósforo e hexosamina (BAILLIE & DOUGLAS, 2000; AL-FATTANI & DOUGLAS 2006). Essa arquitetura também pode ser observada em biofilmes formados por outras espécies de *Candida*. Resultados recentes de nosso laboratório mostraram a cinética de formação do biofilme de *C. tropicalis*. Nas primeiras três horas, microcolônias distintas, compostas principalmente por células leveduriformes, são formadas na superfície de cateter de PVC (polyvinil chloride). Durante a fase de crescimento (6 – 24 h) grande quantidade de formas filamentosas pode ser observada e o biofilme maduro consiste de uma rede densa de leveduras e filamentos (BIZERRA *et al.*, 2007).

A maioria dos quadros de candidíase está associada com a formação de biofilme, seja em superfície abiótica (dispositivos médicos: cateteres, próteses, marca-passo) ou biótica (epitélio) (DONLAN & CONSTERTON, 2002; DOUGLAS, 2003; RAMAGE *et al.*, 2006; VALENTIN *et al.*, 2007).

Uma das características clinicamente mais marcantes do biofilme é a sua resistência aos antifúngicos e mecanismos de defesa do hospedeiro. Dessa forma, infecções associadas a formação de biofilme representam uma fonte

permanente de infecção de difícil tratamento Vários mecanismos são propostos para explicar essa resistência, tais como:

1. Efluxo dos antifúngicos por canais específicos (MUKHERJEE *et al.*, 2003);
2. Densidade celular elevada, dificultando a penetração dos agentes químicos (SAMARANAYAKE *et al.*, 2005; PERUMAL *et al.*, 2007);
3. A taxa de crescimento diminuída devido à limitação de nutrientes, afetando dessa forma a composição superficial das células e conseqüentemente a sensibilidade microbiana aos agentes antifungicos (KUMAMOTO, 2002).
4. Existência de células persistentes que são protegidas de todos os agentes antimicrobianos. Essas células não crescem nem morrem em presença dos antimicrobianos, exibindo tolerância aos mesmos (SHAH *et al.*, 2006).
5. Expressão diferencial de genes (MUKHERJEE *et al.*, 2003; BIZERRA *et al.*, 2007)

2.1.4 Antifúngicos

A terapia de uma micose sistêmica é muito difícil, especialmente quando a resistência aos antifúngicos é um dos fatores que contribuem para a falha do tratamento. Além da resistência, outros fatores, sendo eles relacionados ao hospedeiro -- estado imunológico, local e severidade da infecção, uso correto dos medicamentos, ou associados às características da droga -- dosagem, modo de ação (fungistático/fungicida), propriedades farmacocinéticas e interações medicamentosas (MAIDA *et al.*, 2007) contribuem para o sucesso do tratamento.

Numa comparação com infecções bacterianas, poucas drogas antifúngicas são disponíveis. Isso é atribuído à natureza eucariótica das células fúngicas e a dificuldade de encontrar alvos não compartilhados pelas células do hospedeiro humano (LI *et al.*, 2008). Por muitos anos, anfotericina B e flucitosina

foram os únicos agentes antifúngicos disponíveis para infecções invasivas (CATALAN & MONTEJO, 2006).

Os antifúngicos disponíveis podem ser agrupados em derivados azólicos, poliênicos, tiocarbamatos, alilaminas, griseofulvina e 5-fluorocitosina (MEINERZ, 2007). Componentes da parede celular ou membrana (quitina β -1,3 β 1,6-glucanas, ergosterol) têm sido os principais alvos das 5 classes de antifúngicos usadas atualmente, com exceção da fluocitosina, que apresenta um efeito antimetabólico (BALKIS *et al.*, 2002).

Os antifúngicos azólicos (Figura 5) inibem a síntese de ergosterol, sendo os mais usados atualmente. Entretanto seu uso é limitado, já que se trata de um fungistático e depende do sistema imune do paciente para eliminar a infecção, sendo, portanto, ineficiente em casos de neutropenia profunda ou imunossupressão (LI *et al.*, 2008).

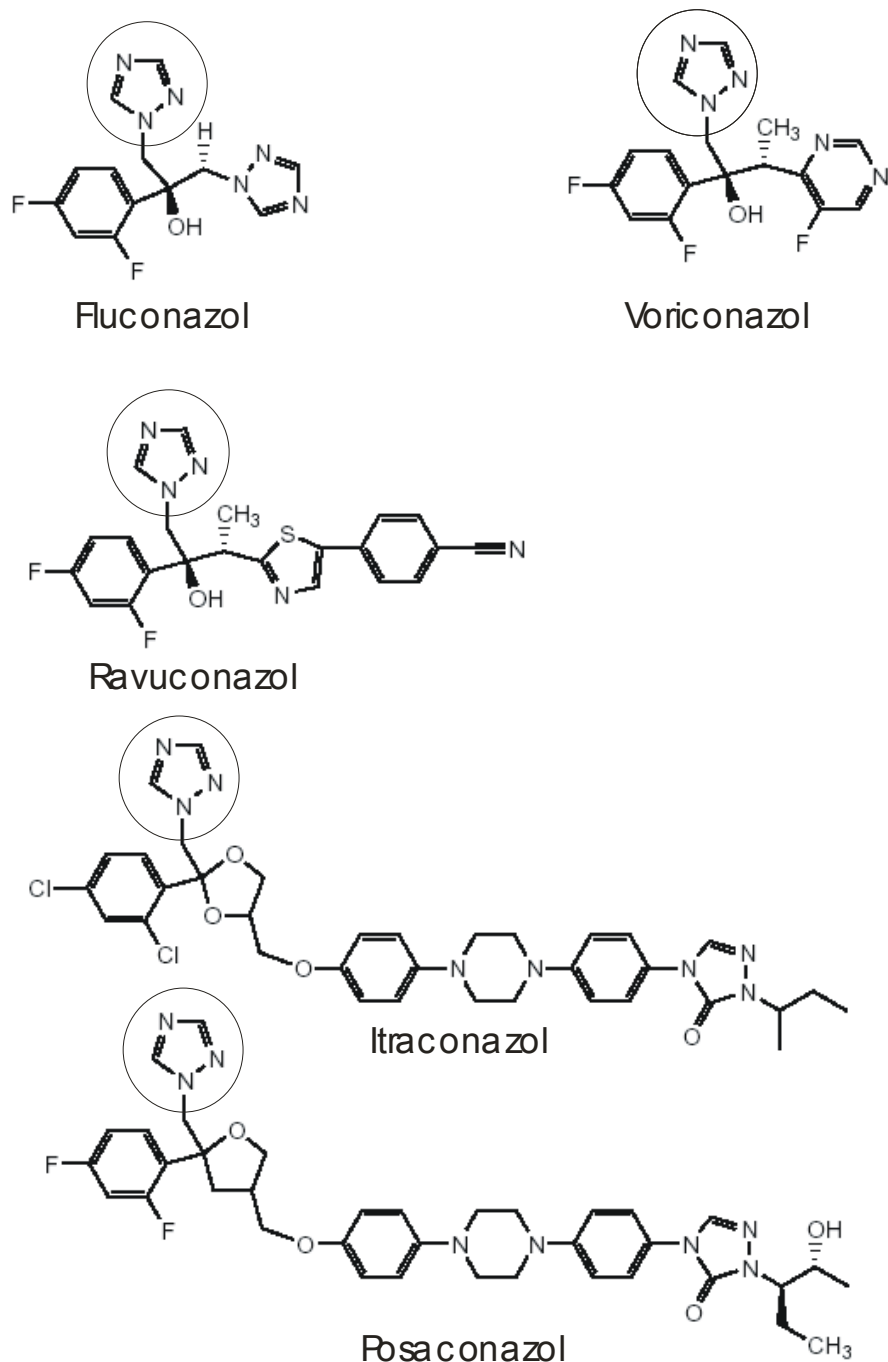


Figura 5 – Estrutura química dos derivados triazólicos em uso clínico. Voriconazol e ravuconazol são derivados triazólicos relacionados ao fluconazol. Enquanto o posaconazol é relacionado ao itraconazol. Em destaque a presença de três átomos de nitrogênio no anel azólico.

Fonte: <http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/fw/c783.htm>.

O uso continuado de azólicos, principalmente fluconazol, vem selecionando cepas intrinsecamente mais resistentes, dificultando o tratamento das infecções sistêmicas. Rana *et al.* (2004) relataram que pacientes que receberam

terapia preventiva com fluconazol desenvolveram candidemias por espécies não-*albicans*, sugerindo que o aumento na incidência de infecções por essas espécies esteja relacionado ao uso em larga escala desse antifúngico. Alguns mecanismos de resistência aos derivados azólicos têm sido propostos:

1. Ativação de bombas de efluxo com conseqüente diminuição no acúmulo dos antifúngicos no meio intracelular (ALBERTSON, 1996; WHITE, 1997a; 1998; SANGLARD, 1999; KONTOYIANNIS & LEWIS 2002; MORSCHHÄUSER, 2002);
2. Expressão aumentada dos genes que codificam as proteínas transportadoras do sistema de efluxo dos antifúngicos (FRANZ et al., 1998; WHITE et al., 2002)
3. Alteração da molécula alvo (14 α lanosterol demetilase) ou outras enzimas envolvidas na via de biossíntese do ergosterol (WHITE, 1997a; SANGLARD et al., 1998; WHITE et al., 2002);
4. Expressão aumentada de ERG11, gene que codifica a enzima 14 α lanosterol demetilase (WHITE, 1997b);
5. Alteração na via de biossíntese de ergosterol (SANGLARD et al., 2003).

Em um estudo recente, Uppuluri et al. (2008) apresentaram como hipótese para a resistência ao fluconazol a expressão aumentada de calcineurina. Calcineurina é uma fosfatase ativada por calmodulina, e controla vários processos fisiológicos das células fúngicas, como homeostase de cátions, morfogênese, sensibilidade a antifúngicos e virulência. Testes com fluconazol combinado com inibidores de calcineurina mostraram eficácia mesmo em células presentes em biofilmes, e resistentes ao fluconazol.

Voriconazol é um triazol de segunda geração, derivado do fluconazol, mas com potência e espectro de atividade antifúngica muito superiores (QUINDÓS et al., 2007). Em um estudo realizado por Da Matta et al (2007) voriconazol foi o triazol com maior atividade *in vitro* contra *Candida* sp. O itraconazol apresenta efeitos semelhantes ao fluconazol, mas seu efeito tóxico já foi observado, com aumento significativo das enzimas hepáticas. Seu uso prolongado aumenta a eliminação do fármaco no soro, contribuindo ainda mais para a toxicidade hepática (ODDS et al. 2004). Pozaconazol é um novo triazol com atividade *in vitro* contra fungos patogênicos, incluindo *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. e

Histoplasma spp. (CARRILLO-MUNOZ *et al.*, 2005). Em um estudo realizado por Cuenca-Estrella *et al.* (2006) pozaconazol apresentou alta atividade contra isolados de *Cryptococcus neoformans*, *Dipodascus* sp, *Saccharomyces* sp, *Trichosporon* sp, e *Rhodotorula* sp. Pozaconazole é o medicamento mais indicado para tratamento de infecções por espécies emergentes ou micoses causadas por isolados resistentes ao fluconazol.

A anfotericina B (Figura 6) é um antifúngico poliênico produzido naturalmente pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus* e, por aproximadamente 30 anos, era a única substância disponível para o controle de infecções graves causadas por fungos. O mecanismo preciso pelo qual o efeito fungicida desse fármaco ocorre ainda é obscuro, entretanto sua atividade está diretamente relacionada à desestabilização da membrana citoplasmática e extravazamento do conteúdo intracelular da célula fúngica sensível. Esse processo é resultado da ligação da anfotericina B ao ergosterol das membranas citoplasmáticas dos fungos. Apresenta atividade fungicida altamente eficaz e é a droga de escolha para pacientes imunocomprometidos, (FILIPPIN *et al.*, 2006). A desvantagem é sua toxicidade, reduzindo o fluxo sanguíneo para os túbulos renais e glomérulos (REDMOND *et al.*, 2007).

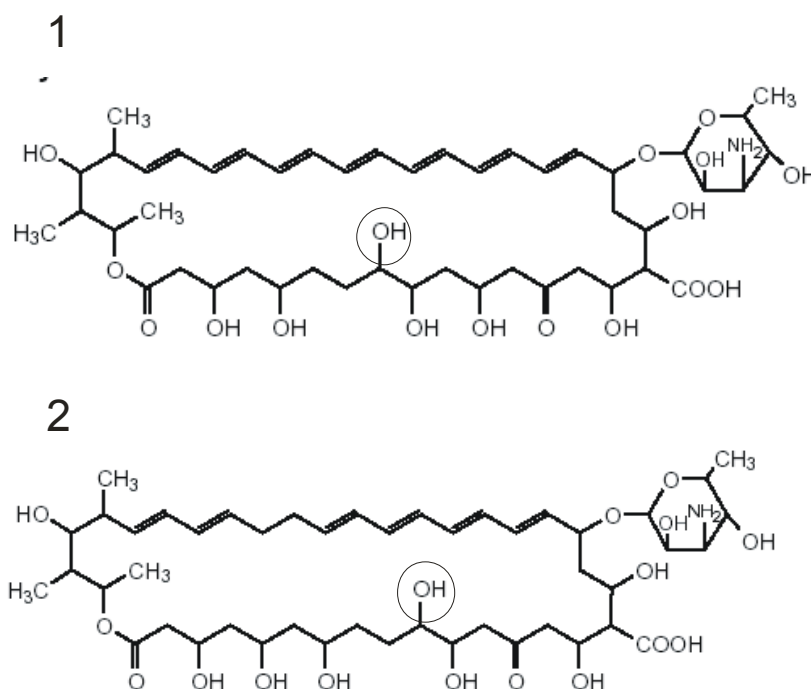


Figura 6 – Estrutura química dos derivados poliênicos. 1. Anfotericina B. 2. Nistatina. A diferença entre os fármacos reside na posição da hidroxila em destaque.

Fonte: <http://www.qb.fcen.uba.ar/microinmuno/SeminarioAntibioticos2.htm>.

Novos agentes antifúngicos, como as equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina.) são eficientes, porém de elevado custo (REDMOND *et al.*, 2007). Essas substâncias inibem a biossíntese da parede celular e são úteis em terapias para aspergiloses e candidíases invasivas, mas ainda não são usadas rotineiramente (SCHEINFELD, 2007). Carrillo-Munoz *et al.* (2008) testaram a atividade de caspofungina em 184 isolados clínicos de *Candida* sp. Seus resultados mostraram uma boa eficiência do antifúngico, com 72% dos isolados sensíveis a essa substância. Além disso, caspofungina tem mostrado atividade sobre células sésseis presentes em biofilmes fúngicos (BACHMANN *et al.*, 2002; KUHN *et al.*, 2002b; RAMAGE *et al.*, 2002b; CHOI *et al.*, 2007). Quando comparado com outros agentes antifúngicos eficazes em infecções sistêmicas, caspofungina apresentou tolerabilidade, com menor potencial de interação medicamentosa (AGARWAL *et al.*, 2006).

A resistência adquirida aos antifúngicos, como dito anteriormente, é um grave problema enfrentado atualmente. A Tabela 2 mostra exemplos de fungos que apresentam resistência inata aos agentes antifúngicos.

Tabela 2 – Microrganismos que apresentam resistência inata a antifúngicos.

Antifúngicos	Microrganismos resistentes
Anfotericina B	<i>Aspergillus terreus</i> , <i>Candida lusitanae</i> , <i>Trichosporon beigelli</i> , <i>Scedosporum prolificans</i>
Flucitosina	Todos os filamentosos, Zigomicetos, fungos dimórficos, <i>Trichosporon begelli</i> (não é usado isoladamente, devido a alta resistência)
Fluconazol	Fungos filamentosos, <i>C. krusei</i>
Itraconazol	<i>C. krusei</i>
Voriconazol	Zigomicetos, <i>Coccidioides immitis</i> , <i>Trichosporon</i> spp, <i>Fusarium</i> spp.
Equinocandina	Zigomicetos, <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Trichosporon</i> spp, <i>Fusarium</i> spp.

Fonte: Redmond *et al.* (2007).

2.2 HEMODIÁLISE

2.2.1 Definição e Funcionamento

Hemodiálise é o procedimento utilizado para a substituição artificial dos rins em pacientes com insuficiência renal aguda ou crônica, ou ainda que apresentam intoxicação por barbitúricos, hipercalemia, hipernatremia, acidose metabólica, hiperamonemia e hiperbilirrubinemia. O paciente com insuficiência renal grave (aguda ou crônica), em geral, tem baixa diurese, retém excesso de líquido (água) e sais, ao não excretar substâncias como uréia, creatinina entre outros metabólitos. O acúmulo dessas substâncias no sangue pode causar graves distúrbios de alto risco (JUNIOR *et al.*, 1983). No Brasil, um censo realizado pela Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN) em 2007 revelou a existência de 66.833 pacientes em hemodiálise.

Com o uso de um filtro artificial e uma máquina de hemodiálise específica pode-se substituir adequadamente a função dos dois rins, constituindo-se no chamado rim artificial. A máquina é ligada ao paciente através de um acesso vascular por onde saem os catéteres. O sangue é bombeado e passa através dos capilares do filtro artificial, que contém uma membrana filtrante (Figura 7). Por essa membrana passam a solução de diálise (dialisato) e o sangue numa velocidade de 300 mL/minuto (JUNIOR *et al.*, 1983).

O dialisato consiste em um concentrado de substâncias químicas misturada à água e sua formulação pode variar de acordo com a necessidade do paciente. Esse fluido deve ter uma composição química idêntica à do plasma de um indivíduo saudável, como mostrado na Tabela 3 (HOENICH & RONCO, 2007).

Essa solução irá regular a concentração de eletrólitos no sangue, uma vez que, quando entram em contato através da membrana semipermeável acabam por entrar em equilíbrio eletrolítico. Durante a sessão de hemodiálise, os sais em excesso e as toxinas que deveriam ser eliminadas pelos rins passam para a solução dialisadora, por difusão. Essa é a chamada circulação extra-corporal (JUNIOR *et al.*, 1983).

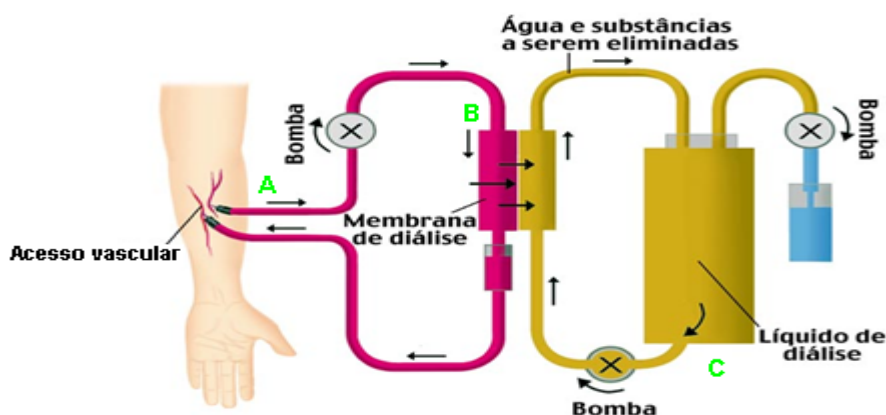


Figura 7 – Esquema do processo de hemodiálise. O paciente é conectado ao aparelho de hemodiálise através de um acesso vascular. O sangue é bombeado (A) em direção aos filtros (B). O mesmo é feito com o líquido de diálise (C). Quando as duas soluções se encontram (B) ocorre um equilíbrio eletrolítico e as substâncias tóxicas do sangue passam para o dialisato.

Fonte: aol.klickeducacao.com.br

Tabela 3 – Comparação entre a composição do dialisato e do plasma sanguíneo.

		Dialisato (mEq/L)	Plasma (mEq/L)
Eletrólitos	Na ⁺	136 – 140	136 – 145
	Cl ⁻	99 – 110	98 – 106
	K ⁺	0 – 3	3,5 – 5
	Ca ⁺⁺	1,5	2,0 – 2,6
	Mg ⁺⁺	0,5 – 1,0	0,8 – 1,2
Tampão	Acetato	2,5 – 5	
	HCO ₃	27 – 39	21 – 28
Glicose		2,0	0,8 – 1,2

Fonte: Hoenich e Ronco (2007).

A qualidade do dialisato está diretamente associada a uma série de processos, incluindo a purificação e a distribuição da água para as máquinas de diálise, preparo dos concentrados e formulação do dialisato (WARD, 2004).

Durante o tratamento de hemodiálise, cada paciente entra em contato com aproximadamente 120 litros de água. Assim, a qualidade química e microbiológica dessa água é essencial para evitar riscos de saúde adicionais aos pacientes. Em geral, a água potável de diferentes fontes (rede pública, poço artesiano ou outros mananciais) pode ser utilizada após purificação, em sistemas de hemodiálise. Os limites aceitáveis em relação a presença de bactérias e endotoxina em água e dialisato utilizados para tratamento de hemodiálise variam em diferentes países (Tabela 4).

Tabela 4 – Limites aceitáveis para presença de bactéria e endotoxina em água e dialisato utilizado em tratamento de hemodiálise. Fonte: adaptado de Ward, 2004.

Referência	Água		Dialisato	
	Bactéria ^a	Endotoxina ^b	Bactéria ^a	Endotoxina ^b
AAMI, RD62, 2001	200	2	NE	NE
ERA, 2002	100	0,25	100	0,25
Farmacopéia Européia	100	0,25	NE	NE
Farmacopéia Sueca	100	0,25	100	0,25
Ultrapuro	0,1	0,03	0,1	0,03

AAMI: Association for the Advancement of Medical Instrumentation; ERA: European Renal Association - NE: não especificado. ^aValores expressos em UFC/mL; ^bValores expressos em EU/mL.

No Brasil, a Agência de Vigilância Sanitária – Anvisa (ANVISA – RDC 154, 2004) estabelece o padrão de qualidade microbiológico e químico da água tratada para utilização nesses sistemas (Tabela 5).

Tabela 5 – Padrão de qualidade microbiológico e químico da água tratada para preparo de solução de diálise.

Componente	Valor máximo permitido
*Coliforme total	Ausência em 100 mL
*Contagem de bactérias heterotróficas	200 UFC/mL
*Endotoxinas	2 EU/mL
**Nitrato	2 mg/mL
**Alumínio	0,01 mg/mL
**Cloramina	0,1 mg/mL
**Cloro	0,5 mg/mL
**Cobre	0,1 mg/mL
**Fluoreto	0,2 mg/mL
**Sódio	70 mg/mL
**Cálcio	2 mg/mL
**Magnésio	4 mg/mL
**Potássio	8 mg/mL
**Bário	0,1 mg/mL
**Zinco	0,1 mg/mL
**Sulfato	100 mg/mL
**Arsênico	0,005 mg/mL
**Chumbo	0,005 mg/mL
**Prata	0,005 mg/mL
**Cádmio	0,001 mg/mL
**Cromo	0,014 mg/mL
**Selênio	0,09 mg/mL
**Mercúrio	0,0002 mg/mL
**Berílio	0,0004 mg/mL
**Tálio	0,002 mg/mL
**Antimônio	0,006 mg/mL

A frequência das análises deve ser mensal (*) e semestral (**).

Fonte: Anvisa RDC 154 (2004).

Em relação ao dialisato, uma amostra colhida diretamente da máquina ao final da sessão de hemodiálise deve conter no máximo 2000 UFC/mL de bactérias, e esse monitoramento deve ser mensal (Portaria número 82, de 3 de janeiro de 2000 do Ministério da Saúde.)

O dialisato pode ser distribuído da seguinte maneira, segundo Couto *et al.* (1999): 1) O dialisato é preparado em uma fonte (Central de Distribuição) a partir da qual será levado por tubos e mangueiras de PVC aos aparelhos de diálise; 2) O dialisato é preparado diretamente no tanque da máquina de diálise; 3) Para as máquinas de proporção há formação contínua do dialisato através da mistura das soluções que estão contidas em locais distintos. Dessa forma, os concentrados A e B são bombeados para a máquina e acrescidos de água, para chegar à concentração final desejada. A solução A contém todos os eletrólitos e um tampão ácido (acetato) e a solução B contém o bicarbonato, que não pode ser armazenado com a mistura eletrolítica (ROSNER *et al.*, 2005).

2.2.2 Infecções Associadas ao Tratamento de Hemodiálise

O ambiente onde muitos pacientes recebem o tratamento dialítico apresenta oportunidades para a transmissão de agentes infecciosos. A contaminação pode ser através de contato, pessoa a pessoa, com os fluidos de diálise, de aparelhos, equipamentos ou superfícies contaminadas. Além disso, os pacientes renais crônicos têm um sistema imune comprometido o que os torna suscetíveis a um grande número de doenças infecciosas. Segundo Jordà-Marcos *et al.* (2007), os fatores de risco para candidemia incluem: colonização por *Candida*, cirurgias, nutrição parenteral e hemodiálise.

Como mencionado anteriormente, a água que serve os Centros de Diálise vem, em geral, do abastecimento público e passa por um pré-tratamento antes de ser distribuída à população. Até a década de 70 acreditava-se que essa água seria adequada ao tratamento dialítico, mas, com o passar do tempo, e com o aumento da sobrevivência dos pacientes em hemodiálise, problemas de saúde relacionados aos contaminantes químicos e orgânicos da água passaram a ser observados (COUTO *et al.*, 1999). Desse modo, existem algumas medidas de

precaução que devem ser tomadas para evitar a contaminação dos equipamentos e reagentes envolvidos, como: tratamento da água, preparo e utilização imediata da solução de diálise, limpeza mensal das máquinas e a não reutilização dos filtros (utilizados na filtração final do sangue).

Bactérias do grupo coliforme são frequentemente utilizados como indicadores de contaminação microbiana da água de abastecimento (WHO, 2004). A presença dessas bactérias pode indicar contaminação por outros microrganismos potencialmente patogênicos de origem fecal humano ou de animais.

Uma variedade de microrganismos pode persistir em ambientes aquosos, inclusive aqueles associados aos sistemas de hemodiálise. A prevalência de bactérias Gram-negativas nesses ambientes tem sido relatada por alguns autores (AVARNITIDOU *et al.*, 1998; MORIN, 2000; AVARNITIDOU *et al.*, 2003; OIE *et al.*, 2003). Magalhães *et al.*, (2004) relataram um surto de bacteremia causada por *Burkholderia cepacia* em unidades de hemodiálise do Recife – Brasil. A bactéria foi isolada da água e também do dialisato utilizados no tratamento de hemodiálise. Posteriormente, Souza *et al.*, (2004) descreveram um outro surto ocorrido na unidade de hemodiálise do Hospital da Beneficência Portuguesa de São Paulo – Brasil. A contaminação por *B. cepacia* foi detectada no sistema de abastecimento de água.

Em um estudo realizado em Ponta Grossa, Paraná, Borges *et al.* (2007) analisaram 72 amostras de água e dialisato, de uma unidade de hemodiálise, sendo que em 70 destas amostras foram isoladas bactérias Gram-negativas.

Avarnitidou *et al.*, (2000) relataram a presença de fungos em água e dialisato utilizados em hemodiálise. Espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* foram os fungos filamentosos mais frequentemente isolados e entre as leveduras, espécies de *Candida* foram as mais prevalentes.

O sistema de abastecimento de água pode ainda estar contaminado com *Cryptosporidium parvum*, um protozoário responsável pela criptosporidiose em humanos. Os oocistos desse protozoário não são eliminados pelo cloro utilizado nos processos de desinfecção (KOSEK *et al.*, 2001; LECRERC *et al.*, 2002). Finalmente, a contaminação por cianobactérias pode resultar em quadros clínicos importantes, uma vez que essas bactérias podem produzir toxinas potentes (microcistinas, nodularinas e anatoxinas) responsáveis por intoxicação humana e animal (RAO *et al.*, 2002). Em Caruaru, Brasil, a presença de microcistinas na água foi responsável

pela morte de sessenta pacientes em tratamento de hemodiálise (CARMICHAEL *et al.*, 2001; AZEVEDO *et al.*, 2002).

Pacientes em tratamento de hemodiálise também estão em risco de adquirir infecções virais como hepatites B (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2005; FINELLI *et al.*, 2005; TANG & LAI, 2005; WONG *et al.*, 2005), C (ALBUQUERQUE *et al.*, 2005; FINELLI *et al.*, 2005; TANG & LAI, 2005), G (RAMOS-FILHO *et al.*, 2004; TANG & LAI, 2005) e AIDS (EGGERS & KIMMEL, 2004). Entretanto, a adoção de medidas específicas, como realização de exames laboratoriais semestrais e uso de máquina e materiais específicos (ANVISA, 2004), tem mostrado uma diminuição na frequência de HCV (Vírus da Hepatite C) no Brasil (CARNEIRO *et al.*, 2005).

Além da água, os patógenos também podem ser introduzidos durante a hemodiálise através do acesso vascular. Frequentemente, essas infecções estão associadas à presença de um catéter implantado no paciente (POWE *et al.*, 1999; OLIVER *et al.*, 2000; TOKARS *et al.*, 2001; SHARIFF *et al.*, 2004; SAXENA & PANHOTRA, 2005).

A contaminação do paciente por essa porta de entrada pode iniciar-se, mais frequentemente, a partir da migração de microrganismos presentes em locais próximos ao sítio de inserção do catéter cutâneo (SHARIFF *et al.*, 2004; SAFDAR *et al.*, 2005; SAXENA & PANHOTRA, 2005). Também ocorre devido ao manuseio do dispositivo implantado, pelos profissionais, com mãos ou materiais contaminados. Nesse caso, a introdução dos microrganismos ocorre diretamente no lúmen do catéter (LINARES *et al.*, 1985; GROHSKOPF *et al.*, 2001; SAXENA & PANHOTRA, 2005). Além disso, contaminação hematogênica a partir de outro foco de infecção também tem sido relatada (CDC, 2002).

Cocos Gram-positivos são os microrganismos mais frequentemente isolados a partir de quadros de bacteremia e infecção associada a cateter, sendo *Staphylococcus aureus* a espécie mais prevalente (MARAJ *et al.*, 2002; KITE *et al.*, 2004; SHARIFF *et al.*, 2004; FINELLI *et al.*, 2005; GILAD *et al.*, 2005; JABER, 2005). Entretanto, bactérias Gram-negativas também têm sido associadas a esse tipo de infecção (GROHSKOPF *et al.*, 2001; MARAJ *et al.*, 2002; CHANG & CUNHA, 2004; SHARIFF *et al.*, 2004; GILAD *et al.*, 2005).

Os fungos também têm sido isolados de infecções associadas a cateter em pacientes de hemodiálise e espécies do gênero *Candida* são as mais

freqüentes (NGUYEN *et al.*, 1996b; MARAJ *et al.*, 2002; GILAD *et al.*, 2005; PASQUALOTTO *et al.*, 2005).

2.3 MORCEGOS

2.3.1 Características Gerais

Morcegos são mamíferos pertencentes à Ordem Chiroptera, palavra que significa “mão (chiro) transformada em asa (ptera)”. A ordem Chiroptera contém atualmente quase 1.000 espécies e representa cerca de um quarto de toda a fauna de mamíferos do mundo (BRETZ *et al.*, 1994). A ordem Chiroptera engloba 17 famílias, 177 gêneros e 925 espécies. Na América Latina está localizada a mais rica fauna de morcegos do mundo. No Brasil, os quirópteros representam aproximadamente um terço dos mamíferos terrestres e o segundo em diversidade (REIS *et al.*, 2006)

Apesar da abundância e biodiversidade de quirópteros no Brasil os estudos biológicos e de distribuição geográfica desse mamífero ainda caminham a passos lentos em muitas regiões do país. Miretzki (2003) realizou um inventário sobre a riqueza de espécies de morcegos no estado do Paraná. Representantes de cinco famílias foram identificadas nessa região, que são Phyllostomidae (25 espécies; 47% do total), Molossidae (13; 24%), Vespertilionidae (12; 23%), Noctilionidae (2; 4%) e Emballonuridae (1; 2%). Reis (2005) identificou na região centro-leste do Paraná 21 espécies de morcegos, distribuídas em três famílias: Phyllostomidae (com doze espécies), Vespertilionidae (com sete espécies) e Molossidae (com duas espécies).

A família Phyllostomidae apresenta a maior diversidade trófica dentre todas as famílias de mamíferos, englobando insetívoros, carnívoros, frugívoros, folívoros, nectívoros, onívoros e hematófagos. A principal característica morfológica desses morcegos é a presença de um apêndice dérmico em forma de folha que se projeta acima das narinas (Figura 8A).

Vespertilionidae é a família com maior diversidade e distribuição geográfica entre os Chiroptera, incluindo 48 gêneros e 407 espécies nas regiões tropicais e temperadas do globo (REIS *et al.*, 2007). Os morcegos da família Vespertilionidae são insetívoros e podem forragear até o topo de árvores altas, capturando os insetos durante o voo. Possuem cauda longa, envolta pela membrana interfemural. Não possuem folha nasal, com exceção de dois gêneros ocorrentes na Austrália [*Nyctophilus* e *Pharotis* (Figura 8B)]. Os vespertilionídeos apresentam dimorfismo sexual secundário quanto ao tamanho, sendo as fêmeas maiores que os machos. Podem ser encontrados sozinhos ou em grupos muito numerosos, ocupando grutas, folhagens de árvores e construções humanas (REIS *et al.*, 2007).

Todos os morcegos pertencentes à família Molossidae possuem cauda que se projeta além da membrana interfemural, são conhecidos como “morcegos de cauda livre”. Apresentam asas longas, cuja envergadura varia entre 20 mm e 450 mm. O focinho é largo e de aspecto truncado. Possuem coloração marrom, cinza ou preta, pernas curtas com pés estreitos (Figura 8C). Apresentam dimorfismo sexual em relação ao tamanho, sendo os machos maiores que as fêmeas. Abrigam-se em cavernas, túneis, prédios, ocos de árvores e forros de casas, onde a temperatura ultrapassa 47 °C. (Reis, 2007). Vivem geralmente, em colônias numerosas e se alimentam exclusivamente de insetos aéreos capturados durante o voo. São os morcegos mais numerosos e freqüentes em áreas urbanas, já que os insetos são atraídos pela iluminação noturna (BRETD *et al.*, 1994)

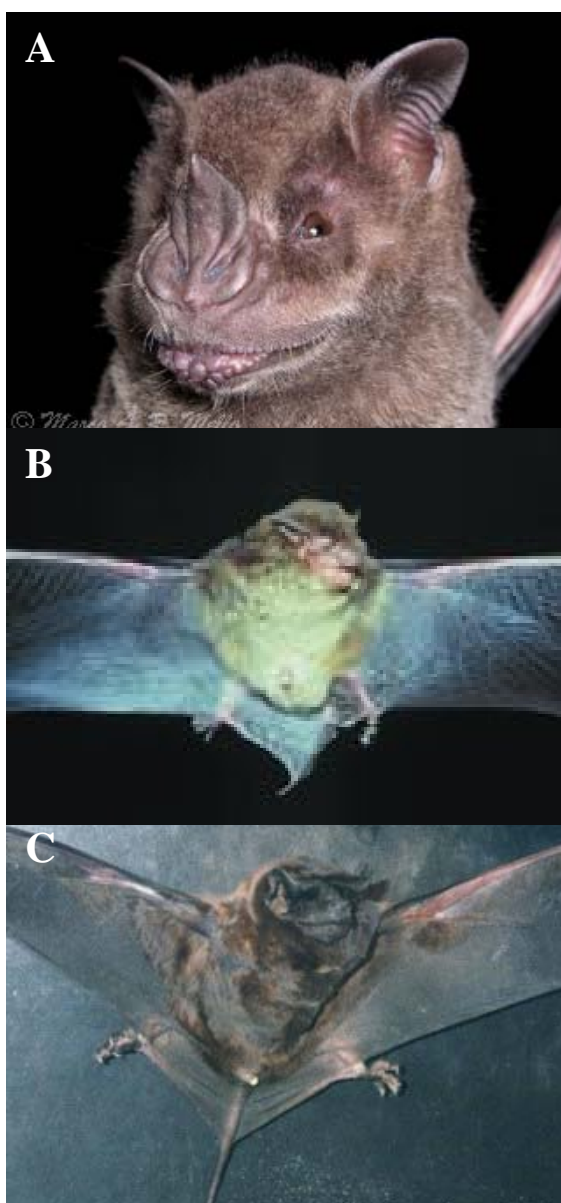


Figura 8 – Famílias de morcegos mais comumente encontradas no Paraná. **A:** Morcego da família Phyllostomidae, *Artibeus fimbriatus*; **B:** Morcego da família Vespertilionidae, *Eptesicus brasiliensis*; **C:** Morcego da família Molossidae, *Molossus ater*.

Fonte: <http://www.morcegolivre.vet.br/especies.html>

2.3.2 Morcegos e Fungos Patogênicos

Os morcegos contribuem na dispersão de sementes, polinização de plantas e redução de insetos de hábitos noturnos (MAYEN, 2003). Por outro lado, como descrito anteriormente, podem ser reservatório de vários microrganismos patogênicos ou potencialmente patogênicos.

A primeira associação entre morcegos e fungos patogênicos foi relatada por Emmons (1958) através do isolamento de *Histoplasma capsulatum* de solo contaminado por fezes desses animais. Após esse trabalho, cerca de 30 espécies de quirópteros foram identificados como hospedeiros para fungos patogênicos (MOK *et al.*, 1982), principalmente aqueles que habitam centros urbanos ou locais modificados pelo homem, como regiões de desmatamento.

H. capsulatum é um fungo dimórfico presente no solo que pode colonizar o trato gastrointestinal dos morcegos, contribuindo para a propagação do fungo no ambiente. Habitats de aves são considerados propícios para o desenvolvimento desse fungo, mas nunca foi documentada infecção em pássaros, devido, provavelmente, a sua alta temperatura corporal. Leveduras de *H. capsulatum* já foram isoladas de diversas espécies de mamíferos, mas somente os morcegos têm papel importante na etiologia dessa micose. Já foram isolados amostras desse fungo em guano de morcego e solos próximos de árvores, casas e pontes (HOFF & BIGLER, 1981; TAYLOR *et al.*, 1999).

A histoplasrose é uma infecção sistêmica que resulta primariamente da inalação de esporos fúngicos presentes no solo. Em pacientes imunocompetentes, aproximadamente 95% das infecções são assintomáticas. O quadro clínico pode mimetizar um resfriado, com febre, calafrio, mialgia, cefaléia e tosse seca. Em casos mais graves pode ocorrer insuficiência respiratória. A forma disseminada caracteriza-se pela presença de um foco extrapulmonar, que pode variar de lesões na orofaringe e laringe (em pacientes imunocompetentes) a acometimento de múltiplos órgãos (paciente imunodeficiente), (SIDRIM & ROCHA, 2004).

Outras espécies fúngicas patogênicas ou potencialmente patogênicas também foram isoladas a partir de fezes e órgãos de morcegos (Tabela 6).

Tabela 6 – Exemplos de fungos isolados de excretas ou órgãos de morcegos.

Fungo	Infecção	Referência
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Histoplasmose	Emmons, 1958; Taylor <i>et al.</i> , 1999
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Paracoccidioidomicose	Greer & Bolanos, 1977
<i>Cryptococcus</i> spp	Criptococose	Mok <i>et al.</i> , 1982
<i>Blastomyces dermatitides</i>	Blastomicose	Randhawa <i>et al.</i> , 1985
<i>Candida</i> spp	Candidíase	Oyeka, 1994
<i>Trichosporon</i> spp	Dermatofitoses	Sugita <i>et al.</i> , 2005
<i>Microsporum</i> spp	Dermatofitoses	Bredt <i>et al.</i> , 1994

Fonte: adaptado de Bredt *et al.*, 1994.

Excretas de aves, principalmente pombos, são consideradas as maiores fontes de leveduras patogênicas em todo o mundo (CARFACHIA *et al.*, 2005). Mas, como os pombos, os morcegos também devem ser considerados como importantes hospedeiros para essas leveduras, já que apresentam as condições necessárias para crescimento e dispersão das mesmas.

Morcegos insetívoros e frugívoros, os mais comumente encontrados em áreas urbanas, podem se instalar durante o dia em forros de casas, dutos de ventilação, porões, chaminés. À noite, eles geralmente saem para se alimentar e utilizam as copas das árvores como abrigos noturnos (BRETD *et al.*, 1994). A propagação de doenças através desses animais ocorre não somente pela mordida ou contato direto, mas também pela contaminação do ambiente, seja com fezes ou restos de alimento, que o animal rejeita após mastigação. (DOBSON, 2005). Dessa forma, facilmente podemos entrar em contato com esses animais, ou seus dejetos estando sujeitos a contaminação por microrganismos danosos a saúde humana.

3 ANÁLISE GERAL DOS RESULTADOS

Nesse capítulo apresentaremos os resultados obtidos nos dois trabalhos. Serão apresentados também resultados que não foram mostrados nos artigos. A Tabela 7 mostra os resultados de identificação, determinação do perfil de sensibilidade ao fluconazol e produção de biofilme.

3.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS

Em nossos trabalhos, analisamos leveduras obtidas de duas fontes diferentes. Foram identificadas e caracterizadas 6 amostras isoladas de dialisato de uma clínica de hemodiálise situada em Ponta Grossa-PR, juntamente com 7 amostras obtidas de morcegos urbanos.

O dialisato apresentou maior diversidade de espécies fúngicas, onde foram isolados representantes de três gêneros de leveduras, *Candida*, *Cryptococcus* e *Saccharomyces*. Em morcegos a maioria das leveduras pertence ao gênero *Candida* e um isolado foi identificado como *Saccharomyces cerevisiae*. Provavelmente o não isolamento de *H. capsulatum* em amostras de morcegos deve-se ao fato da temperatura de incubação das culturas a 37 °C.

C. famata, como discutido no Artigo 1, é um fungo saprófita que vive na pele e membrana mucosa de animais. Entretanto, relatos de infecções associadas a essa levedura têm sido descritos na literatura, tais como endoftalmite (RAO *et al.*, 1991), peritonite (QUINDOS *et al.*, 1994), infecção do sistema nervoso central (PRINSLOO *et al.*, 2003). No caso de peritonite, o paciente realizava diálise peritoneal. Recentemente, essa espécie tem sido isolada de indivíduos HIV positivos apresentando candidíase orofaríngea (MIGLIORATI *et al.*, 2004), de um caso de retinopatia aguda (CARRASCO *et al.*, 2005), de infecção do mediastino (AHMED *et al.*, 2005), e de paciente transplantado (WAGNER *et al.*, 2005).

Tabela 7 – Caracterização das amostras de leveduras isoladas de dialisato e morcegos.

Isolado	Identificação ^a	Protease ^b	Fosfolipase ^b	Hemolisina ^c	Biofilme ^d	Fluconazol ^e
Dialisato						
D4	<i>Cryptococcus albidus</i>	0,36	-	β-hemólise	30,3	128,0
D9	<i>Candida lusitaniae</i>	0,28	-	β-hemólise	50,2	128,0
D12	<i>Cryptococcus laurentii</i>	0,38	-	α-hemólise	30,2	128,0
D12sa	<i>Candida famata</i>	0,33	-	α-hemólise	70,5	0,5
D16	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,44	-	β-hemólise	50,2	4,0
D19	<i>Candida famata</i>	0,25	-	β-hemólise	43,7	2,0
Média±dp		0,34±0,06			45,9±15,07	
Morcego						
M8	<i>Candida parapsilosis</i>	0,33	-	α-hemólise	32,8	2,0
M12	<i>Candida krusei</i>	0,34	-	α-hemólise	37,9	8,0
M13	<i>Candida parapsilosis</i>	0,29	-	α-hemólise	36,8	2,0
M34	<i>Candida lusitaneae</i>	0,29	-	α-hemólise	49,9	32,0
M39	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,35	-	α-hemólise	38,1	16,0
M41	<i>Candida pelliculosa</i>	0,20	-	α-hemólise	41,3	2,0
M56	<i>Candida guilliermondii</i>	0,38	-	α-hemólise	43,9	4,0
Média±dp		0,31±0,05			40,1±5,55	

- ^a. Identificação baseada em critérios fenotípicos padrões.
- ^b. Atividade enzimática foi avaliada em meio de cultura contendo 0,6% de caseína de leite (Molico) e 4,0% de gema de ovo como substratos para protease e fosfolipase, respectivamente. $Pz = 1$, negativo; $0,64 \leq Pz < 1$, baixo; $0,30 \leq Pz < 0,64$, intermediário; $Pz < 0,30$, altamente positivo. O índice Pz foi determinado por meio da razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia somado ao diâmetro do halo de degradação/precipitação (Price *et al.*, 1992).
- ^c. A atividade hemolítica foi avaliada em meio de cultura suplementado com 3% glucose e 5% sangue de carneiro. +, positivo e - negativo para a atividade hemolítica.
- ^d. A formação de biofilme foi avaliada em placas de 96 poços de poliestireno. A %Tbloq (porcentagem de transmitância bloqueada) foi determinada pela fórmula: %Tbloq = %Tbloq do teste - %Tbloq do branco da reação. %T bloq < 5, negativo; %T bloqueada=5-20, + (fracamente); %T bloq=20-35, ++ (moderadamente); %T bloq=35-50, +++ (moderadamente); %T bloq \geq 50, ++++ (fortemente produtor de biofilme).
- ^e. A concentração inibitória mínima de fluconazol foi avaliada pelo método da microdiluição em caldo de acordo com as normas preconizadas em Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI (M27-A2 document, NCCLS, 2002)]. MICs \geq 64 μ g/ml, resistente, MIC entre 16-32 μ g/ml, sensível, dose dependente e MICs \leq 8 μ g/ml, sensível.

Entre as espécies do gênero *Cryptococcus*, *C. neoformans* é encontrado no ambiente e em fezes de pombos, e representa a espécie mais freqüente nos casos de infecção. Esse fungo oportunista pode ser inalado e causar um quadro denominado criptococose (SIDRIM & ROCHA, 2004). Em nosso trabalho, encontramos duas espécies pertencentes a esse genero: *C.albidus* e *C.laurentii*. A primeira tem sido associada a quadros de infecção cutânea (NARAYAN *et al.*, 2000) e ceratite após transplante de córnea (DE CASTRO *et al.*, 2005).A segunda espécie, à candidemia de recém nascido prematuro (CHENG *et al.*, 2001) e de paciente com ganglioneuroblastoma (AVERBUCH *et al.*, 2002). *C. laurentii* também foi isolado da orofaringe de pacientes imunossuprimidos (BAUTERS *et al.*, 2002).

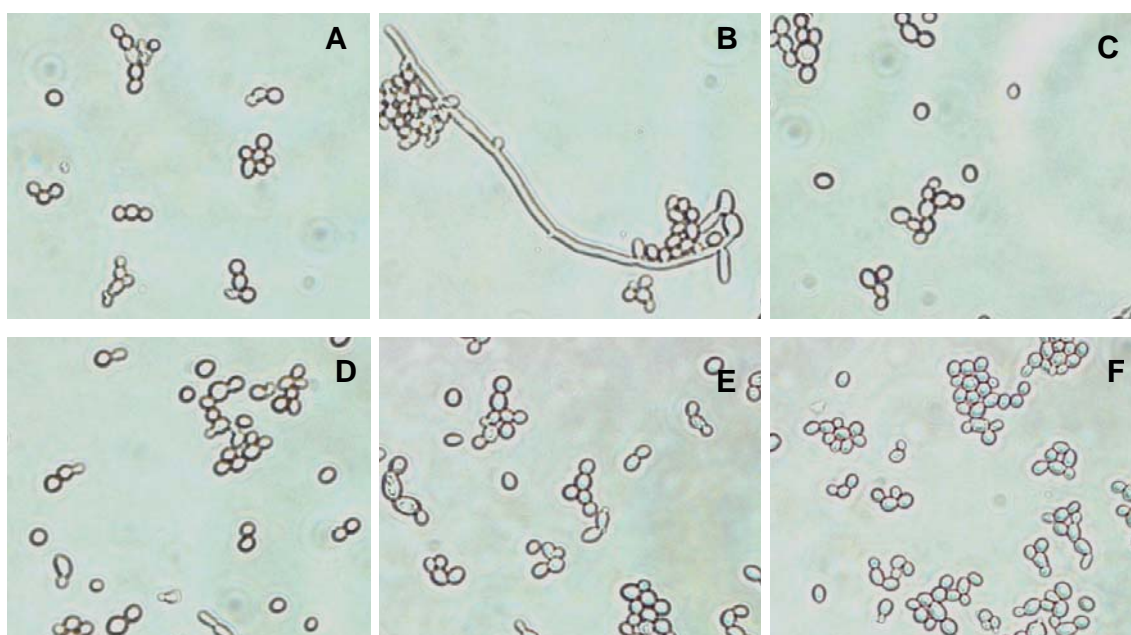
Um isolado de *C.guilliermondii* foi encontrado em fezes de morcegos urbanos. A maioria dos casos de infecção por *C. guilliermondii* está associado a pacientes com câncer (MEDEIROS, 2007). Como relatado por Krcmery & Barnes (2002), durante um período de 40 anos (até) 1990, somente 10 casos de fungemia por *C. guilliermondii* foram relatados, enquanto que 33 casos foram relatados entre 1990 e 2002, mostrando o aumento na prevalência desse microrganismo como agente de candidíase. Nesse mesmo trabalho, *C. krusei* foi a terceira maior causa de fungemia (10-35% dos casos) entre as leveduras não-*albicans*.

C. parapsilosis também é um patógeno de grande importância, principalmente em neonatos e pacientes pós-cirúrgicos, tendo já sido relatados casos de infecções relacionadas a cateteres de diálise e válvulas cardíacas (KUHN *et al.* 2004).

Finalmente, a importância de *S. cerevisiae* está mais associada a sua utilização em processos fermentativos. Entretanto, vários relatos têm sido descritos a respeito de infecções invasivas ocasionadas por essa levedura. Enache-Angoulvant & Hennequin (2005), fizeram uma compilação dos casos já relatados de infecção por *Saccharomyces* sp. sendo 40% dos casos ocasionados por *S.cerevisiae*.

3.2 Caracterização das Leveduras

A morfologia das leveduras isoladas de morcego foi observada em preparações microscópicas à fresco, como mostra a Figura 9. Para tanto, os isolados foram cultivados em caldo Sabouraud a 35 oC durante 24 h. Somente no isolado M12 (*C. krusei*) foi observado a presença de filamentos. Embora não tenhamos avaliado as dimensões das células leveduriformes, foi possível observar em microscopia de luz que os isolados M13, M34 e M39 apresentaram maiores tamanhos.



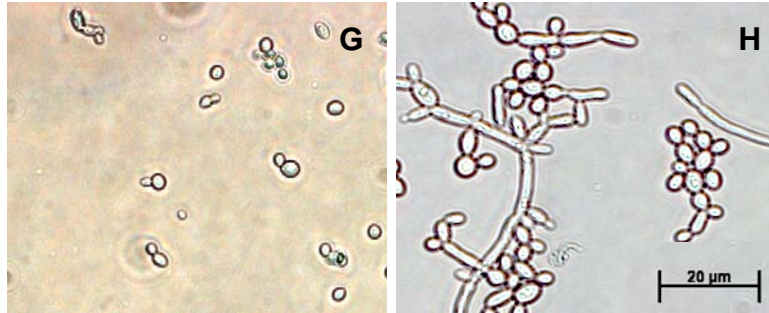


Figura 9 – Microscopia de luz dos isolados de morcegos urbanos. **A:** M8; **B:** M12; **C:** M13; **D:** M34; **E:** M39; **F:** M56; **G:** *C.albicans*

Também realizamos uma cinética de crescimento dos isolados de morcego, comparando com *C. albicans*. Assim, $1,0 \times 10^3$ células foram inoculadas nos poços da placa de poliestireno contendo 200 µL de caldo Sabouraud. A densidade óptica (DO) das culturas foi determinada após h de incubação a 35° C. A Figura 10 mostra os resultados obtidos. Em geral, todos os isolados apresentaram DOs menores, após 48 h de incubação, quando comparados com *C. albicans*. Entre os isolados de morcegos, o que apresentou maior DO foi M39 (*S. cerevisiae*) seguido por M8 (*C. parapsilosis*).

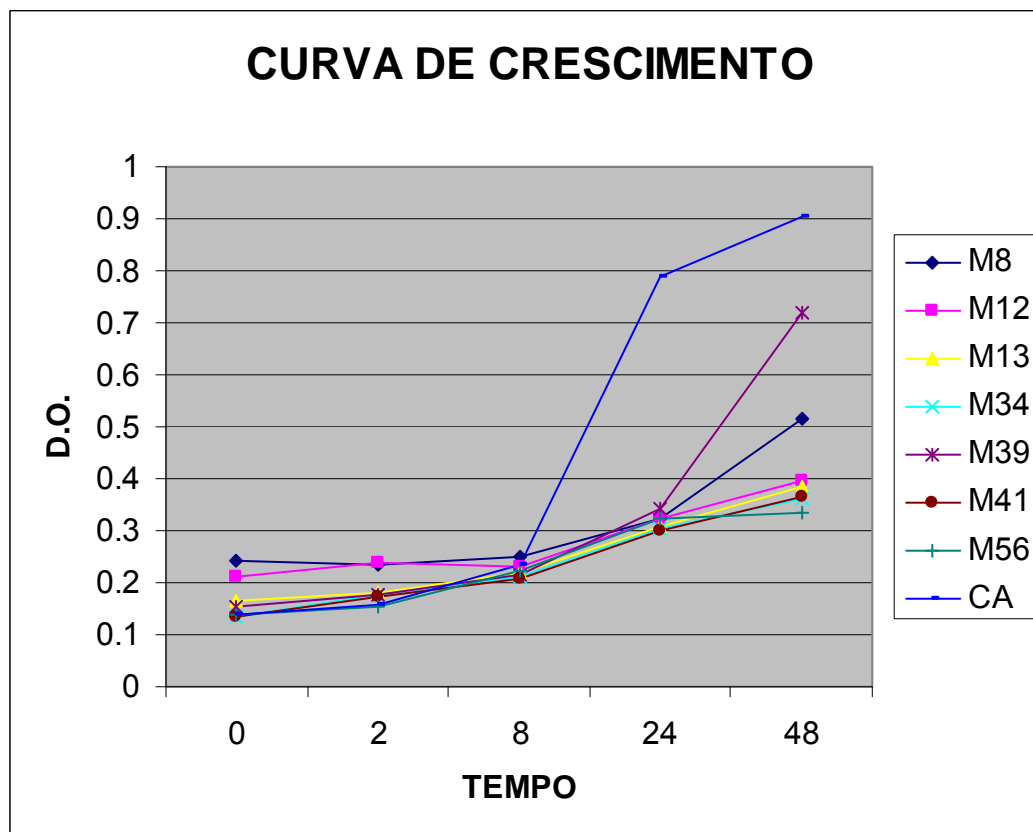


Figura 10 – Curva de crescimento das leveduras isoladas de morcego. CA: *C. albicans*.

Em relação aos fatores de virulência, o isolado D19 (*C. famata*) foi descrito no Artigo 1 e comparando ao isolado D12sa apresentou diferença significativa na capacidade de formação de biofilme (Figura 11). Também em relação a atividade hemolítica, D19 e D12sa foram positiva e negativa, respectivamente.

Independentemente da origem dos isolados, todos apresentaram atividade de protease (Figura 12), foram negativos para fosfolipase e apresentaram capacidade para formação de biofilme. Os valores médios dos isolados não diferiram significativamente entre os ensaios de protease e biofilme, embora três isolados de dialisato (D9, D12sa, D16) apresentassem alta capacidade de formação de biofilme. Em relação a atividade hemolítica, todos os isolados de morcego produziram alfa-hemólise em presença de sangue de carneiro. Somente duas amostras provenientes de dialisato apresentaram alfa-hemólise e as demais foram consideradas positivas (beta-hemólise).

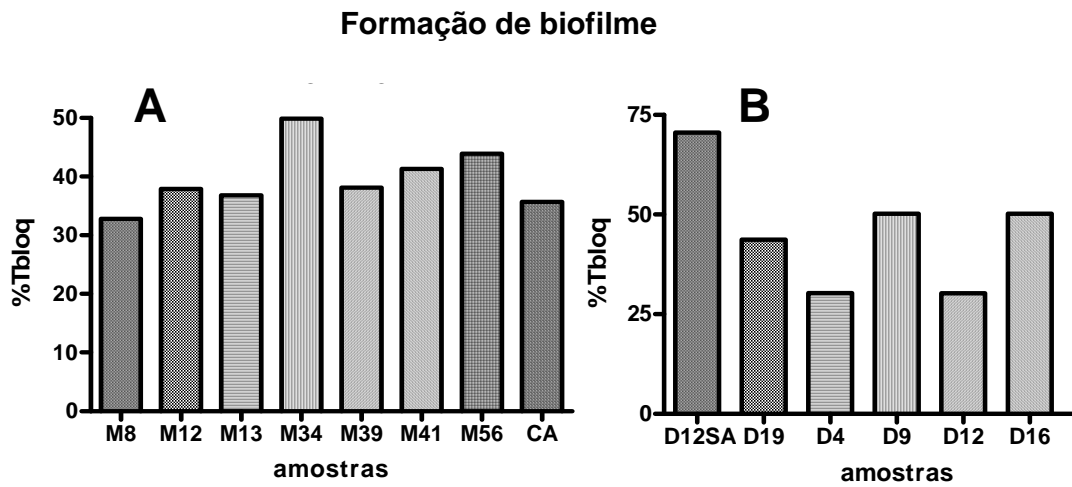


Figura 11 – Formação de biofilme (% de transmitância bloqueada). **A:** isolados de morcegos. **B:** isolados de dialisato.

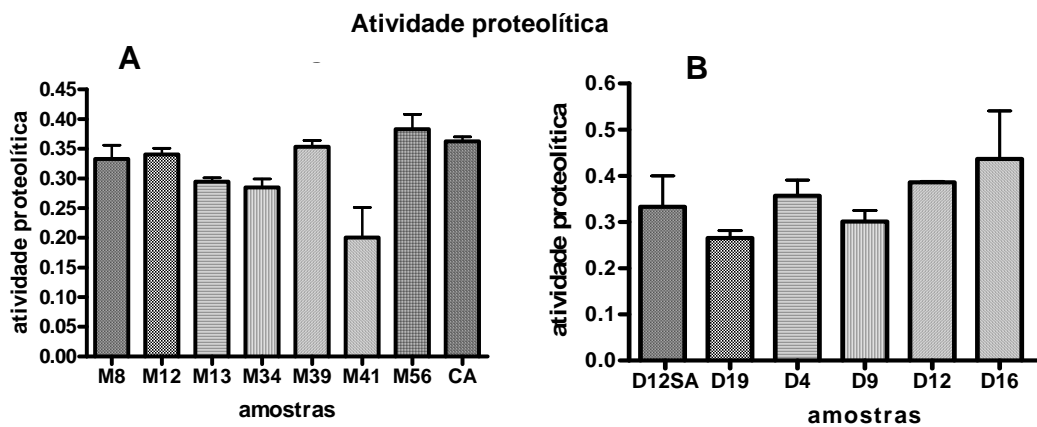


Figura 12 – Análise da atividade proteolítica dos isolados. **A:** isolados de morcegos. **B:** isolados de dialisato.

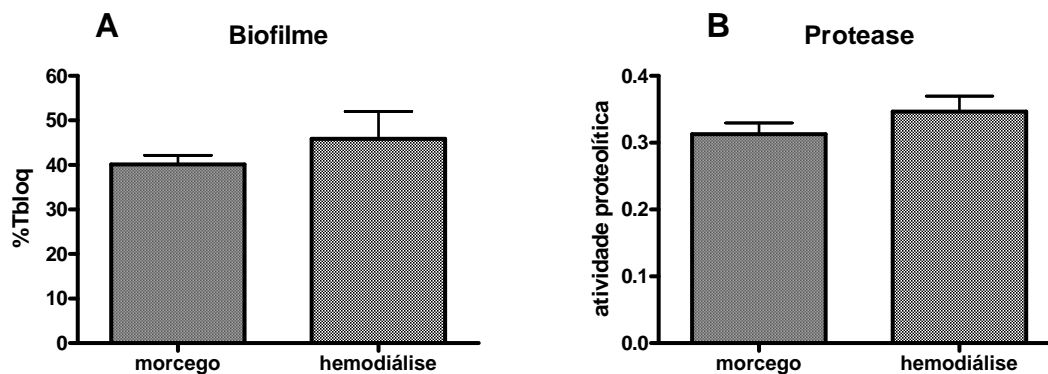


Figura 13 – Comparação entre as populações com relação aos fatores de virulência. **A:** produção de biofilme. **B:** atividade proteolítica das amostras.

3.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença das leveduras no dialisato e em morcegos levanta vários aspectos importantes como: 1) Fontes em potencial de infecção para pacientes debilitados; 2) Desenvolvimento de infecções sistêmicas; 3) Formação de biofilme nas superfícies do hospedeiro. Ainda em relação ao dialisato, podemos incluir 4) Formação de biofilme nos sistemas hidráulicos, que são de difícil remoção com os processos usuais de desinfecção; 5) Reações pirogênicas decorrentes dos produtos microbianos.

Em relação ao dialisato, a qualidade da água e dos fluidos de diálise é o fator crucial para prevenção da contaminação de todo o circuito do tratamento dialítico (unidade de hemodiálise e acesso vascular no paciente).

O processo de desinfecção dos sistemas hidráulicos das unidades de hemodiálise tem como objetivo eliminar ou reduzir os microrganismos, desde a chegada da água até o tratamento, preparo e distribuição do dialisato para as máquinas de diálise. Tradicionalmente esse processo é realizado com soluções contendo hipoclorito de sódio ou ácido peracético, que devem ser retirados após o tempo de exposição determinado. As amostras de dialisato desse trabalho mostraram-se sensíveis ao hipoclorito de sódio nas condições empregadas durante o processo de desinfecção das máquinas (concentração de 0,05% durante 10 min).

Entretanto, as células sésseis presentes nos biofilmes mostraram-se resistentes, mesmo após exposição de 120 min ao hipoclorito de sódio.

Vários tratamentos alternativos têm sido propostos para prevenção da contaminação exemplificados como: uso de membranas de ultrafiltração para eliminação de microrganismos (OIE *et al.*, 2003) e pirogênios (LONNEMANN *et al.*, 2001) antes da entrada do dialisato no dialisador; uso de dialisato ultrapuro (WARD, 2004); desenvolvimento de cateter resistente a infecção por interferir na colonização microbiana (SAXENA & PANHOTRA, 2005). Sistemas que utilizam a pasteurização da água também são disponíveis, mas devido ao alto custo não são muito utilizados (WARD, 2004).

Os resultados obtidos no nosso trabalho sugerem, de uma maneira geral, um potencial patogênico para as leveduras isoladas de dialisato. Outros estudos deverão ser realizados para avaliar o papel dessas espécies no desenvolvimento de processos infecciosos no homem.

Os morcegos urbanos, como já discutido anteriormente, podem ser encontrados nos mais diversos locais, desde troncos de árvores até forros de casas. A presença de leveduras potencialmente patogênicas nas fezes desses animais aumenta os riscos de infecção em pacientes debilitados. Portanto a presença de morcegos em centros urbanos ou habitados deve ser controlada, uma vez que podem ser fontes de infecção humana.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, K.C., AGODOA, L.Y. Etiology of bacterial sepsis in chronic dialysis patients in the United States. **Clin. Nephrol.**, 56: 124-131, 2001.

AGARWAL, M.B.; RATHI, S.A.; RATHO, N.; SUBRAMANIAN, R. Caspofungin: a major breakthrough in treatment of systemic fungal infections. **Assoc Physic Ind. Dec**;54:943-8, 2006.

AHMED, IM., GUPTA, A., GOULD, K., CLARK, S.C. A fatal fungus. **Ann. Thorac. Surg.**, 80(2): 723-724, 2005.

AHRENS, J.C.; PRICE, M.R.; DANEO-MOORE, L. & BUCKEY, H.R. Effect of culture density on the kinetics of germ tube formation in *Candida albicans*. **J. Gen. Microbiol.**, 129: 3001-3006, 1983.

ALBERTSON, G.D.; NIIMI, M.; CANNON, R.D. & JENKINSON, H.F. Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. **Antimicrobial Agents Chemother.**, 40(12): 2835-2841, 1996.

ALBUQUERQUE, A.C.C., COÊLHO, M.R.C.D., LOPES, E.P.A., LEMOS, M.F., MOREIRA, R.C. Prevalence and risk factors of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients from one center in Recife, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 100(5): 467-470, 2005.

AL-FATTANI MA & DOUGLAS LJ Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. **J Med Microbiol** 55: 999-1008, 2006.

AL-HEDAITHY SS. The yeast species causing fungemia at a university hospital in Riyadh, Saudi Arabia, during a 10-year period. **Mycoses**. Sep;46(8):293-8, 2003.

ANTONY, G.; SARAYALA. V.; BHAT G.K.; SHIVANANDA, P.G. Phenotypic switch and its influence on expression of virulence factors by *Candida albicans* causing candidiasis in human immunodeficiency virus infected patients. **Ind. J. of Med. Microbiol.** 25 (3):241-4, 2007.

ANVISA - **Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução** – RDC no 154 de 15 de junho de 2004.

ARVANITIDOU, M., SPAIA, S., KATSINAS, C., PANGIDIS, P., CONSTANTINIDIS, T., KATSOUYANNOPOULOS, V., VAYONAS, G. Microbiological quality of water and dialysate in all haemodialysis centres of Greece. **Nephrol. Dial. Transplant.**, 13: 949-954, 1998.

ARVANITIDOU, M., SPAIA, S., VELEGRAKI, A., PAZARLOGLOU, M., KANETIDIS, D., PANGIDIS, P., ASKEPIDIS, N., KATSINAS, C.H., VAYONAS, G., KATSOUYANNOPOULOS, V. High level of recovery of fungi from water and dialysate in haemodialysis units. **J. Hosp. Infect.**, 45: 225-230, 2000.

- ARVANITIDOU, M., VAYONA, A., SPANAKIS, N., TSAKRIS, A. Occurrence and antimicrobial resistance of Gram negative bacteria isolated in haemodialysis water and dialysate of renal units: results of a Greek multicentre study. **J. Appl. Microbiol.**, 95: 180-185, 2003.
- AVERBUCH, D., BOEKHOUTT, T., FALK, R., ENGELHARD, D., SHAPIRO, M., BLOCK, C., POLACHECK, I. Fungemia in a cancer patient caused by fluconazole-resistant *Cryptococcus laurentii*. **Med. Mycol.**, 40(5): 479-484., 2002.
- AZEVEDO S.M., CARMICHAEL W.W., JOCHIMSEN E.M., RINEHART K.L., LAU S., SHAW G.R., EAGLESHAM G.K. **Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. Toxicol.**, 27(181-182): 441-446., 2002.
- BACHMANN SP, VANDEWALLE K, RAMAGE G, PATTERSON TF, WICKES BL, GRAYBILL JR & LÓPEZ-RIBOT JL. In vitro activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. **Antimicrob Agents Chemother** 46: 3591-3596, 2002.
- BAILLIE, G.S.; DOUGLAS, L.J. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their role in biofilm resistance to antifungals agents. **J. Antimicrob. Chemother.**, 46: 397-403, 2000.
- BAHN, Y.S. & SUNDSTROM, P.. **CAP1, an adenylate cyclase-associated protein gene, regulates bud-hypha transitions, filamentous growth, and cyclic AMP levels and is required for virulence of *Candida albicans*. J. Bacteriol.**, 183(10): 3211-3223, 2001.
- BALKIS, M.M.; LEIDICH, S.D.; MUKHERJEE P.K.; GHANNOUM, M.A. Mechanisms of fungal resistance: an overview. **Drugs**. 62(7):1025-40, 2002.
- BANERJEE, S.N.; EMORI, T.G.; CULVER, D.H.; GAYNES, R.P.; JARVIS, W.R.; HORAN, T.; EDWARDS, J.R.; TOLSON, J.; HENDERSON, T.; MARTONE, W.J. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections Surveillance Systems. **Am. J. Med.**, 91: 86-89, 1991.
- BAUTERS, T.G., SWINNE, D., BOEKHOUT, T., NOENS, L., NELIS, H.J. Repeated isolation of *Cryptococcus laurentii* from the oropharynx of an immunocompromized patient. **Mycopathologia**, 153(3): 133-135, 2002.
- BIZERRA FC, NAKAMURA CV, DE POERSCH C, ESTIVALET SVIDZINSKI TI, BORSATO QUESADA RM, GOLDENBERG S, KRIEGER MA, YAMADA-OGATTA SF. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. **FEMS Yeast Res.** Jan 29 [Epub ahead of print] 2008.
- BORG-VON ZEPELIN M, MEYER I, THOMSEN R, WÜRZNER R, SANGLARD D, TELENTI A & MONOD M. HIV-protease inhibitors reduce cell adherence of *Candida albicans* strains by inhibition of yeast secreted aspartic proteases. **J Invest Dermatol** 113: 747-751, 1999.
- BRAND, A.; SHANKS, S.; DUNCAN, V.M.; YANG, M.; MACKENZIE, K.; GOW, N.A. Hyphal orientation of *Candida albicans* is regulated by a calcium-dependent mechanism. **Curr Biol.** Feb 20;17(4):347-52, 2007.

BRAUN, B.R. & JOHNSON A.D. Control of filamentation formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor Tup1. **Science**, 277: 105-109, 1997.

BRETD, A.I.; ARAÚJO, F.A.A.; CAETANO-JUNIOR, J.; RODRIGUES, M.G.R.; YOSHIZAWA, M.; SILVA, M.M.S.; HARMANI, N.M.S.; MASSUNAGA, P.N.T.; BURER, S.P.; POTRO, V.A.R.; UIEDA, W. **Morcegos em áreas urbanas e rurais: Manual de manejo e controle – Ministério da Saúde**, Fundação Nacional de Saúde, 1994.

CARFACHIA, C.; CAMARDA, A.; ROMITO, D.; CAMPOLO, M.; QUAGLIA, N.C.; TULLIO, D.; OTRANTO, D. Occurrence of yeasts in cloacae of migratory birds. **Mycopathol.** 161: 229-234, 2005.

CALDERONE, R.A., FONZI, W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends Microbiol.**, 9(7): 327-335, 2001.

CARMICHAEL W.W., AZEVEDO S.M., AN J.S., MOLICA R.J., JOCHIMSEN E.M., LAU S., RINEHART K.L., SHAW G.R., EAGLESHAM G.K. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environ. Health Perspect.**, 109(7):663-668, 2001.

CARNEIRO, M.A.S., TELES, S.A., DIAS, M.A., FERREIRA, R.C., NAGHETTINE, A.V., SILVA, S.A., LAMPE, E., YOSHIDA, C.F.T., MARTINS, R.M.B. Decline of hepatitis C infection in hemodialysis patients in Central Brazil: a ten years of surveillance. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 100(4): 345-349, 2005.

CARRASCO, L., RAMOS, M., GALISTEO, R., PISA, D., FRESNO, M., GONZALEZ, M.E. Isolation of *Candida famata* from a patient with acute zonal occult outer retinopathy. **J. Clin. Microbiol.**, 43(2): 635-640, 2005.

CARRILLO-MUNOZ, A.J.; QUINDO, G.; RUESGA, M.; ALONSO, R.; DEL VALLE, O.; HERNANDEZ-MOLINA, J.M.; MCNICHOLAS, P.; LOEBENBERG, D.; SANTOS, P. Antifungal activity of posaconazole compared with fluconazole and amphotericin B against yeasts from oropharyngeal candidiasis and other infections. **J. Antimicrob. Chemother.**, 55, 317–319, 2005.

CARRILLO-MUÑOZ, A.J., QUINDÓS, G.; DEL VALLE, O.; SANTOS, P.; GIUSIANO, G.; EZKURRA, P.A.; ESTIVILL, M.D.; CASALS, J.B. Activity of caspofungin and voriconazole against clinical isolates of *Candida* and other medically important yeasts by the CLSI M-44A disk diffusion method with Neo-Sensitabs tablets. **Chemothe.**, 2008;54(1):38-42, 2008.

CATALÁN, M.; MONTEJO, J.C. Systemic antifungals: Pharmacodynamics and pharmacokinetics. **Rev Iberoam Micol.**, Mar;23(1):39-49, 2006.

CHANG, M., CUNHA, B.A. *Klebsiella pneumoniae* bacteremia associated with a Tesio hemodialysis catheter. **Am. J. Infect. Control.**, 32 (6): 374, 2004.

CHANDRA, J.; KUHN, D.M.; MUKHERJEE, P.K.; HOYER, L.L.; McCORMICK, T.; GHANNOUM, M.A.. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **Journal of Bacteriology**, 183 (18): 5385-5394, 2001.

- CHATTOPADHYAY, S., RAO, S., DAS, B.C., SINGH, N.P., KAR, P. Prevalence of transfusion-transmitted virus infection in patients on maintenance hemodialysis from New Delhi. **Hemodial. Int.**, 9(4): 362-366, 2005.
- CHEN, Y.C.; WU, C.C.; CHUNG, W.L. & LEE, F.J.S. Differential secretion of Sap 4-6 proteins in *Candida albicans* during hyphae formation. **Microbiol.**, 148: 3743-3754, 2002.
- CHENG, M.F., CHIOU, C.C., LIU, Y.C., WANG, H.Z., HSIEH, K.S. Cryptococcus laurentii fungemia in a premature neonate. **J. Clin. Microbiol.**, 39(4): 1608-1611, 2001.
- CHENG, M.F.; YANG, Y.L.; YAO, T.J.; LIN, C.Y.; LIU, J.S.; TANG, R.B.; YU, K.W.; FAN, Y.H.; HSIEH, K.S.; HO, M.; LO, H.J. Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species. **Infect. Dis.**, 5:22 doi:10.1186/1471-2334-5-22, 2005.
- CHO, T.; SUDOH, M.; TANAKA, T.; NAKASHIMA, Y.; CHIBANA, H. & KAMINISHI, H. Isolation and expression of a gene (CGR1) regulated during the yeast-hyphal transition in *Candida albicans*. **Biochem. Biophys. Acta**, 1517: 288-292, 2001.
- CHOI HW, SHIN JH, JUNG SI, PARK KH, CHO D, KEE SJ, SHIN MG, SUH SP & RYANG DW. Species-specific differences in the susceptibilities of biofilms formed by *Candida* bloodstream isolates to echinocandin antifungals. **Antimicrob Agents Chemother**, 51: 1520-1523, 2007.
- COLEMAN, D.C.; RINALDI, M.G.; HAYNES, K.A.; REX, J.H.; SUMMERBELL, R.C.; ANAÏSSIE, E.J. LI; A., SULLIVAN, D.J. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. **Med. Mycol.**, 36: 156-165, 1998.
- COLOMBO AL, NUCCI M, SALOMÃO R, BRANCHINI MLM, RICHTMANN R, DEROSI A & WEY SB. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian Tertiary Care Hospitals. **Diag Microbiol Infect Dis.**, 34: 281-286, 1999.
- COLOMBO, A.L., NUCCI, M.; PARK, B.J.; NOUER, S.A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; MATTA, D.A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **J. Clin. Microbiol.**, p.2816-2823, 2006.
- COOKE M. V., MILES J R. PRICE G R., MIDGLEY G., KHAMRI W., RICHARDSON C A. new chromogenic agar medium for the identification of *Candida* spp. **J. Appl. Microbiol.**, 68 (7): 3622–3627, 2002.
- COUTO, R.C., PEDROSA, T.M.G., NOGUEIRA, J.M. **Infecção hospitalar – Epidemiologia e controle**. 2ªed. São Paulo: Médica e Científica p.433-558, 1999.
- CUBELLS MARTINEZ XC, NARBAD A, CARTER AT, STRATFORD M. Flocculation of the yeast *Candida famata* (*Debaryomyces hansenii*): an essential role for peptone. **Yeast**, 12(5):415-23, 1996.
- CUENCA-ESTRELLA, M.; GOMEZ-LOPEZ, A.; MELLADO, E.; BUITRAGO, M.J.; MONZON, A.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. Head-to-Head Comparison of the

Activities of Currently Available Antifungal Agents against 3,378 Spanish Clinical Isolates of Yeasts and Filamentous Fungi. **Antimicro. ag. chemoth, Mar.**, p. 917–921, 2006.

DA MATTA, D.A.; ALMEIDA, L.P.; MACHADO, A.M.; AZEVEDO, A.C.; KUSANO, E.J.U.; TRAVASSOS, N.F.; SALOMÃO, R.; COLOMBO, A.L. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, 57: 399-404, 2007.

DE BERNARDIS, F.; MÜHLSCHLEGEL, F.A.; CASSONE A. & FONZI, W.A. The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, 66: 3317-3325, 1998.

DE BERNARDIS, F.; ARANCIA, S.; MORELLI, L.; HUBE, B.; SANGLARD, D.; SCHAFER, W.; CASSONE, A. Evidence that members of the secretory aspartyl proteinase gene family, in particular SAP2, are virulence factors for *Candida* vaginitis. **J. Infect. Dis.**, v. 179, p. 201-208, 1999.

DE CASTRO, L.E., SARRAF, O.A., LALLY, J.M., SANDOVAL, H.P., SOLOMON, K.D., VROMAN, D.T. *Cryptococcus albicus* keratitis after corneal transplantation. **Cornea**, 24(7): 882-883, 2005.

DIEKEMA DJ, MESSER SA, BRUEGGEMANN B. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. **J Clin Microbiol.**, 40: 1298-1302, 2002.

DIGNANI, M.C.; SOLOMKIN, J.S.; ANAISSIE, E. *Candida*. In: ANAISSIE, E., MCGINNIS, M.R., PFALLER, M.A., **Medical Mycology.**, Filadélfia :Churchill Livingstone, 2003. p. 195-239.

DOBSON, A.P. What links bats to emerging infectious diseases? **Science**, out. 2005 vol. 31, 2005.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, 15: 167-193, 2002.

DOUGLAS, L.J. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends Microbiol.**, 11(1): 30-36, 2003.

DUNN, B.M. Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. **Chem. Rev.**, 102(12): 4431-4458., 2002.

EGGERS, P.W., KIMMEL, P.L. Is there an epidemic of HIV Infection in the US ESRD program? **Am. Soc. Nephrol.**, 15(9):2477-85, 2004.

ENACHE-ANGOULVANT, A., HENNEQUIN, C. Invasive *Saccharomyces* infection: a comprehensive review. **Clin. Infect. Dis.**, 41(11): 1559-1568, 2005.

FELK, A.; KRETSCHMAR, M.; ALBRECHT, A.; SCHALLER, M.; BEINHAEUER, S.; NICHTERLEIN, T.; SANGLARD, D.; KORTING, H.C.; SCHÄFER, W. & HUBE, B. *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated

proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. **Infect. Immun.**, 70(7): 3689-3700, 2002.

FERNANDES, C.E. & MACHADO, R.B. Aspectos etiopatogênicos, vulvovaginal candidiasis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 9 (3): 335-348 diagnósticos e terapêuticos da candidíase vulvovaginal. **Rev. Bras. Medicina**, Goias, 7:100-104, 1996.

FILIPPIN, F.B.; SOUZA, L.C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B **Rev. Bras. Ciênc. Farmac.** vol. 42, n. 2, abr./jun., 2006

FINELLI, L, MILLER, J.T., TOKARS, J.I., ALTER, M.J., ARDUINO, M.J. National Surveillance of Dialysis-Associated Diseases in the United States, 2002 **Seminars in Dial.**, 18(10): 52-61, 2005.

FRASER, V.J.; JONES, M.; DUNKEL, J.; STORFER, S.; MEDOFF, G.; DUNAGAN, W.C. Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology, risk factors, and predictors of mortality. **Clin Infect Dis.**, 15(3): 414-421, 1992.

GALE, C.; FINKEL, D.; TAO, N.; MEINKE, M.; McCLELLAN, M.; OLSON, J.; KENDRICK, K. & HOSTETTER, M.K. Cloning and expression of a gene encoding an integrin-like proteins in *Candida albicans*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, 93: 357-361, 1996.

GALE, C.; BENDEL, C.M.; McCLELLAN, M.; HAUSER, M.; BECKER, J.M.; BERMAN, J. & HOSTETTER, M.K. Linkage of adhesion, filamentous growth and virulence in *Candida albicans* to a single gene, *INT1*. **Science**, 279:1355-1358, 1998.

GILAD, J., ESKIRA, S., SCHLAEFFER, F., VOROBIOV, M., MARCOVICI, A., TOVBIN, D., ZLOTNIK, M., BORER, A. Surveillance of chronic haemodialysis-associated infections in southern Israel. **Clin. Microbiol. Infect.**, 11: 547-552, 2005.

GOKCE, G.; CERIKCIOGLU, N.; YAGCI, A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. **Mycopathol.** 164(6):265-9, 2007.

GOLDANI L.Z. & MARIO P.S.S. *Candida tropicalis* fungemia in a tertiary care hospital. **J Infect.**, 46: 155–160, 2003.

GREEN, C.B.; CHENG, G.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P.; GHANNOUM M.A. & HOYER, L.L. RT-PCR detection of *Candida albicans* *ALS* gene expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model biofilms. **Microbiol.**, 150: 267-275, 2004.

GROHSCOPF, L.A., ROTH, V.R., FEIKIN, D.R., ARDUINO, M.J., CARSON, L.A., TOKARS, J.I., HOLT, S.C., JENSEN, B.J., HOFFMAN, R.E., JARVIS, W.R. *Serratia liquefaciens*: bloodstream infections from contamination of epoetin alfa at a hemodialysis center. **N. Engl. J. Med.**, 344(20): 1491-7, 2001.

GRÜNDER S, MAYSER P, REDMANN T, KALETA EF. Mycological examinations on the fungal flora of the chicken comb. **Mycoses.**, 48(2):114-9. 2005.

GUARRO, J., GENE, J., STCHIGEL, A.M. Developments in fungal taxonomy. **Clin. Microbiol Rev.**, 12: 454–500, 1999.

HAYNES, K.. Virulence in *Candida* species. **Trends Microbiol.**, Dec;9(12):591-6, 2001.

HAJJEH, R.A.; SOFAIR, A.N.; HARRISON, L.H.; LYON, G.M.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; MIRZA, S.A; PHELAN, M.; MORGAN,J.; LEE-YANG, W.; CIBLAK, M.A.; BENJAMIN, L.E.; SANZA, L.T.; HUIE, S.; YEO, S.F.; BRANDT, M.E.; WARNOCK, D.W. Incidence of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species and In Vitro Susceptibilities of Isolates Collected from 1998 to 2000 in a Population-Based Active Surveillance Program. **J. clin. Microbiol.**, p. 1519–1527, 2004.

HOENICH, N.A.; RONCO, C. **Haemodialysis Fluid: Composition and Clinical Importance.** *Blood Purif.*, 25:62–68, 2007.

HOFF G.L.; BIGLER, W.J.. The role of bats in the propagation and spread of histoplasmosis: a review. **J Wildl Dis.**,(17):, p 191-196, 1981.

HORNBY, J.M.; DUMITRU, R. & NICKERSON, K.W. High phosphate (up to 600 mM) induces pseudohyphal development in five wild type *Candida albicans*. **J. Microbiol. Meth.**, 56: 119-124, 2004.

HORVATH L. L.; HOSPENTHAL D. R.; MURRAY C. K.; DOOLEY D. P. Direct Isolation of *Candida* spp. from Blood Cultures on the Chromogenic Medium CHROMagar *Candida* . . **J. Clin. Microbiol.**, 41: 2629–2632, 2003.

HOYER, L.L.; PAYNE, T.L.; BELL, M.; MYERS, A.M. & SCHERER, S. *Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. **Curr. Genet.**, 33: 451-459, 1998a.

HOYER, L.L.; PAYNE, T.L. & HECHT, J.E.. Identification of *Candida albicans* ALS2 and ALS4 and localization of Als proteins to the fungal cell surface. **J. Bacteriol.**, 180(20): 5334-5343, 1998b.

HUBE, B., MONOD, M., SCHOFIELD, D.A., BROWN, A.J.P. AND GOW,N.A.R. Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. **Mol.Microbiol.**, 14, 87-99, 1994.

IBRAHIM, A.S.; MIRBOD, F.; FILLER, S.G.; BANNO, Y.; COLE, G.T.; KITAJIMA, Y.; EDWARDS Jr, J.E.; NOZAWA, Y.; GHANNOUM, M.A. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, 63(5): 1193-1198, 1995.

JABER, B.L. Bacterial infections in hemodialysis patients: pathogenesis and prevention. **Kidney Int.**, 67: 2508-2519, 2005.

JAYATILAKE, J. A.; SAMARANAYAKE, Y. H.; CHEUNG, L. K.; SAMARANAYAKE, L. P. Quantitative evaluation of tissue invasion by wild type, hyphal and SAP mutants of *Candida albicans*, and non-albicans *Candida* species in reconstituted human oral epithelium. **J. Oral Pathol. Med.**, 35, 484-491, 2006.

JORDÀ-MARCOS, R.; ALVAREZ-LERMA, F.; JURADO, M.; PALOMAR, M.; NOLLA-SALAS, J.; LEÓN, M.A.; LEÓN, C. Risk factors for candidaemia in critically ill patients: a prospective surveillance study. **Myc.** Jul;50(4):302-10, 2007.

JUNIOR, J.F. **Pronto Socorro – Fisiopatologia, diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 202-211, 1983.

KAM AP, XU J. Department of Biology Diversity of commensal yeasts within and among healthy hosts. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, 43(1):19-28, 2002.

KAMINISHI, H.; MIYAGUCHI, H.; TAMAKI, T.; SUENAGA, N.; HISAMATSU, M.; MIHASHI, I.; MATSUMOTO, H.; MAEDA, H.; HAGIHARA, Y. Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 3, p. 984-988, 1995.

KAO AS, BRANDT ME, PRUITT WR The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. **Clin Infect Dis.**, 29: 1164-1170, 2002.

KITE, P., EASTWOOD, K., SUGDEN, S., PERCIVAL, S.L.. Use of in vivo-generated biofilms from hemodialysis catheters to test the efficacy of a novel antimicrobial catheter lock for biofilm eradication in vitro. **J. Clin. Microbiol.**, 42(7): 3073-3076, 2004.

KOSEK, M., ALCANTARA, C., LIMA, A.A., GUERRANT, R.L. Cryptosporidiosis: an update. **Lancet Infect. Dis.**, 1(4): 262-269, 2001.

KONTOYIANNIS, D.P. & LEWIS, R.E. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. **The Lancet**, 359:1135-44, 2002.

KRCMERY, V.; BARNES, A.J. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **J Hosp Infect.**, 50(4):243-60, 2002.

KUHN DM, GEORGE T, CHANDRA J, MUKHERJEE PK & GHANNOUM MA Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphoterecin B lipid formulations and echinocandins. **Antimicrob Agents Chemother**, 46: 1773-1780, 2002.

KUHN, D.M.; MUKHERJEE, P.K.; CLARK, T.A.; PUJOL, C.; CHANDRA, J.; HAJJEH, R.A.; WARNOCK, D.W.; SOLL, D.R.; GHANNOUM, M.A. *Candida* parapsilosis: Characterization in an Outbreak Setting. **Emerg. Infect. Dis.**, 10(6):1074-81, 2004.

KUMAMOTO, C.A. *Candida* biofilms. **Cur. Opin. Microbiol.**, 5: 608-611, 2002.

KURTZMAN, C.P. & FELL, J.W. ed. In: **The yeasts, a taxonomic study**. 4th ed. Amsterdam: Elsevier Science, 1998.

LACAZ, C.S., PORTO, E., MATINS, J.E.C. **Micologia médica – fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 8.ed. São Paulo: Savier, 1991.

LAUPLAND KB, GREGSON DB, CHURCH DL, ROSS T, ELSAYED S. Invasive *Candida* species infections: a 5 year population-based assessment. **J Antimicrob Chemother.**, 56(3):532-7, 2005.

LECLERC H.; SCHWARTZBROD L.; DEI-CAS E. Microbial agents associated with waterborne diseases. **Crit. Rev. Microbiol.**,28(4):371-409, 2002.

LEIDICH, S.D., IBRAHIM, A.S., FU, Y., KOUL, A., JESSUP, C., VITULLO, J., FONZI, W., MIRBOD, F., NAKASHIMA, S., NOZAWA, Y. AND GHANNOUM, M.A. Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. **J. Biol. Chem.**, 273, 26078-26086, 1998

LEUNG AYH, CHIM CS, HO PL, CHENG VCC, YUEN KY, LIE AKW, AU WY, LIANG R & KWONG YL *Candida tropicalis* fungaemia in adult patients with haematological malignancies: clinical features and risk factors. **J Hosp Infect.**, 50: 316–319, 2002

LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. **Antimicrob. Ag. Chemother.**, 45(4): 999-1007, 2001.

LI, Y.; SUN, S.; GUO, Q.; MA, L.; SHI, C.; SU, L.; LI, H. In vitro interaction between azoles and cyclosporin A against clinical isolates of *Candida albicans* determined by the checkerboard method and time–kill curves. **J. Antimicrob. Chemother. Advan.**, January 22, 2008.

LINARES, J., SITGES-SERRA, A., GARAU, J., PEREZ, J.L., MARTIN, R. Pathogenesis of catheter sepsis: a prospective study with quantitative and semiquantitative cultures of catheter hub and segments. **J. Clin. Microbiol.**, 21(3):357-60, 1998.

LO, H.J.; KOHLER, J.R.; DIDOMENICO, B.; LOEBENBERG, D.; CACCIAPUOTI, A. & FINK, G.R. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent., **Cell**, 90: 939-949, 1997.

LONNEMANN G., SERENI L., LEMKE H.D., TETTA C. Pyrogen retention by highly permeable synthetic membranes during in vitro dialysis. **Artif Organs**, 26(9):817, 2001.

LUO, G.; SAMARANAYAKE, L.P. & YAU, J.Y. - *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. **J. clin. Microbiol.**, 39: 2971-2974, 2001.

McLAIN, N. & DOLAN, J.W. Phospholipase D activity is required for dimorphic transition in *Candida albicans*. **Microbiol.**, 143: 3521-3526, 1997.

MAGALHAES M., DOHERTY C., GOVAN JR., VANDAMME P. Polyclonal outbreak of *Burkholderia cepacia* complex bacteraemia in haemodialysis patients. **J. Hosp. Infect.**, Jan; 56(1):76-7, 2004.

MAH, T.F., O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiol.**, 9(1):34-9, 2001.

- MAIDA, C.M.; MILICI, M.E.; OLIVERI, S. In vitro activity of fluconazole, voriconazole and caspofungin against clinical yeast isolates. **J Chemother.**, Jun;19(3):277-82, 2007.
- MANCIANTI F, NARDONI S, CECCHERELLI R. Occurrence of yeasts in psittacines droppings from captive birds in Italy. **Mycopathologia**,153(3):121-4, 2002.
- MATHEMA B., CROSS E., DUN E., PARK S., BEDELL J., SLADE B., WILLIAMS M., RILEY L., CHATURVEDI V., PERLIN DS.. Prevalence of vaginal colonization by drug-resistant *Candida* species in college-age women with previous exposure to over-the-counter azole antifungals. **Clin Infect Dis.**, 33(5):E23-7, 2001.
- MARAJ, S., JACOBS L.E., KUNG, S.C., RAJA, R., KRISHNASAMY, P., MARAJ, R., BRAITMAN, L.E., KOTLER, M.N. Epidemiology and outcomes of infective endocarditis in hemodialyzed patients. **Am. J. Med. Sci.**, 324 (5): 254-260, 2002.
- MAYEN, F. Haematophagous Bats in Brazil, Their Role in Rabies Transmission, Impact on Public Health, Livestock Industry and Alternatives to an Indiscriminate Reduction of Bat Population. **J. Vet., Med.**, B 50, 469–472, 2003.
- MEDEIROS, E.A.; LOTT, T.J.; COLOMBO, A.L.; GODOY, P.; COUTINHO, A.P.; BRAGA, M.S.; NUCCI, M.; BRANDT, M.E. Evidence for a pseudo-outbreak of *Candida guilliermondii* fungemia in a university hospital in Brazil. **J Clin. Microbiol.**, 45(3):942-7, 2007.
- MEINERZ, A.R.M.; CLEFF, M.B.; NASCENTE, P.S.; NOBRE, M.O.; SCHUCH, L.F.D.; ANTUNES, T.A.; XAVIER, M.O.; MEIRELES, M.C.A.;2, MELLO, J.R.B.; Efeitos de doses elevadas da terbinafina e itraconazol em ratos Wistar. **Rev. Bras. Ciênc. Farmac.**, v. 43, n. 1, 2007.
- METWALLY L, WALKER MJ, COYLE PV, HAY RJ, HEDDERWICK S, MCCLOSKEY BV, O'NEILL HJ, WEBB CH, MCMULLAN R. Trends in candidemia and antifungal susceptibility in a university hospital in Northern Ireland 2001-2006. **J Infect.**, Aug;55(2):174-8, 2007.
- MIGLIORATI, C.A., BIRMAN, E.G., CURY, A.E.. Oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients under treatment with protease inhibitors. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, 98(3): 301-310, 2004.
- MIRETZKI, M.. Morcegos do estado do Paraná, Brasil (Mammalia, Chiroptera): riqueza de espécies, distribuição e síntese do conhecimento atual. **Papéis Avulsos de Zoologia, Museu de Zoologia da USP**, Vol. 43(6):101-138, 2003.
- MOK, W.Y.; LUIZÃO, R.C.C.; SILVA, M.S.B. Isolation of fungi from bats of the Amazon Basin. **App. Environ. Microbiol.**, Sept.1982, p.570-575, 1982.
- MORAN, G.P.; SULLIVAN, D.J.; HENMAN, M.C.; McCREARY, C.E.; HARRINGTON, B.J.; SHANLEY, D.B. & COLEMAN, D.C. Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives *in vitro*. **Antimicrobiol. Agents. Chemoth.**, 41(3): 617-623, 1997.

MORSCHHÄUSER, J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. **Biochim. Biophys. Acta**, 1587: 240-248, 2002.

MORIN, P. Identification of the bacteriological contamination of a water treatment line used for haemodialysis and its disinfection. **J. Hosp. Infect.**, 45: 218–224, 2000.

MORSCHHÄUSER, J.; VIRKOLA, R.; KORHONEN, T.K. & HACKER, J. Degradation of human subendothelial extracellular matrix by proteinase-secreting *Candida albicans*. **FEMS Microbiol. Let.**, 153: 349-355, 1997.

MUKHERJEE, P. K.; CHANDRA, J.; KUHN, D. M.; GHANNOUM, M. A. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phasespecific role of efflux pumps and membrane sterols. **Infect. Immun.** 71:4333– 4340, 2003.

NARAYAN, S., BATTA, K., COLLOBY, P., TAN, C.Y. Cutaneous cryptococcus infection due to *C. albidus* associated with Sezary syndrome. **BR. J. Dermatol.**, 143(3): 632-634, 2000.

NGUYEN, M.H., PEACOCK, J.E., MORRIS, A.J., TANNER, D.C. NGUYEN, M.L., SNYDMAN D.R. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. **Am. J. Med.**, 100: 617–23, 1996a.

NUCCI M & COLOMBO AL. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, 58: 77-82, 2007.

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

ODDS, F.; AUSMA, J.; GERVEN, F.V.; WOESTENBORGH, F.; MEERPOEL, L.; HEERES, J.; BOSSCHE, H.V. ; BORGERS, M. **In Vitro and In Vivo Activities of the Novel Azole Antifungal Agent R126638.** **Antimicrob. Ag. Chemoth.**, Feb.p. 388–391, 2004.

OIE, S., KAMIYA, A., YONEDA, I., UCHIYAMA, K., TSUCHIDA, M., TAKAI, K., NAITO, K. Microbial contamination of dialysate and its prevention in haemodialysis units. **J. Hosp. Infect.**, 54: 115-119, 2003.

OKSUZ, S.; SAHIN, I.; YILDIRIM, M.; GULCAN, A.; YAVUZ, T.; KAYA, D.; KOC A.N. Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. **J Infect Dis.**, Sep;60(5):280-3, 2007.

OLIVER, M.J., CALLERY, S.M., THORPE, K.E., SCHWAB, S.J., CHURCHILL, D.N. Risk of bacteremia from temporary hemodialysis catheters by site of insertion and duration of use: a prospective study. **Kidney Int.**, 58: 2543-2545, 2000.

PASQUALOTTO, A.C., NEDEL, W.L., MACHADO, T.S., SEVERO, L.C. A comparative study of risk factors and outcome among outpatient-acquired and nosocomial candidaemia. **J. Hosp. Infect.**, 60: 129–134, 2005.

PENDRAK, M.L.; YAN, S.S. & ROBERTS, D.D. Sensing the host environment: recognition of hemoglobin by the pathogenic yeast *Candida albicans*. **Arch. Biochem. Biophys.**, 426: 148-156, 2004.

PERUMAL, P.; MEKALA, S.; CHAFFIN, W. L. Role for Cell Density in Antifungal Drug Resistance in *Candida albicans* Biofilms. **Antimicrob. Agents and Chemot.** p. 2454–2463 Vol. 51, No. 7, 2007.

PFALLER MA, JONES RN, MESSER SA, EDMOND MB, WENZEL RP. 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. SCOPE Participant Group. Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, 30(2):121-9, 1998.

PFALLER MA, DIEKEMA DJ; INTERNATIONAL FUNGAL SURVEILLANCE PARTICIPANT GROUP.) Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. **Clin Microbiol Infect.**, 2004 Mar;10 Suppl 1:11-23, 2004.

POWE, N.R., JAAR, B., FURTH, S.L., HERMANN, J., BRIGGS, W. Septicemia in dialysis patients: incidence, risk factors, and prognosis. **Kidney Int.**, 55(3):1081-90, 1999.

PRINSLOO, B., WELDHAGEN, G.F., BLAINE, R.W. *Candida famata* central nervous system infection. **S. Afr. Med. J.**, 93:601-612, 2003.

QUINDOS, G., CABRERA, F., ARILLA, M.C., BURGOS, A., ORTIZ-VIGON, R., CANON, J.L., PONTON, J. Fatal *Candida famata* peritonitis in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis who was treated with fluconazole. **Clin. Infect. Dis.**, 18(4): 658-660, 1994.

QUINDÓS, G.; CARRILLO-MUÑOZ, A.J.; ERASO, E.; CANTÓN, E.; PEMÁN, J. Actividad antifúngica in vitro de voriconazol: Nuevos datos después de los primeros años de experiencia clínica. **Rev Iberoam Micol.**, 24: 198-209, 2007.

RAMAGE, G., MARTÍNEZ, J.P., LÓPEZ-RIBOT, J.L., *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. **FEMS Yeast Res.**, 6, 979-986, 2006.

RAMOS-FILHO, R., CARNEIRO, M.A.S., TELES, S.A., DIAS, M.A., CARDOSO, D.D.P., LAMPE, E., YOSHIDA, C.F.T., MARTINS, R.M.B. GB virus C/Hepatitis G virus infection in dialysis patients and kidney transplant recipients in Central Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 99(6): 639-643, 2004.

RAO, N.A., NERENBERG, A.V., FORSTER, D.J. *Torulopsis candida* (*Candida famata*) endophthalmitis simulating *Propionibacterium acnes* syndrome. **Arch. Ophthalmol.**, 109(12): 1718-1721, 1991.

REDMOND, A.; DANCER, C.; WOODS, M.L. Fungal infection of the central nervous system: a review of fungal pathogens and treatment. **Neurol. Ind.**, 55(3):251-9, 2007.

REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; FANDIÑO-MARIÑO, H.; ROCHA, V.J. **Mamíferos da fazenda Monte Alegre – Paraná**. Londrina: EDUEL, 2005.

REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P.; **Mamíferos do Brasil**. Londrina: EDUEL, 2006. 437p. 2006.

REPENTIGNY, L. Animal models in the analysis of *Candida* host-pathogen interactions. **Curr Opin Microbiol.**, Aug;7(4):324-9, 2004.

REX, J.H.; WALSH, T.J.; SOBEL, J.D.; FILLER, S.G.; PAPPAS, P.G.; DISMUKES, W.E.; EDWARDS, J.E. Practice Guidelines for the treatment of candidiasis. Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis.**, 30(4): 662-678, 2000.

RIBEIRO, M.A.; MIRANDA, A.E.; GAMBALE, W.; PAULA C.R. Prevalence and exoenzyme secretion by *Candida albicans* isolates from oral and vaginal mucosae of HIV-infected women. **Mycopathol.**, Apr;157(3):255-61, 2004.

ROSNER, M.H. Hemodialysis for the non-nephrologist. **Southern Med. J.**, 98(8): 785-791, 2005.

RŮZICKA, F.; HOLÁ, V.; VOTAVA, M. The yeast biofilm in human medicine **Klin Mikrobiol Infekc Lek.**, Aug;13(4):145-9, 2007.

SAFDAR, N., FINE, J.P., MAKI, D.G. Meta-analysis: methods for diagnosing intravascular device-related bloodstream infection. **Ann. Intern. Med.**, 142(6):451-66, 2005.

SAMARANAYAKE, Y.H.; YE, J.; YAU, J. Y.; CHEUNG, B. P.; SAMARANAYAKE, L. P. In vitro method to study antifungal perfusion in *Candida* biofilms. **J. Clin. Microbiol.**, 43:818–825, 2005.

SAMARANAYAKE, Y.H.; DASSANAYAKE, R.S.; JAYATILAKE, J.A.; CHEUNG, B.P.; YAU J.Y.; YEUNG K.W.; SAMARANAYAKE, L.P. Phospholipase B enzyme expression is not associated with other virulence attributes in *Candida albicans* isolates from patients with human immunodeficiency virus infection. **J Med Microbiol.**, Jun;54(Pt 6):583-93, 2005.

SANGLARD, D.; HUBE, B.; MONOD, M.; ODDS, F. C.; GOW, N. A. A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes SAP4, SAP5 and SAP6 of *Candida albicans* causes attenuated virulence. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 3539-3546, 1997.

SANGLARD, D.; ISCHER, F.; CALABRESE, D.; MAJCHERCZYK, P.A. & BILLE, J. The ATP binding cassette transporter gene CgCDR1 from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungals agents. **Antimicrobial Agents Chemother.**, 43(11): 2753-2765, 1999.

SANGLARD, D.; ISCHER, F.; PERKINSON, T.; FALCONER, D. & BILLE, J. *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. **Antimicrobial Agents Chemother.**, 47(8): 2404-2412, 2003.

SAPORITO-IRWIN, S.M.; BIRSE, C.E.; SYPHERD, P.S. & FONZI, W.A. PHR1, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. **Mol. Cell Biol.**, 15: 601-613, 1995.

SAXENA, A.K.; PANHOTRA, B.R.. Hemodialysis catheter-related bloodstream infections: current treatment options and strategies for prevention. **Swiss Med Wkly**, 155: 127-138, 2005.

SCHALLER, M.; HUBE, B.; OLLERT, M. W.; SCHAFFER, W.; BORG-VON ZEPELIN, M.; THOMA-GREBER, E.; KORTING, H. C. *In vivo* expression and localization of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases during oral candidiasis in HIV-infected patients. **Journal Investig. Dermatol.**, v. 112, p. 383-386, 1999.

SCHALLER, M.; KORTING, H.C.; SCHÄFER, W.; BASTERT, J.; CHEN, W.C. & HUBE, B. Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. **Mol. Microbiol.**, 34(1): 169-180, 1999.

SCHALLER, M.; SCHACKERT, C.; KORTING, H. C.; JANUSCHKE, E.; HUBE, B. Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis. **Journal Investig. Dermatol.**, v. 114, p. 712-717, 2000.

SCHALLER, M.; BORELLI, C.; KORTING, H.C.; HUBE, B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. **Mycos.**, 48, 365–377, 2005.

SCHEINFELD, N.J. A review of the new antifungals: posaconazole, micafungin, and anidulafungin. **Drugs Dermatol.**, Dec; 6(12):1249-51, 2007.

SHARIFF, G., BRENNAN, M.T., LOUISE KENT, M., FOX, P.C., WEINRIB, D., BURGESS, P., LOCKHART, P.B. Relationship between oral bacteria and hemodialysis access infection. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, 98(4): 418-422, 2004.

SIDRIM, J.J.C., ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SÓCZÓ G, KARDOS G, MCNICHOLAS PM, FALUSI E, GERGELY L, MAJOROS L. Posaconazole susceptibility testing against *Candida* species: comparison of broth microdilution and E-test methods. **Mycoses**, 50(3):178-82, 2007.

SOUZA, A.V., MOREIRA, C.R., PASTERNAK, J., HIRATA, M.D.E.L., SALTINI, D.A., CAETANO, V.C., CIOSEK, S., AZEVEDO, F.M., SEVERINO, P.; VANDAMME, P., MAGALHAES, V.D. Characterizing uncommon *Burkholderia cepacia* complex isolates from an outbreak in a haemodialysis unit. **J. Med. Microbiol.**, 53(10): 999-1005, 2004.

STAAB, J.F.; FERRER, C.A. & SUNDSTROM, P. Developmental expression of a tandemly repeated, proline- and glutamine-rich amino acid motif on hyphal surfaces on *Candida albicans*. **J. Biol. Chem.**, 271: 6298-6305, 1996.

STAAB, J.F.; BRADWAY, S.D.; FIDEL, P.L. & SUNDSTROM, P. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. **Science**, 283: 1535-1538, 1999.

STAIB, P., KRETSCHMAR, M., NICHTERLEIN, T., HOF, H. AND MORSCHHAUSER, J. Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA 97,6102-6107, 2000.

STEHR, F.; FELK, A.; KRETSCHMAR, M.; SCHALLER, M.; SCHÄFER, W.; HUBE, B. Extracellular hydrolytic enzymes and their relevance during *Candida albicans* infections. **Myc.**, 43 Suppl 2:17-21, 2000.

SULLIVAN, D. J. ; WESTERNENG, T. J.; HAYNES, K. A.; BENNETT, D. E.; COLLEMAN, D. C. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterisation of a novel species associated with oral candidosis in –HIV infected individuals. **Microbiol.**, 141: 1507-1521., 1995.

TAMURA, N.K. NEGRI, M.F.N.; BONASSOLI, L.A.; SVIDZINSK, T.I.E. Fatores de virulência de *Candida* spp isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 40(1):91-93, 2007.

TANG, S., LAI, K.N. Chronic viral hepatitis in hemodialysis patients. **Hemodial Int.**, (2): 169-179, 2005.

TAYLOR M.L., CHÁVEZ-TAPIA CB., VARGAS-YAÑEZ R, RODRÍGUEZ-ARELLANES G., PEÑA-SANDOVAL G.R., TORIELLO C., PÉREZ A., REYES-MONTES M.R. Environmental conditions favoring bat infection with *Histoplasma capsulatum* in Mexican shelters. **Am J Trop Med Hyg.**, 61(6):914-9, 1999.

TOKARS, J.I., LIGHT, P., ANDERSON, J., MILLER, E.R., PARRISH, J., ARMISTEAD, N., JARVIS, W.R., GEHR, T. A prospective study of vascular access infections at seven outpatient hemodialysis centers. **Am. J. Kidney Dis.**, 37(6):1232-40, 2001.

TSANG, C.S.; CHU, F.C.; LEUNG, W.K.; JIN, L.J.; SAMARANAYAKE, L.P.; SIU, S. C.J. Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. **Med. Microbiol.**, Oct. 56(Pt 10):1393-8, 2007.

UPPULURI, P.; NETT, J.; HEITMAN, J.; ANDES, D. **Synergistic effect of calcineurin inhibitors and fluconazole against *Candida albicans* biofilms.** , Jan 7 [Epub ahead of print], 2008.

VALENTÍN, A.; CANTÓN, E.; PEMÁN, J.; QUINDÓS, G. In vitro activity of amphotericin B and anidulafungin against *Candida* spp. biofilms. **Rev Iberoam Micol.**, Dec; 24(4):272-7., 2007.

VAN BURIK, J-A. H., MAGEE, P.T. Aspects of fungal pathogenesis in humans. **Ann. Rev. Microbiol.**, 55: 743-772, 2001.

VILANOVA, M.; TEIXEIRA, L.; CARAMALHO, I.; TORRADO, E.; MARQUES, A.; MADUREIRA, P.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, P.; GAMA, M.; DEMENGEOT, J.

Protection against systemic candidiasis in mice immunized with secreted aspartic proteinase 2. **Immunol.Mar**;111(3):334-42, 2004.

VISCOLI C, GIRMENIA C, MARINUS A, COLLETTE L, MARTINO P, VANDERCAM B, DOYEN C, LEBEAU B, SPENCE D, KRCMERY V, DE PAUW B, MEUNIER F. 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). **Clin Infect Dis.** 28(5):1071-9, 1999.

WAGNER, D., SANDER, A., BERTZ, H., FINKE, J., KERN, W.V. Breakthrough invasive infection due to *Debaryomyces hansenii* (teleomorph *Candida famata*) and *Scopulariopsis brevicaulis* in a stem cell transplant patient receiving liposomal amphotericin b and caspofungin for suspected aspergillosis. **Infection**, 33(5-6): 397-400, 2005.

WARD, R.A. Dialysis water as a determinant of the adequacy of dialysis. **Seminar in Nephrology**, 25(2):102-11, 2004.

WATTS, H. J.; CHEAH, F. S.; HUBE, B.; SANGLARD, D.; GOW, N. A. R. Altered adherence in strains of *Candida albicans* harbouring null mutations in secreted aspartic proteinase genes. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 159, p. 129-135, 1998.

WEIG, M., GROB, U., MÜHLSCHLEGEL, F. Clinical aspects and pathogenesis of *Candida* infection. **Trends Microbiol.**, 6(12): 468-470, 1998.

WEINBERGER M, LEIBOVICI L, PEREZ S ET AL. Characteristics of candidaemia with *Candida albicans* compared with nonalbicans *Candida* species and predictors of mortality. **J HospInfect.**, 61: 146–154, 2005.

WHITE, T.C. Increased mRNA levels of ERG16, CDR and MDR1 correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. **Antimicrobial Agents Chemother.**, 41(7): 1482-1487, 1997a.

WHITE, T.C. The presence of an R467K amino acid substitution and loss of allelic variation correlate with an azole-resistant lanosterol 14 alpha demethylase in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents Chemother.**, 41(7): 1488-1494, 1997b.

WHITE, T. C.; HOLLEMAN, S.; LAURENCE, F. D.; STEVENS, D. A. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents Chemother** , 46(6): 1704-1713, 2002.

WHO – World Health Organization Guidelines for Drinking-Water Quality. v1, 3rd ed. 540p., 2004.

WONG, P.N., FUNG, T.T., MAK, S.K., LO, K.Y., TONG, G.M., WONG, Y., LOO, C.K., LAM, E.K., WONG, A.K. Hepatitis B virus infection in dialysis patients. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, 20(11): 1641-1651, 2005.

ZAUGG, C.; BORG-VON ZEPELIN, M.; REICHARD, U.; SANGLARD, D.; MONOD, M. Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. **Infection and Immunity.**, v. 69, n. 1, p. 405-412, 2001.

ZU KHAN, AHMAD S., MOKADDAS E., CHANDY R. Tobacco agar, a new method for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. **J. Clin. Microbiol.**, 42(10): 4796-4798, 2004.

ZUNINO P, BELTRÁN L, ZUNINO L, MÉNDEZ H, PERCOVICH V, ROCCA R, ANTONELLI B. Microbiological quality of hemodialysis water in a three-year multicenter study in Uruguay. **J Nephrol.**, 15(4):374-9, 2002.

ANEXOS

ANEXO A**Potential virulence of *Candida famata* isolated from dialysate**

Natália de Souza Botelho^a, Suelen Balero de Paula^a, Vanessa Di Raimo^a, Rita de Cássia Pontello Rampazzo^b, Cíntia R.M. Borges^c, Jacinta Sanchez Pelayo^a Lucy Megumi Yamauchi^a & Sueli Fumie Yamada-Ogatta^{a*}

^a Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

^b Instituto de Biologia Molecular do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

^c Departamento de Microbiologia e Imunologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil..

* Corresponding author. Tel: +55-43-3371-4297; fax: +55-43-3371-4192.

E-mail address: ogatta@uel.br (S.F. Yamada-Ogatta)

Abstract

Candida famata is an opportunistic microorganism found as commensal in the mucous membranes of animals. This species has been emerged as potential pathogen that causes several types of infections in human and animals. In this study, the potential pathogenic of *C. famata* isolated from hemodialysis dialysate was evaluated. Initially, the dialysate isolate was inoculated in Swiss mice and after five days 75% animals died. The microorganism was recovered from liver and spleen homogenates in SD agar. Both isolates were assayed regarding putative virulence factors. In addition, the biofilm formation capacity and antimicrobial susceptibility pattern were determined. Both isolates presented hemolytic and protease activities, and were phospholipase negative. Planktonic cells of both were susceptible to fluconazole and sodium hypochlorite whereas the sessile counterparts' cells were resistant to them. There was no significant difference on the results obtained for the dialysate and post-infection *C. famata* isolates, except for biofilm formation. This article presents novel data in the putative virulence attributes of this opportunistic yeast.

Keywords: *Candida famata*, dialysate, virulence factors, antifungal, biofilm.

INTRODUCTION

Candida species are among the most common fungal opportunistic pathogens. They are commensal microorganisms of mucosal surfaces of healthy individuals but can cause localized mild infection as well as life-threatening disseminated candidiasis, mainly in immunocompromised patients (SOLL, 2002). The incidence of invasive *Candida* infections has increased dramatically in recent years (PFALLER *et al.*, 1998; KAO *et al.*, 1999; DIEKEMA *et al.*, 2002; HAJJEH *et al.*, 2004; LAUPLAND *et al.*, 2005; NUCCI & COLOMBO, 2007). Several risk factors are associated with invasive candidiasis including the use of central venous catheters, parenteral nutrition, immunosuppressive and broad-spectrum antibiotic therapies. In

addition, underlying conditions such as diabetes mellitus, cancer patients and transplant recipients may all be risks (LAUPLAND *et al.*, 2005; RUNKE, 2006).

Patients receiving long-term hemodialysis are also at increased risk of bloodstream infections by a number of microorganisms, including *Candida* spp (LAUPLAND *et al.*, 2005; PASQUALOTTO *et al.*, 2005). Inadequate catheter care, contamination of the water supply and dialysates, and inefficient methods of equipments disinfection can be implicated in outbreaks in haemodialysis unit (BRUNET & BERLAND, 2000; AVARNITIDOU *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2004).

The chemical and microbiological quality of the water and dialysates is essential to avoid complications in hemodialysis patients. According to the American Association of Medical Instrumentation (AAMI) standards the water used for the preparation of dialysates should contain no more than 200 cfu/ml, and dialysates should contain no more than 2000 cfu/ml of heterotrophic bacteria (AAMI, 2004). The Brazilian standards recommend the same limit regarding the heterotrophic bacteria for the treated water and it also should not contain total coliform (Ordinance 82/2000).

Several reports of the bacterial contamination of water and dialysates have been described (AVARNITIDOU *et al.*, 1998; 2000; ZUNINO *et al.*, 2002; OIE *et al.*, 2003; BORGES *et al.*, 2007). Regarding the occurrence of fungi, Klein *et al.* (1990) analyzed 51 dialysis centres in the Central United States. The mold *Exophiala jeanselmei* was the most frequent species isolated from both treated water and dialysate whereas the yeasts *Candida tropicalis* and *Rhodotorula glutinis*, and *Candida parapsilosis* were frequently isolated from treated water and dialysate, respectively. Avarnitidou *et al.* (2000) examined samples of tap water, treated water and effluent dialysate from 85 hemodialysis units in Greece. Overall, the molds *Aspergillus* spp and *Penicillium* spp, and yeasts of the genus *Candida* were the most frequent isolates. They also observed that the occurrence of yeasts was significantly higher in dialysate than in tap water samples.

Although the most frequent fungi isolated in the hemodialysis units has been infrequently associated with healthy humans infections, the presence of these microorganisms raise important questions about 1) the potential risk of infections due to the immune state of the patients, and 2) biofilm formation on the surface of the hydraulic circuit (MAN *et al.*, 1998; CAPELLI *et al.*, 2003) and on the catheter surface (KITE *et al.*, 2004). Biofilm consists of surface-attached communities of cells

embedded within an exopolymeric matrix produce by them. Microorganisms forming biofilm present a different phenotype related to growth rates, and susceptibility to antimicrobial agents, environmental stress and phagocytosis (DONLAN & COSTERTON, 2002; VUONG *et al.*, 2004; BIZERRA *et al.*, 2007). Then, biofilm formation may reduce significantly the efficacy of available disinfection modalities (CAPELLI *et al.*, 2003) contributing for the persistence of the microorganisms in hemodialysis systems. Consequently, microorganisms can be transferred to patient and causing infections.

In this study the yeast *Candida famata*, isolated from dialysate of a hemodialysis unit in Ponta Grossa, Paraná, Brazil, was characterized regarding its pathogenic potential.

MATERIALS AND METHODS

ISOLATE IDENTIFICATION

The dialysate isolate was cultured in Sabouraud dextrose (SD) agar (Himedia, India) medium supplemented with 50 µg/ml of chloramphenicol. The isolates were also cultured on CHROMagar Candida® medium (Probac, Brazil) for differential growth analysis. The cultures were incubated at 35 °C for 24-96 h under aerobic conditions. The identity of the isolated yeast was confirmed by standard mycological methodology (LARONE, 1995; KURTZMAN & FELL, 1998) such as, germ-test tube, production of chlamydoconidia on cornmeal agar with 0.5 % Tween 80 and sugar assimilation and fermentation pattern.

ANIMALS AND *C. FAMATA* INOCULATION

Swiss mice were obtained from the breeding colonies of the animal facility from the Centro de Ciências Biológicas (CCB) at Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Brazil. Eight- to 12-week-old female mice were used in all experiments. Mice were maintained under standard conditions in the animal facility in the Departamento de Ciências Patológicas, CCB, UEL. Commercial rodent diet

(Nuvilab-CR1, Nuvital, Campo Mourão, Brazil) and sterilized water were available *ad libitum*. All procedures with the animals were in accordance with the guidelines of the Brazilian Code for the Use of Laboratory Animals. The yeasts (1.0×10^7 cells) were inoculated intravenously and survival rates were determined daily, beginning on the 2nd day of infection. After the animal death, the liver and spleen homogenates were inoculated on SD agar medium, and the cultures were incubated at 35 °C during 24-96h.

BIOFILM PRODUCTION ASSAY

Determination of biofilm production was performed on polystyrene, flat-bottomed 96-well microtiter plates (Techno Plastic Products, Switzerland) using the procedure described previously (Shin *et al.*, 2002). In brief, the yeast isolates were cultured at 37 °C for 24 h in SD broth (Himedia, Índia), and the cells were counted. A 20- μ l SD broth suspension of 6×10^5 yeasts was placed into each well containing 180 μ l of culture medium. The plates were incubated at 35 °C for 24 h and washed once with sterile distilled water. Approximately 200 μ l of sterile distilled water were added to each well before spectrophotometric readings at 490 nm with a microtiter plate reader (Universal Microplate Reader ELx 800, Bio-Tek Instruments, USA). Experiments were carried out in triplicate on three different occasions. A semi-quantitative measure of biofilm production was calculated according to the percentage of transmittance blocked as described by the above authors.

ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY TESTING

The minimum inhibitory concentration (MIC) of fluconazole (Pfizer Central Research, United Kingdom) for the planktonic cells of *C. famata* was determined by broth microdilution assays for yeasts according to the Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI (M27-A2 document, NCCLS, 2002)]. Quality control *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil) was included in each experiment. Two wells of each plate served as growth and sterility

controls. The following breakpoints definitions for fluconazole were used according to CLSI guidelines, considering isolates with MICs ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$, resistant, isolates between 16-32 $\mu\text{g/ml}$, susceptible dose dependent and isolates with MICs ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$, susceptible.

DISINFECTANT ACTIVITY

The activity of sodium hypochlorite on planktonic cells was evaluated as described by Litsky & Litsky (1968), with some modifications. In brief, the isolates were added to 3-ml SD broth and incubated for 24 h at 37 °C. The cell density was adjusted to 1.0×10^6 cels/ml and a 1-ml aliquot of this cellular suspension was added to 4.0-ml 0.05% sodium hypochlorite (Macromedia). The tubes were manually agitated for 1 min and incubated at room temperature for 10, 30 and 120 min. After that, aliquots of 0.1 ml of his mixture was inoculated onto SD agar supplemented with 0.06% sodium thiosulphate neutralizer and the plates were incubated for 48 h at 37 °C. The results were expressed as CFU/ml. For sessile cells, the biofilm was formed as above and approximately 200 μl of sterile 0.05% sodium hypochlorite were added to each well. The plates were incubated at room temperature during 10, 30 and 120 min and the disinfectant was removed by washing with sterilized neutralizer and water. The adhered cells were removed by scraping the wells with sterile tooth pick and the CFU were determined as above.

DETERMINATION OF EXTRACELLULAR PROTEASE AND PHOSPHOLIPASE ACTIVITIES

The enzymatic activity was carried out on agar plate containing skim milk and egg yolk as protease and phospholipase substrate, respectively. For protease activity, the yeast isolate was cultured at 37 °C for 18 h in minimal medium broth (PONTECORVO *et al.*, 1953) supplemented with 0.6% skim milk pH 4.0 to induce the secretion of protease. To determine phospholipase activity, the cellular suspension was placed on the surface of the SD agar medium supplemented with 4% egg yolk, 350 μM NaCl and 6.5 μM CaCl_2 , pH 4.5. Beforehand, one egg yolk was

mixed in sterile distilled water (w/v) and centrifuged at 500 g for 10 min, and the supernatant was then added to sterilized SD agar at the specified concentration. Cells were counted in hemocytometric chamber (Neubauer Improved Chamber) and a 10- μ l suspension of 10^6 yeasts was placed on the surface of the medium, and the cultures were incubated at 37 °C for 96 h, after which the diameter of the degradation zone around the colony was determined. The enzymatic activity was determined by calculating the ratio between colony diameter and colony diameter plus degradation/precipitation zone (Dz/Pz values of 1 indicate no detectable protease or phospholipase activity, respectively). The isolate was classified according to Price *et al.*, (1982). The isolate was tested in triplicate, and the experiment was carried out on three different occasions.

DETERMINATION OF HEMOLYTIC ACTIVITY

Hemolytic activity of the yeasts was determined according to Luo *et al.*, (2001) with the same cell density as above. The cells were spotted on the surface of SD agar medium supplemented with 3% glucose (Sigma, USA) and 5% fresh sheep blood, pH 5.6. The plates were incubated at 37 °C in 5% CO₂ for 48 h. Hemolytic activity was indicated by a translucent halo around the inoculum site. Each isolate was tested in triplicate, and the experiment was carried out on three different occasions.

RESULTS AND DISCUSSION

The dialysate is produced by mixing concentrated electrolytic solutions or powdered salts with appropriately pre-treated water. Ideally, the dialysate composition should match the electrolyte composition to that of the plasma of a healthy individual (HOENICH & RONCO, 2007). Chemical and microbial contamination of dialysate has been recognized as predisposing factor to clinical complications during chronic treatment by hemodialysis (Brunet & Berland, 2000).

In this study, the pathogenic potential of one yeast species isolated from dialysate was investigated. The isolate was inoculated in the caudal vein of

Swiss mice and high mortality rate of the animals (3/4, 75%) was observed after five days post-infection. The yeast was recovered from *in vitro* culture conditions from liver and spleen homogenates of the death animals. All assays were carried with both isolates and are showed in Table 1.

Table 1 – Putative virulence factors of *Candida famata* isolates tested *in vitro*

isolate	identification	protease ^a	phospholipase _a	hemolysin ^b	biofilm ^c	B
isolate	<i>C. famata</i>	.27± 0.14			3.7 ± 3,25	4
animal	<i>C. famata</i>	.28 ± 0.09			2.0 ± 2,99	5

^a. Enzyme activity was assayed on agar plates containing 0.6% skim milk and 4.0% egg yolk as protease and phospholipase substrate, respectively. Pz = 1, negative; $0.64 \leq Pz < 1$, low; $0.30 \leq Pz < 0.64$, intermediate; $Pz < 0.30$, highly positive. The Pz index was determined by calculating the ratio between colony diameter and colony diameter plus hydrolysis halo (Price *et al.*, 1992).

^b. The hemolytic activity was assayed on SDA medium supplemented with 3% glucose and 5% fresh sheep blood. +, positive and -, negative for hemolytic activity.

^c. Determination of biofilm production was performed in polystyrene microtiter plates. The %Tbloc (percentage transmittance blocked) was determined by calculating the %Tbloc of the test minus %Tbloc of the blank. %T bloc < 5, negative; %T bloqueada=5-20, + (weakly); %T bloc=20-35, ++ (moderately); %T bloc=35-50, +++ (moderately); %T bloc \geq 50, ++++ (strongly biofilm producer).

White colonies on CHROMagar Candida® growth was further identified on basis of their morphological and biochemical properties as *C. famata*. This microorganism (also known as *Debaryomyces hansenii* and *Torulopsis famata*) is saprophyte yeast found in many dairy products (ANDRIGHETTO *et al.*, 2000). It is an opportunistic microorganism that is commensal in the mucous membranes of animals. However, this yeast has been implicated in sporadic and frequently fatal case reports as causing intravenous-catheter-associated candidemia (ST-Germain & Laverdière, 1986), endophthalmitis (RAO *et al.*, 1991), peritonitis (QUINDOS *et al.*, 1994; GUPTA *et al.*, 2006), candidemia in cancer patient (KRCMÉRY & KUNOVÁ, 2000), central nervous system infection (PRINSLOO *et al.*, 2003), acute zonal occult

outer retinopathy [AZOOR (CARRASCO *et al.*, 2005)] and mediastinitis (AHMAD *et al.*, 2005). In addition, different surveys have identified *C. famata* as the yeast responsible for candidemia (COLOMBO *et al.*, 1999; Viscoli *et al.*, 1999; Al-Hedaithy, 2003; Pfaller *et al.*, 2003), candiduria (PASSOS *et al.*, 2005) and oropharyngeal candidiasis in HIV-positive patients (MIGLIORATI *et al.*, 2004).

The susceptibility of the isolate to fluconazole, which is recommended for treatment of candidiasis was investigated. The MIC of fluconazole was 2 µg/ml, then it was classified as susceptible to the antifungal (Table 2).

Table 2– Antimicrobial susceptibility testing of *C. famata* under planktonic (MIC) and sessile (SMIC) growing conditions.

Strain	Fcz ^a	NaOCl ^b	NaOCl ^b
	MIC		SMIC ₅₀
Dialysate	2.0	0	> 512
Animal	2,0	0	> 512

^aValues are in µg/ml. ^bValues are in CFU/ml. Fcz: Fluconazole; NaOCl; Sodium hypochlorite. 0 = no colonies grew.

Recently, Pfaller *et al.* (2007) reported that 80.1% (462 isolates from different countries) of *C. famata* isolates from different human body sites were susceptible to fluconazole. On the other hand, Carrasco *et al.* (2005) reported that the *C. famata* isolated from conjunctival exudates of a patient diagnosed with AZOOR was resistant to fluconazole (MIC = 128 µg/ml).

In relation to 0.05% sodium hypochlorite, which is used monthly to disinfect the water distribution systems in the dialysis unit, planktonic cells of both isolates were susceptible after 10 min exposition (Table 2). These conditions are the same used during the dialysis systems disinfection.

The capacity of biofilm production by both isolates was significantly different (Table 1) and, the sessile cells exhibited an enhanced resistance to sodium hypochlorite, as observed in biofilms from different *Candida* species by others (HAWSER & DOUGLAS, 1995; RAMAGE *et al.*, 2001; KHUN *et al.*, 2002; CAPELLI *et al.*, 2003; MELO *et al.*, 2007; BIZERRA *et al.*, 2007). The *C. famata* isolated from dialysate was classified as intermediate biofilm producer, whereas the animals recovered isolate was classified as strongly biofilm producer on polystyrene surface (Table 1). The potential transfer of microorganisms from dialysate into the blood compartment may represent the starting point for infection and biofilm formation on host surfaces, including hemodialysis catheter. The reduced activity of the antimicrobial agents against sessile cells become biofilm-associated infections difficult to treat, representing a source of reinfections (RAMAGE *et al.*, 2006). For the same reason, the biofilm formation on hydraulic circuits of hemodialysis machine can be a source of fluids contamination (CAPELLI *et al.*, 2003).

No phospholipase activity was detected for both isolates using the egg yolk-agar method. Further studies are warranted to determine the activity of this enzyme in *C. famata* and analyzed the role of it on the virulence of this yeast. Regarding protease activity, both isolates of *C. famata* demonstrated the high enzymatic activity on skim milk. The role of secreted aspartyl proteases (Sap) in the pathogenesis of *C. albicans* has been studied extensively. These enzymes have the potential to degrade a large number of host proteins (KAMINISHI *et al.*, 1995; COLINA *et al.*, 1996). Inhibition of Saps with aspartyl protease inhibitors reduced the cell adherence of *C. albicans*, important in the establishment of infections (BORG-VON ZEPÉLIN *et al.*, 1999) and it prevented the yeast from invading and

causing tissue damage in experimental model infections (DE BERNARDIS *et al.*, 1997; Schaller *et al.*, 2000).

Hemolysins are produced by many different species of microorganisms. There is essentially no free iron in the human host, therefore, microorganisms can use these enzymes to acquire this nutrient from iron-containing compounds, such as hemoglobin. Prominent representatives of this enzyme family are streptococcal β -hemolysins. These enzymes act by forming pores in the cytoplasmic membrane of erythrocytes and a wide range of host cells, contributing to tissue damage during infection (NIZET, 2002). Several *Candida* species can produce one or more types of hemolysins on the surface of blood-enriched agar medium (MANNS *et al.*, 1994; LUO *et al.*, 2001; SAMARANAYAKE *et al.*, 2005), and *C. albicans* can use iron contained in hemoglobin for growth (MANNS *et al.*, 1994). The importance of this effect in the pathogenesis of *Candida* is still unclear, and further studies are needed to investigate the nature of the hemolytic factor and its role as a putative virulence factor. In some bacteria (for example, *Pseudomonas aeruginosa*), hemolysis may result from phospholipase activity (OSTROFF *et al.*, 1990). This is unlikely the case in this study, where both isolates were phospholipase negative whereas they presented an internal zone of beta hemolysis surrounded by an alpha hemolysis zone and was considered positive for hemolytic activity. This result differed from Luo *et al.* (2001) where they tested 3 *C. famata* clinical isolates and all produced an alpha hemolysis on sheep blood.

Although *C. famata* is being recognized as potential emerging pathogens little information is currently available on the pathogenicity of this yeast species. There was no significant difference on the characteristics analyzed in this study, except biofilm formation. However, infections with *Candida* biofilms are especially problematic since *Candida* species adhere avidly to catheter material and antifungal therapy alone is insufficient for cure those infections (SCHINABECK *et al.* 2004)

Further studies are warranted to determine the virulence factors of *C. famata* and the role of biofilm formation in the pathogenicity of this yeast, and such investigations are currently underway in our laboratory

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Pro-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação (PROPPG) of the Universidade Estadual de Londrina (UEL). This work is part of the M.SC dissertation of N.S. Botelho. The authors thank Dr. A. Leyva for English editing of the manuscript.

REFERENCES

- AAMI (2004) Hemodialysis systems. *ANSI/AAMI RDS-1992*. Arlington, VA: Association for the Advancement of Medical Instrumentation.
- Ahmad I, Gupta A, Gould K & Clarke SC (2005) A fatal fungus. *Annals Thor Surg* **80**: 723-724.
- Al-Hedaithy SS (2003) The yeast species causing fungemia at a university hospital in Riyadh, Saudi Arabia, during a 10-year period. *Mycoses* **46**: 293-298.
- Andrighetto C, Psomas E, Tzanetakis N, Suzzi G & Lombardi A (2000) Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. *Lett Appl Microbiol* **30**: 5-9.
- Arvanitidou M, Spaia S, Velegaki A, Pazarloglou M, Kanetidis D, Pangidist P, Askepidis N, Katsinas Ch, Vayonas G & Katsouyannopoulos V (2000) High level of recovery of fungi from water and dialysate in haemodialysis units. *J Hosp Infect* **45**: 225-230.
- Arvanitidou M, Vayona A, Spanakis N & Tsakris A (2003) Occurrence and antimicrobial resistance of Gram-negative bacteria isolated in haemodialysis water and dialysate of renal units: results of a Greek multicentre study. *J Appl Microbiol* **95**: 180-185.
- Bizerra FC, Nakamura CV, Poersch C, Svidzinski TIE, Quesada RMB, Goldenberg S, Krieger MA & Yamada-Ogatta SF (2008) Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS Yeast Res* doi 10.1111/j.1567-1364.2007.00347.x.
- Borges CRM, Lascowski KMS, Filho NR & Pelayo JS (2007) Microbiological quality of water and dialysate in a haemodialysis unit in Ponta Grossa-Pr, Brazil. *J Appl Microbiol* **103**: 1791-1797.
- Borg-von Zepelin M, Meyer I, Thomssen R, Würzner R, Sanglard D, Telenti A & Monod M (1999) HIV-protease inhibitors reduce cell adherence of *Candida albicans*

strains by inhibition of yeast secreted aspartic proteases. *J Invest Dermatol* **113**: 747-751.

Brunet P & Berland Y (2000) Water quality and complications in haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* **15**: 578-580.

Carrasco L, Ramos M, Galisteo R, Pisa D, Fresno M & González ME (2005) Isolation of *Candida famata* from a patient with acute zonal occult outer retinopathy. *J Clin Microbiol* **43**: 635-640.

Colina AR, Aumont F, Deslauriers N, Belhumeur P & De Repentigny L (1996) Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase. *Infect Immun* **64**: 4514-4519.

Colombo AL, Nucci M, Salomão R, Branchini MLM, Richtmann R, Derossi A & Wey SB (1999) High rate of non-albicans candidemia in Brazilian Tertiary Care Hospitals. *Diag Microbiol Infect Dis* **34**: 281-286.

DeBernardis F, Boccanera M, Adriani D, Spreghini E, Santoni G & Cassone A (1997) Protective role of antimannan and anti-aspartyl proteinase antibodies in an experimental model of *Candida albicans* vaginitis in rats. *Infect Immun* **65**: 3399-3405.

Diekema DJ, Messer SA, Brueggemann B (2002) Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. *J Clin Microbiol* **40**: 1298-1302.

Gupta A, Mi H, Wroe C, Jaques B & Talbot D (2006). Fatal *Candida famata* peritonitis complicating sclerosing peritonitis in a peritoneal dialysis patient. *Nephrol Dial Transplant* **21**: 2036-2037.

Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, Lyon GM, Arthington-Skaggs BA, Mirza SA, Phelan M, Morgan J, Lee-Yang W, Ciblak MA, Benjamin LE, Sanza LT, Huie S, Yeo SF, Brandt ME & Warnock DW (2004) Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and *in vitro* susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J Clin Microbiol* **42**: 1519-1527.

Hawser SP & Douglas LJ (1995) Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 2128-2131.

Kaminishi H, Miyaguchi H, Tamaki T, Suenaga N, Hisamatsu M, Mihashi I, Matsumoto H, Maeda H & Hagihara Y (1995) Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase. *Infect Immun* **63**: 984-988.

Kao AS, Brandt ME, Pruitt WR (2002) The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. *Clin Infect Dis* **29**: 1164-1170.

Klein E, Pass T, Harding GB, Wright R, Million C. (1990) Microbial and endotoxin contamination in water and dialysate in central United States. *Artif Organs* **14**: 85-94.

Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK & Ghannoum MA (2002) Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun* 40: 878-888.

Kurtzman C P & Fell J W (1998) *The Yeast. A taxonomic study*, 4^a ed., Amsterdam: Elsevier.

Larone DH (1995) *Medically important fungi. A guide to identification*. Washington, AMS Press.

Litsky BY, Litsky W. (1968) Investigations on decontamination of hospital surfaces by the use of disinfectant-detergents. *Am J Public Health Nations Health*. 3:534-43.

Melo AS, Colombo AL & Arthington-Skaggs BA (2007) Paradoxical growth effect of caspofungin observed on biofilms and planktonic cells of five different *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 3081-3088.

Migliorati CA, Birman EG, Cury AE.(2004) Oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients under treatment with protease inhibitors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 3: 301-10.

National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS (2002) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, P.A.

Nucci M & Colombo AL (2007) Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 58: 77-82.

Oie S, Kamiya A, Yoneda I, Uchiyama K, Tsuchida M, Takai K & Naito K (2003) Microbial contamination of dialysate and its prevention in haemodialysis units. *J Hosp Infect* 54: 115-119.

Ordinance n^o. 82, de 3 de janeiro de 2000. Brasil: Ministério da Saúde.

Passos XS, Sales WS, Maciel PJ, Costa CR, Miranda KC, Lemos JA, Batista MA & Silva MRR (2005) *Cândida* colonization in intensive care units patients` urine. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 10: 925-928.

Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Meis JF, Gould IM, Fu W, Colombo AL, Rodriguez-Noriega E & the Global Antifungal Surveillance Group (2007) Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol* 45: 1735-1745.

Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken RJ, Hollis RJ & Jones RN (2003) *In vitro* activities of voriconazole, posaconazole, and four licensed systemic antifungal agents against *Candida* species infrequently isolated from blood. *J Clin Microbiol* 41: 78-83.

Pontecorvo G, Roper JA, Hemmons LM, McDonald KD, Bufton WFC (1953). The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* **5**: 141-238.

Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Hollis RJ, Messer SA.(1998) International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY Program. The SENTRY Participant Group. *J Clin Microbiol.* **7**:1886-9.

Price MF, Wilkinson IA, Gentry LO (1982) Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Saubouraudia* **20**: 7-14.

Ramage G, Martinez JP & Lópes-Ribot JL (2006) *Candida* biofilm on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res* **6**: 979-986.

Ramage G, VandeWalle K, Wickes BL & Lópes-Ribot JL (2001) Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol* **39**: 3234-3240.

Ruhnke M (2006) Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida albicans* yeasts. *Curr Drug Targets* **7**: 495-504.

Schaller M, Schackert C., Korting HC, Januschke E & Hube B (2000) Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis. *J Invest Dermatol* **114**: 712-717.

Schinabeck MK, Long LA, Hossain MA, Chandra J, Mukherjee PK, Mohamed S, Ghannoum MA. (2004) Rabbit Model of *Candida albicans* Biofilm Infection: Liposomal Amphotericin B Antifungal Lock Therapy. *antimicro. ag. chemothe.* **48** : 1727–1732.

Shin JH, Kee SJ, Shin MG, Kim SH, Shin DH, Lee SK, Suh SP, Ryang DW.(2002) Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J Clin Microbiol.* **4**:1244-8.

Soll DR (2002) *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Tropica* **81**: 101-110.

Souza AV, Moreira CR, Pasternak J, Hirata ML, Saltini DA, Caetano VC, Closak S, Azevedo FM, Severino P, Vandamme P & Magalhães VD (2004) Characterization uncommon *Burkholderia cepacia* complex isolates from an outbreak in a haemodialysis unit. *J Med Microbiol* **53**: 999-1005.

St-Germain G & Laverdiere M (1986) *Torulopsis candida*, a new opportunistic pathogen. *J Clin Microbiol* **24**: 884-885.

Viscoli C, Girmenia C, Marinus A and Invasive Fungal Infection Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (1999) 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). *Clin Infect Dis* **28**: 1071-1079.

Zunino P, Beltrán L, Zunino L, Méndez H, Percovich V, Rocca R & Antonelli B (2002) Microbiological quality of hemodialysis water in a three year multicenter study in Uruguay. *J Nephrol* **15**: 374-379.

ANEXO B

***Candida* species isolated from urban bats of Londrina-Paraná, Brazil and their potential virulence.**

Natália de Souza Botelho, Suelen Balero de Paula, Vanessa Di Raimo, Renata Lumi Kanoshiki, Luciano Aparecido Panagio, Phileo Pinge-Filho, Lucy Megumi Yamauchi, Sueli Fumie Yamada-Ogatta

N.S. Botelho, S.B. Paula, R.L. Kanoshiki, L.A. Panagio, L.M. Yamauchi, S.F. Yamada-Ogatta (corresponding author)

Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, km 380, Londrina, Paraná, Brazil.

Tel: +55-43-3371-4297; fax: +55-43-3371-4788; e-mail: ogatta@uel.br

P. Pinge-Filho

Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

Abstract

The aim of this study was to isolate yeasts from the feces of urban bats inhabiting the city of Londrina, Paraná, Brazil and to determine their potential virulence attributes. Seven (12.3%) of 57 bats screened in this study showed yeasts in their feces. Five species of the genus *Candida* were isolated: *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, and *C. pelliculosa*. No phospholipase activity was detected in the egg-yolk plate assay; however, all isolates demonstrated protease secretion in skim milk agar. Yeasts isolated from bats produced biofilm on the surface of polystyrene plates and all were classified as intermediate biofilm producers. MIC values for fluconazole in the yeasts varied according to the species. Only one isolate (M34 - *C. lusitaniae*) was considered susceptible-dose dependent to fluconazole. The yeasts were injected intravenously into Swiss mice, and at 15 days post-infection, the animals were sacrificed and portions of their kidneys cultured on Sabouraud dextrose-agar medium. All tissues analyzed showed positive cultures of *Candida* spp. This is the first study evaluating the presence of fungi in the feces of bats in an urban region, where the yeast species found were shown to be potentially pathogenic. Since bats are commonly found in cities, these findings indicate the need for continuous surveillance concerning environmental contamination by their excreta.

Keywords: *Candida* spp, yeast, bats, virulence.

INTRODUCTION

Bats are mammals belonging to the order Chiroptera with an extraordinary adaptability to different environments and different feeding habits. The most variable number of species is found in Latin America, and especially in Brazil these organisms represent 1/3 of terrestrial mammals [1]. In the state of Paraná, five families have been identified: Phyllostomidae, Molossidae, Vespertilionidae, Noctilionidae and Emballonuridae [2]. Particularly in the northern region of this state, the most prevalent families are: Phyllostomidae, Vespertilionidae and Molossidae [3].

The association between bats and pathogenic fungi was first reported by Emmons in 1958 [4] after the isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil contaminated with bat guano. This microorganism which causes a pulmonary disease (histoplasmosis) can colonize a bat's intestinal tract contributing to fungal propagation in the environment [5, 6]. The other fungi recovered from bats or their guano are as follows: *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Microscoporum gypseum*, *Sporotrichum* sp., *Trychophyllum* spp., [7],

Paracoccidioides braziliensis [8], *Wangiella dermatitidis* [9], *Candida* spp. [7, 10, 11], *Blastomyces dermatitides* [12], *Trichosporon* spp. [10, 13] and *Malassezia* spp. [14].

Little is known about the bat-fungus association in Brazil. Some studies were carried out in the Amazon Region, where Reiss and Mok [9] first recovered *W. dermatitides* from bats in Manaus. In another study, Mok et al. [10] analyzed organ colonization by fungi in the different species of bats from an extensive area of the northern region of Brazil (the Amazon basin). In that study, the authors recovered a large variety of yeasts, and species of the genus *Candida* were the most frequent isolates. Gandra et al. [14] isolated yeasts of the genus *Malassezia* from the acoustic meatus of the bat *Molossus molossus*, also from the Amazon region.

As mentioned, bats are among the most ecologically diverse of all mammalian orders concerning their variation in body size, morphology, habitat use, roosting and feeding preferences. In view of this, bats can be easily found in urban regions. During the day, the urban bats can rest in domestic places where they hide in roofs, ventilation ducts and chimneys. At night, bats fly about and use trees as shelters. These habits can increase their contact with humans [15]. Altogether, it is important to obtain additional information on the potentially pathogenic yeasts present in their gastrointestinal tract in order to evaluate their role as carriers of pathogens for humans and animals. Therefore, the aim of this study was to isolate yeasts from the feces of urban bats in the city of Londrina, Paraná, Brazil and to determine their potential virulence attributes.

MATERIALS AND METHODS

Sampling procedures and species identification

From July 2006 to March 2008, bats were captured in flight using mist nets, in different regions of Londrina, Paraná, Brazil. Samples of bat feces were obtained by scraping the anus with a sterile cotton swab. Immediately after sampling, each swab was placed in Sabouraud dextrose broth [SDB (Himedia, India)] supplemented with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ chloramphenicol. The tubes were transported to the laboratory, where they were incubated at 32 °C for 3 h. A 100- μl sample was spread on Sabouraud dextrose agar (SDA) supplemented with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of chloramphenicol.

The cultures were incubated at 32 °C for at least 30 days under aerobic conditions. Alternatively, the samples were also cultured on CHROMagar Candida® medium (Probac, Brazil) for differential growth analysis. For each positive sample, colonies were examined microscopically after Gram staining to avoid bacterial contamination, and two colonies of each sample were sub-cultured in SDA for identification. The identity of each yeast isolate was confirmed by standard mycological methods [16], such as germ-tube test, production of chlamydoconidia on cornmeal agar with 0.5 % Tween 80, and sugar assimilation and fermentation. Concomitantly, biochemical tests using the API 32 C kit (BioMérieux, São Paulo, Brazil) were also carried out.

ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY TESTING

Broth microdilution testing for yeast was performed in accordance with the guidelines in Clinical and Laboratory Standards Institute [17]. Quality control *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil) was included in each experiment. Two wells of each plate served as growth and sterility controls. The interpretative criteria for susceptibility to fluconazole were those published in the CLSI [17].

DETERMINATION OF EXTRACELLULAR PROTEINASE AND PHOSPHOLIPASE ACTIVITIES

The isolates were tested for ability to grow and produce a clear/opaque zone of lysis/precipitation in plates containing 0.6% skim milk and 4.0% egg yolk as protease and phospholipase substrate, respectively. For protease activity, the yeast isolates were previously cultured at 37 °C for 18 h in minimal medium (MM) broth [18] supplemented with 0.6% skim milk, pH 4.0, to induce enzyme secretion. Protease activity was determined on the surface of MM agar supplemented with 0.6% skim milk, pH 4.0. To determine phospholipase activity, the cell suspensions were obtained from a 24-h SDB-yeast culture, and the assay was carried out in SDA supplemented with 4% egg yolk, 350 μ M NaCl and 6.5 μ M CaCl₂, pH 4.5. For both assays, cells were counted in a hemocytometer (Neubauer Improved Chamber), and a 10- μ l suspension of 10⁶ yeasts was placed on the surface

of the agar medium. The cultures were incubated at 37 °C for 96 h, after which the diameter of the lysis or precipitation zone around the colony was determined. Enzyme activity was determined by calculating the ratio between colony diameter and colony diameter plus lysis/precipitation zone. The isolates were classified according to Price et al. [19]. The isolates were tested in triplicate, and the experiment was carried out on three different occasions.

BIOFILM PRODUCTION ASSAY

Biofilm production was determined on polystyrene flat-bottom 96-well microtiter plates (Techno Plastic Products, Switzerland) according to Shin et al. [20]. Briefly, the yeast isolate was grown at 37 °C for 24 h in SDB and a 20 μ l SDB-suspension of 6×10^5 yeasts was placed in each well containing 180 μ l SDB. The plates were incubated at 37 °C for 24 h and washed once with sterile distilled water. Approximately 200 μ l of sterile distilled water were added to each well before spectrophotometric readings at 450 nm with a microtiter plate reader (Universal Microplate Reader ELx 800, Bio-Tek Instruments, USA). Experiments were carried out in triplicate on three different occasions. A semi-quantitative measure of biofilm production was calculated according to the blocked percentage transmittance (%Tbloq) as described by these authors.

ANIMALS AND YEAST INFECTION

Male Swiss mice (20-30g) from the breeding colony of the Central Animal House of the Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil, were maintained under standard environmental conditions (22 \pm 1 °C, relative humidity 60 \pm 5%, 12 h light/dark cycle). Commercial rodent diet (Nuvilab-CR1, Nuvital, Campo Mourão, Brazil) and sterilized water were available *ad libitum*. All procedures with the animals were in accordance with the guidelines of the Brazilian Code for Use of Laboratory Animals. The yeasts were grown in SDB medium at 37 °C for 18 h, and 100 μ L SDB containing 1.0×10^8 yeasts were injected into the lateral tail vein

(intravenously, i.v.). Negative controls were inoculated i.v. with 100 μL of SDB. Groups of 4 to 8 mice were used. The animals were observed daily and survival rates were determined for up to 30 days post-infection. Kidneys were removed from the animals after 15 days post-infection. The organs were weighed and divided into two parts. One half was homogenized in sterile phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.2 and aliquots of 100 μL from serial 10-fold dilutions of organ homogenates were added to SDA medium, in duplicate. Plates were incubated at 37 °C, and colonies were counted after 24 h. Results were expressed as numbers of colony-forming units (CFU) \pm standard error per gram of tissue. The other half-organ was fixed in PBS saline containing 10% formalin for 24 h, dehydrated and embedded in paraffin. Tissue sections (5 μm thick) were obtained and stained with hematoxylin and eosin (H&E) and with silver methenamine (Grocott) to detect the fungal structures, using standard protocols.

RESULTS

Capture of bats and identification of yeasts

A total of 57 bats belonging to 5 genera and 6 classified species were captured and analyzed. Yeasts were recovered from 7 bats (12.3%) of the family Phyllostomidae (Table 1).

Table 1 – Captured bats divided into species and number of yeasts positive samples.

Family	Species	n° captured bats	n° culture positive
Phyllostomidae	<i>Sturnira lillium</i>	18	3
	<i>Artibeus fimbriatus</i>	17	1
	<i>Artibeus lituratus</i>	15	3
	<i>Carollia perspicillata</i>	2	0
Vespertilionidae	<i>Myotis nigricans</i>	1	0
Molossidae	<i>Molossus molossus</i>	4	0
Total		57	7

Five species of *Candida* were isolated and all were negative for the germ-tube and production of chlamydoconidia assays. Species identification, based on biochemical patterns, is shown in Table 2.

Table 2 – Species identification and putative virulence attributes of yeasts isolated from bats

isolate	host	B identification	I rotease ^a	phospholipase _a	biofilm ^b
8	<i>urnira lillium</i>	<i>St. parapsilosis</i>	.33 ± 0.032		2.8 ± 3.15
12	<i>urnira lillium</i>	<i>St. krusei</i>	.38 ± 0.014		7.9 ± 3.03
13	<i>urnira lillium</i>	<i>St. parapsilosis</i>	.29 ± 0.009		6.8 ± 3.51
34	<i>tibeus literatus</i>	<i>Ar. lusitaniae</i>	.29 ± 0.019		9.9 ± 2.90
39	<i>tibeus literatus</i>	<i>Ar. pelliculosa</i>	.35 ± 0.015		8.1 ± 2.98
41	<i>tibeus fimbriatus</i>	<i>Ar. parapsilosis</i>	.20 ± 0.071		1.3 ± 2.21
56	<i>tibeus literatus</i>	<i>Ar. guilliermondii</i>	.34 ± 0.035		3.9 ± 3.33

^a Enzyme activity was assayed on agar plates containing 0.6% skim milk and 4.0% egg yolk as protease and phospholipase substrate, respectively. Dz/Pz = 1, negative; 0.64 ≤ Dz/Pz < 1, low; 0.30 ≤ Dz/Pz < 0.64, intermediate; Dz/Pz < 0.30, highly positive. The Dz/Pz index was determined by calculating the ratio between colony diameter and colony diameter plus hydrolysis halo (Price *et al.*, 1992).

^b Determination of biofilm production was performed in polystyrene microtiter plates. The %Tbloc (percentage transmittance blocked) was determined by calculating the %Tbloc of the test minus %Tbloc of the blank. %T bloc < 5, negative; %T bloc = 5-20, weakly; %T bloc = 20-50, moderately; %T bloc ≥ 50, strongly biofilm producer.

ENZYME ACTIVITIES AND BIOFILM FORMATION

No phospholipase activity in the egg-yolk method was detected for the yeasts analyzed in this study. All isolates demonstrated secretion of protease activity in skim milk. The enzyme activity of *C. parapsilosis* M13 and M41 isolates and *C. lusitaniae* M34 was classified as high and intermediate for the other species. The range of Dz values observed for all species was 0.20 ± 0.071 to 0.38 ± 0.014 (Table 2). The yeasts produced biofilm on the surface of polystyrene plates and all were classified as intermediate biofilm producers. The %Tbloq values ranged from 32.8 ± 3.15 to 49.9 ± 2.90 (Table 2).

FLUCONAZOLE SUSCEPTIBILITY PATTERN

The fluconazole MIC values for the yeasts ranged from 2 to 32 $\mu\text{g/ml}$. *C. lusitaniae* M34 showed a MIC value of 32 $\mu\text{g/ml}$ and was classified as susceptible dose-dependent yeast. The others were classified as fluconazole-susceptible, where two isolates of *C. parapsilosis*, isolates M8 and M13, and *C. pelliculosa* M39 showed a MIC of 2 $\mu\text{g/ml}$. The MIC values of *C. krusei* M12, *C. parapsilosis* M41 and *C. guilliermondii* M56 were 8 $\mu\text{g/ml}$, 8 $\mu\text{g/ml}$ and 4 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

INFECTION OF MICE AND HISTOLOGICAL ANALYSIS

Infection with *C. guilliermondii* M56 and *C. lusitaniae* M34 resulted in a 75% and 50% incidence of mortality after 30 days post-infection, respectively. The survival rates of the animals are shown in Fig 1.

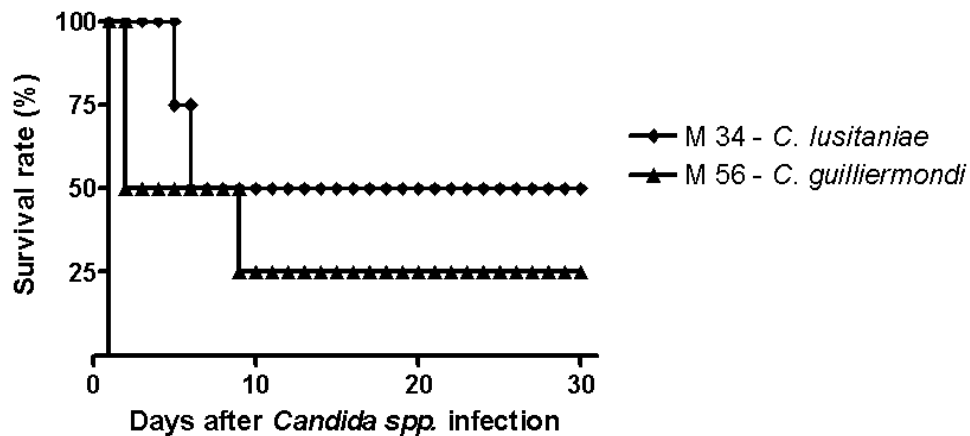


Fig 1

Fig. 1 – Survival rate of mice infected with yeasts isolated from bats. Swiss mice were inoculated intravenously with 1.0×10^8 cells of each isolate. Mortality was evaluated daily and the results are shown as the mean and the data are representative of two independent experiments ($n = 4$ mice).

The animals infected with the other isolates did not die by 30 days post-infection. Evidence of infection was histologically demonstrated in the kidneys infected with *C. guilliermondii* M56 and *C. lusitaniae* M34 (data non-showed). At 15 days after infection, the fungal load was $2.08 \pm 0.11 \times 10^8$ CFU/g and $2.80 \pm 0.13 \times 10^8$ CFU/g of kidney tissue for M56 and M34, respectively.

DISCUSSION

In this study, five *Candida* species were isolated from urban bats of the family Phyllostomidae. Members of this family show the largest trophic diversity of all mammals, where they can be insectivorous, carnivorous, frugivorous, leaf herbivorous, nectivorous, or hematophagous.

The rates for the recovery of fungi from bats vary in different studies. Mok et al. [10] examined a total of 2,886 bats belonging to 43 genera, and 155 (5.4%) of the animals were found to be fungal carriers. Of the fungus-positive bats, *Candida* spp., *Trichosporon* spp., *Torulopsis* spp., *Kluyveromyces* spp. and

Geotrichum sp. were recovered from liver, spleen and lung specimens. Gandra et al. [14] found a high rate of *Malassezia* spp. (80%, 24 bats out of 30 examined) in acoustic meatus of the insectivorous bat *Molossus molossus*.

Species of the genus *Candida* are harmless colonizers of the gastrointestinal and reproductive tracts in healthy individuals. However they are one of the most frequent causative agents of fatal infection in immunocompromised individuals [21, 22, 23]. The species identified are as follows: *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* and *C. pelliculosa*; all have been associated with human infection, such as: candidemia [22, 23], candiduria [21] and oropharyngeal candidiasis in HIV-positive patients [24].

Various traits of *Candida* spp. have been considered as putative factors of virulence and infection development of the host under predisposing conditions [25]. These include adherence to host tissues, yeast-to-hyphal transition (morphogenesis), phenotypic switching, production of hydrolytic enzymes such as proteases, phospholipases and lipases, and biofilm formation [25, 26, 27].

Regarding the hydrolytic enzymes, only protease activity was detected in the isolates in this study. The secreted aspartyl proteases (Sap) are a component of a large family of enzymes that have been associated with the virulence of *C. albicans* [28]. These enzymes can facilitate penetration into the host organism [29, 30] and counteract its defense system [31]. Sap family members have also been demonstrated in *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* [32, 33, 34].

All bat isolates were able to produce biofilm on polystyrene surface. The formation of biofilms by *Candida* spp. has been demonstrated on a number of non-biological surfaces [20, 35, 36]. Most *Candida* spp infections are associated with biofilm formation, that is, on abiotic (medical devices: catheters, prostheses, pacemakers) or biotic surfaces (epithelium). Cells within these communities display a phenotype that is notably different from those of planktonic counterparts. The clinically relevant one is resistance to antimicrobial agents, which makes biofilm-associated infections difficult to treat, representing a source of reinfections [27, 37].

Although all yeasts were recovered from infected animals, only fatal *C. guilliermondii* and *C. pelliculosa* infection in mice were observed in this study, representing the differences in pathogenicity among various *Candida* species involved in human infections. Indeed, Arendrup et al. [38] divided *Candida* species

into three groups according to effect produced in murine infection. The most virulent species were *C. albicans* and *C. tropicalis*, intermediate were *C. glabrata*, *C. lusitaniae* and *C. kefyr*, and the least virulent species were *C. parapsilosis*, *C. krusei* and *C. guilliermondii*.

In conclusion, this is the first study examining the presence of fungi in the feces of bats in an urban region. The yeast species were recovered from the feces of frugivorous bats of the family Phyllostomidae, which is one of the most prevalent in the north of Paraná, and these fungi showed pathogenic potential *in vitro* and *in vivo*. The presence of bats in an urban area implies that the environment can be contaminated with their excreta and that people are exposed daily to these contaminants. More crucially, bat feces can be found in air conditioning systems of health care settings. This scenario implies an increased risk in immunocompromised patients for acquiring potentially fatal fungal infections. Further studies are needed to understand the virulence attributes of these yeasts, and such investigations are currently underway in our laboratory.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Pro-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação (PROPPG) of the Universidade Estadual de Londrina (UEL). This work is part of the M.Sc. dissertation of N.S. Botelho. The authors thank Dr. A. Leyva for English editing of the manuscript.

REFERENCES

- Taddei VA. 1996. *Micronycteris brachyotis* (Chiroptera, Phyllostomidae) from the state of São Paulo, Brazil. Rev Brasil Biol. 1996;56:217-22.
- Miretzki M. (2003). Morcegos do estado do Paraná, Brasil (Mammalia, Chiroptera): riqueza de espécies, distribuição e síntese do conhecimento atual. Papéis Avulsos de Zoologia 2003;43:101-38.

Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP. Mamíferos do Brasil. EDUEL - Londrina, Paraná, Brazil; 2006.

Emmons CW. Association of bats with histoplasmosis. Public Health Rep. 1958;73:590-5.

Hoff GL, Bigler WJ. The role of bats in the propagation and spread of histoplasmosis: a review. J Wildl Dis. 1981;17:191-6.

Taylor ML, Chávez-Tapia CB, Vargas-Yañez R, Rodríguez-Arellanes G, Peña-Sandoval GR, Toriello C, Pérez A, Reyes-Montes MR. Environmental conditions favoring bat infection with *Histoplasma capsulatum* in Mexican shelters. Am J Trop Med Hyg. 1999;61:914-9.

Kajihiro ES. 1965. Occurrence of dermatophytes in fresh bat guano. Appl Microbiol. 1965;13:720-4.

Greer DL, Bolaños B. Role of bats in the ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: the survival of *Paracoccidioides brasiliensis* in the intestinal tract of frugivorous bat, *Artibeus lituratus*. Med Mycol. 1977;15:273-82. doi: 10.1080/00362177785380101.

Reiss NR, Mok WY. *Wangiella dermatitidis* isolated from bats in Manaus Brazil. Med Mycol. 1979;17:213-8. doi: 10.1080/00362177985380321.

Mok WY, Luizão RCC, Barreto da Silva Mdo S. Isolation of fungi from bats of the Amazon Basin. Appl Environ Microbiol. 1982;44:570-5.

Oyeka CA. 1994: Isolation of *Candida* species from bats in Nigeria. Mycoses 1994;37:353-5.

Randhawa HS, Chaturvedi VP, Kini S, Khan ZU. *Blastomyces dermatitidis* in bats: first report of its isolation from the liver of *Rhinopoma hardwickei hardwickei* Gray. Med Mycol. 1985;23:69-76. doi: 10.1080/00362178585380111.

Sugita T, Kikuchi K, Makimura K, Urata K, Someya T, Kamei K, Niimi M, Uehara Y. *Trichosporon* species isolated from guano samples obtained from bat-inhabited caves in Japan. Appl Environ Microbiol. 2005;71:7626-9. doi: 10.1128/AEM.71.11.7626-7629.2005.

Gandra RF, Gambale W, de Cássia Garcia Simão R, da Silva Ruiz L, Durigon EL, de Camargo LM, Giudice MC, Sanfilippo LF, de Araújo J, Paula CR. *Malassezia* spp. in acoustic meatus of bats (*Molossus molossus*) of the Amazon Region, Brazil. Mycopathologia 2008;165:21-6. doi: 10.1007/s11046-007-9079-7.

Brettd AI, Araújo FAA, Caetano-Junior J, Rodrigues MGR, Yoshizawa M, Silva MMS, Harmani NMS, Massunaga PNT, Burer SP, Potro VAR, Uieda W. Morcegos em áreas urbanas e rurais: Manual de manejo e controle – Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde; 1994.

Kurtzman CP, Fell JW. The Yeasts. A taxonomic study, 4th ed., Elsevier, New York; 1998.

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2. *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, Villanova, PA, USA; 2002.

Pontecorvo G, Roper JA, Forbes E. 1953. Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. *J Gen Microbiol*. 1953;8:198-210.

Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 1982;20:7-14.

Shin JH, Kee SJ, Shin MG, Kim SH, Shin DH, Lee SK, Suh SP, Ryang DW. 2002: Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J Clin Microbiol*. 2002;40:1244-8. doi: 10.1128/JCM.40.4.1244-1248.2002.

Kauffman CA, Vazquez JA, Sobel JD, Gallis HA, McKinsey DS, Karchmer AW, Sugar AM, Sharkey PK, Wise GJ, Mangi R, Mosher A, Lee JY, Dismukes WE and National Institute for Allergy and Infectious Diseases (NIAID) Mycoses Study Group. Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. *Clin Infect Dis*. 2000;30:14-8. doi: 10.1086/313583.

Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, Warnock D, Morgan J, Brazilian Network Candidemia Study. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol*. 2006;44:2816-23. doi: 10.1128/JCM.00773-06.

Colombo AL, Guimarães T, Silva LR, de Almeida Monfardini LP, Cunha AK, Rady P, Alves T, Rosas RC. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2007;28:570-6. doi: 10.1086/513615.

Costa CR, de Lemos JA, Passos XS, de Araújo CR, Cohen AJ, Souza LKH, Silva MdoR. Species distribution and antifungal susceptibility profile of oral *Candida* isolates from HIV-infected patients in the antiretroviral therapy era. *Mycopathologia* 2006;162:45-50. doi: 10.1007/s11046-006-0032-y.

Brown AJ, Odds FC, Gow NA. Infection-related gene expression in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*. 2007;10:307-13. doi: 10.1016/j.mib.2007.04.001.

Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2001;9:327-35. doi: 10.1016/S0966-842X(01)02094-7.

Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*. 2003;11:30-6. doi: 10.1016/S0966-842X(02)00002-1.

Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003;67:400-28.

Schaller M, Schackert C, Korting HC, Januschke E, Hube B. 2000. Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis. *J Invest Dermatol*. 2000;114:712-17. doi: 10.1046/j.1523-1747.2000.00935.x.

- Villar CC, Kashleva H, Nobile CJ, Mitchell AP, Dongari-Bagtzoglou A. 2007. Mucosal tissue invasion by *Candida albicans* is associated with E-cadherin degradation, mediated by transcription factor Rim101p and protease Sap5p. *Infect Immun.* 2007;75: 2126-35. doi: 10.1128/IAI.00054-07.
- Kaminishi H, Miyaguchi H, Tamaki T, Suenaga N, Hisamatsu M, Mihashi I, Matsumoto H, Maeda H, Hagihara Y. Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase. *Infect Immun.* 1995;63:984-8.
- Pichová I, Pavlícková L, Dostál J, Dolejší E, Hrusková-Heidingsfeldová O, Weber J, Ruml T, Soucek M. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. *Eur J Biochem.* 2001;268:2669-77. doi: 10.1046/j.1432-1327.2001.02152.x.
- Zaugg C, Borg-Von Zepelin M, Reichard U, Sanglard D, Monod M. Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. *Infect Immun.* 2001;69:405-12. doi: 10.1128/IAI.69.1.405-412.2001.
- Parra-Ortega B, Cruz-Torres H, Villa-Tanaca L, Hernández-Rodríguez C. 2009. Phylogeny and evolution of the aspartyl protease family from clinically relevant *Candida* species. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104:505-12. doi: 10.1590/S0074-02762009000300018.
- Hawser SP, Douglas LJ. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. *Infect Immun.* 1994;62:915-21.
- Bizerra FC, Nakamura CV, Poersch C, Svidzinski TIE, Quesada RMB, Goldenberg S, Krieger MA, Yamada-Ogatta SF. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS Yeast Res.* 2008;8:442-50. doi: 10.1111/j.1567-1364.2007.00347.x.
- Ramage G, Martínez JP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res.* 2006;6:979-86. doi: 10.1111/j.1567-1364.2006.00117.x.
- Arendrup M, Horn T, Frimodt-Møller N. *In vivo* pathogenicity of eight medically relevant *Candida* species in an animal model. *Infection* 2002;30:286-91. doi: 10.1007/s15010-002-2131-0.