



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JULIANA FRASNELLI ROTA

**FREQUÊNCIA DE ESPÉCIES DE *Candida* NO HOSPITAL
UNIVERSITARIO DE LONDRINA**

Londrina
2009

JULIANA FRASNELLI ROTA

**FREQUÊNCIA DE ESPÉCIES DE *Candida* NO HOSPITAL
UNIVERSITARIO DE LONDRINA**

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: Profa. Dra Márcia Cristina Furlaneto

Londrina
2009

JULIANA FRASNELLI ROTA

**FREQUÊNCIA DE ESPÉCIES DE *Candida* NO HOSPITAL
UNIVERSITARIO DE LONDRINA**

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

Márcia Cristina Furlaneto [Orientador]

Márcia Edilaine Lopes Consolaro

Luciana Furlaneto - Maia

Londrina, 16 de fevereiro de 2009.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética de Biologia Molecular de Fungos situado no Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, PR. Os recursos financeiros deste projeto são provenientes da Fundação Araucária, CNPq e PROPPG/UEL.



Dedico:

*À minha mãe Rita, por todo exemplo de superação,
paciência, dedicação amor e cuidado...
Ao meu Pai Mário por todo amor e por ter possibilitado
que mais essa conquista fosse possível sem medir esforços...
Ao meu amor maior meu irmão Murilo
pelo companheirismo respeito e carinho....
À minha família por serem minha eterna melhor parte de mim...*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela minha vida, pela constante presença e proteção, e a Nossa Senhora minha mãezinha do céu por ter me concedido tantas bênçãos ao longo de mais uma etapa.

Agradeço a minha orientadora a Profa. Dra. Márcia Cristina Furlaneto, por primeiramente ter acreditado em mim, agradeço também por todo o conhecimento transmitido, por todo estímulo, convivência e principalmente por toda paciência, obrigada Márcia por ter me permitido conhecer uma profissional como você.

À Profa. Ms. Regina Mariuza Borsato Quesada ao aluno Renne Rodrigues e todo grupo pela dedicação, solicitude e parceria que juntamente ao Hospital Universitário de Londrina tornaram possível a realização deste estudo.

À Profa. Dra. Luciana Furlaneto-Maia por todo o exemplo de profissionalismo e por todas as contribuições feitas para que assim eu pudesse me tornar melhor.

Às professoras Dra. Maria Angélica E. Watanabe e Dra. Maria Helena P. Fúngaro pela disponibilidade de equipamentos e materiais de seus laboratórios.

À querida Jussevania, por toda ajuda no laboratório proporcionando melhores e fundamentais condições de trabalho.

Aos meus amigos de laboratório: Marcelo Tempesta, Daniel Fávero, Ana Flávia, Manu, Henrique e Vivi, por terem me acolhido de forma especial, por todos os ensinamentos a que vocês sem exceção me proporcionaram não só profissionalmente mais de vida, e também por terem compartilhado comigo idéias, valores e sonhos.

Aos meus amigos dos laboratórios vizinhos: Dani, Lara, Carla, Ligia, Roberta, Julie, Thiago, Mateus (mesmo sendo corinthiano), Karem, Marla, Ju Laino e Paty, por toda disponibilidade, ajuda, conversas, risadas e principalmente muito obrigada pelo exemplo que cada um a sua maneira contribuiu para o meu crescimento profissional e também como ser humano.

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, do departamento de Micro da UEL, pela oportunidade e pela qualidade de formação que me foi oferecida.

A CAPES, CNPq, Fundação Araucária e PROPPG/UEL pelo apoio financeiro, imprescindível para a realização deste trabalho.

Á minha tia Patrícia por ter me acolhido e por ter sido em muitos momentos uma mãe para mim, agradeço também as minhas primas Rafaela, Daniella e meu tio Adirlei por serem um pedacinho da minha família em Londrina.

Á família Giordani e agregados por todo carinho e atenção de longa data e obrigada por serem um exemplo de família para mim.

Aos amigos que fiz em Londrina que a todo o momento me faziam perceber o cuidado de Deus na minha vida, e em especial á minha amiga Renata por ter sido meu espelho de fé e amor nesses dois anos.

Aos meus amigos que mesmo longe estiveram sempre presentes torcendo por mim e me ajudando.

Aos meus queridíssimos avós: Ruth, Celina e Dirço, por todo imenso amor e dedicação, e que muito contribuíram para que eu chegasse até aqui, obrigada do fundo do coração.

Aos meus pais e meu irmão por todo amor, paciência e apoio.

Por fim, agradeço àqueles que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho e para o meu crescimento como profissional e ser humano.

Muito Obrigada!!

ROTA, Juliana F. **Frequência de espécies de *Candida* no Hospital Universitario de Londrina.** 2009. 97f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RESUMO

Leveduras do gênero *Candida* são as principais causas de infecções fúngicas nosocomiais em pacientes imunocomprometidos. Os objetivos deste trabalho foram identificar, através de técnicas moleculares, amostras clínicas de *Candida* spp obtidas de pacientes do HU, bem como analisar o perfil de susceptibilidade *in vitro* à antifúngicos e os fatores de risco associados episódios de candidemia. Foram isoladas 270 amostras clínicas de *Candida* spp de pacientes atendidos no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2007. A origem das amostras foi: urina (n=156), sangue (n=40), mucosas (n=54) e lesão superficial (unha e pele) (n=20). O emprego da técnica de PCR permitiu a identificação de cinco espécies: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. A frequência de isolamento das diferentes espécies variou de acordo com o local da infecção, sendo a maior frequência de *C. albicans* em amostras de urina (71,3%). Das espécies não-*albicans*, *C. tropicalis* foi predominante em amostras de urina (65,5%) seguida de sangue (15,5%); *C. parapsilosis* ocorreu predominantemente em amostras de mucosas (53%); *C. glabrata* ocorreu predominantemente em amostras de urina (86,4%) e *C. krusei* foi observada somente em amostras de sangue (50%) e urina (50%). Estas leveduras tiveram predominância de isolamento em pacientes do sexo masculino (40%) e em neonatos (35%). Vários fatores de risco parecem estar relacionados aos episódios de candidemia, destacando-se o uso prévio de antibiótico (100%) e o uso cateter venoso (87,5%). Podemos ainda destacar fatores como entubação orotraqueal (70%), nutrição parenteral (75%) e presença de cateter urinário (57,5%). Testes de fungigrama revelaram variação quanto à susceptibilidade aos antifúngicos empregados. A maioria das amostras de *C. albicans* foi susceptível aos antifúngicos testados. O mesmo foi observado para amostras de *C. tropicalis*, embora, 23% das amostras foram resistentes ao itraconazol e 7,7% foram resistentes a anfotericina B e ao cetoconazol. O maior nível de resistência foi observado para *C. krusei*. Neste estudo foi também realizada a genotipagem empregando a metodologia de RAPD. O dendrograma de similaridade genética gerou três agrupamentos, um correspondente a cada espécie, com valores de coeficientes de similaridade (S_{BA}) de 85%, 42% e 33% para *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. albicans*, respectivamente. 80% dos isolados do agrupamento de *C. parapsilosis* (44,4% SDD e 11,1% R ao itraconazol) estão reunidos em um único agrupamento com aproximadamente 93% de similaridade genética (isolados altamente semelhantes). 67% dos isolados do agrupamento de *C. tropicalis* (31% 23% R e 8% SDD ao itraconazol) estão reunidos em um agrupamento com aproximadamente 78% de similaridade genética. Por fim, 81% dos isolados do agrupamento de *C. albicans* (60% SDD ao itraconazol) estão reunidas em um único agrupamento.

Palavras-chaves: *Candida* spp. PCR. Candidemia. Fungigrama. RAPD.

ROTA, Juliana F. **Frequência de espécies de *Candida* no Hospital Universitario de Londrina.** 2009. 97f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

Yeasts that belong to the genus *Candida* are the main causative agents of nosocomial fungal infections in immunocompromised patients. In this study, the objectives were to identify, by molecular means, clinical samples of *Candida* spp isolated from patients attended in the HU, to examine the in vitro susceptibility to antifungal drugs and to examine the risk factors associated to candidemia episodes. A total of 270 clinical samples were obtained from January 2004 to December 2007. The source of the samples were: urine (n=156), blood (n=40), mucosa (n=54) and superficial lesions (nail and skin)(n=20). The employment of PCR allowed the identification of five species: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. The isolation frequencies of *Candida* spp varied according to the body sites of infection. *C. albicans* was more frequent in urine (71.3%). Among non-*albicans* species, *C. tropicalis* was predominant in urine (65.5%); *C. parapsilosis* predominates in mucosa; *C. glabrata* occurred at high rates in urine (86.4%). *C. krusei* was equally obtained from blood (50%) and urine (50%). The predominance of these yeasts was in male (40%) and neonates (35%) patients. Many risk factors seem to be associated to candidemia, particularly the use of antibiotics (100%), placement of venous catheter (87.5%), mechanical ventilation (70%), parenteral nutrition (75%) and urinary catheter (57.5%). Antifungal susceptibility test revealed variation in susceptibility among strains. The majority of *C. albicans* strains were susceptible to all antifungal tested. High rate of susceptibility was also observed in *C. tropicalis* strains, although it was observe resistance to itraconazol (23%) and amphotericin B (7.7%). The highest level of resistance was observed in *C. krusei* strains. Genomic profiles was obtained by the employment of RAPD. The dendrogram generated three groups corresponding to the species analyzed. Similarity coefficients (S_{BA}) were 85%, 42% e 33% for *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* and *C. albicans*, respectively. Some 80% of the isolates belong to *C. parapsilosis* group (44.4% SDD and 11.1% R to itraconazol) are clustered in a group with 93% genetic similarity (highly similar strains). Some 67% of the isolates belong to *C. tropicalis* group (31% R and 8% SDD to itraconazol) are clustered in a group with 78% genetic similarity. Finally, 82% of the isolates belong to *C. albicans* group (60% SDD to itraconazol) are clustered in one group.

Keywords: *Candida* spp. PCR. Candidemia. Antifungal susceptibility testing. RAPD.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Coloração de colônias de espécies de <i>Candida</i> após crescimento em CHROMagar® <i>Candida</i> em função do tempo de incubação	17
Tabela 2 – Distribuição global de <i>Candida</i> spp. associada a fungemias.....	25
Tabela 3 – Características de 712 episódios de candidemia em onze hospitais brasileiro	27

PARTE I

Tabela 1 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na identificação de <i>Candida</i> spp	53
Tabela 2 – Número de amostras obtidas de pacientes do Hospital Universitário de Londrina (HU) nos diferentes sítios anatômicos e distribuição das espécies de <i>Candida</i> spp em relação ao sítio anatômico de isolamento.....	58
Tabela 3 – Características relacionadas aos pacientes com candidíases em relação aos diferentes sítios anatômicos de isolamento.....	61

PARTE II

Tabela 1 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na identificação de <i>Candida</i> spp	74
Tabela 2 – Características dos pacientes com candidemia (n=40)	79
Tabela 3 – Distribuição das espécies nos episódios de candidemia (n=40)	82
Tabela 4 – Fatores de risco correlacionados com a ocorrência de candidemia	85
Tabela 5 – Susceptibilidade <i>in vitro</i> de 40 amostras isoladas de sangue.....	87

LISTA DE FIGURAS

PARTE

- Figura 1** – Teste dos oligonucleotídeos. M – Marcador 1Kb, 1- *C. albicans* DNA, 2 - *C. albicans* colônia, 3 - *C. tropicalis* DNA, 4 - *C. tropicalis* colônia, 5 - *C. glabrata* DNA, 6 - *C. glabrata* colônia, 7 - *C. parapsilosis* DNA, 8 - *C. parapsilosis* colônia, 9 - *C. krusei* DNA, 10 - *C. krusei* colônia56

PARTE II

- Figura 1** – Padrão de RAPD obtido com o emprego do oligonucleotídeo OPE6. Linha 1 marcador 1 Kb.Linhas 2-10 *C. parapsilosis*, linhas 11-23 *C. tropicalis*, 24-33 *C. albicans*.....89
- Figura 2** – Dendrograma de similaridade genética das amostras de *Candida* spp. Valores de 0 a 1 na barra inferior representam a similaridade genética (valores em porcentagens). R = resistência; SDD = suscetibilidade dose dependente.....89

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 GÊNERO <i>CÂNDIDA</i>	13
2.2 IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE <i>CÂNDIDA</i>	15
2.3. INFECÇÕES CAUSADAS POR <i>CÂNDIDA</i>	20
2.3.1 <i>Candida</i> e infecções no ambiente hospitalar.....	22
2.4 EPIDEMIOLOGIA	23
2.5 FATORES DE RISCO.....	26
2.6 SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
PARTE I: INCIDÊNCIA DE ESPÉCIES DE <i>CANDIDA</i> SPP. NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE LONDRINA (HU): IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E DISTRIBUIÇÃO EM RELAÇÃO AO SÍTIO DE ISOLAMENTO	49
PARTE II: DISTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DE <i>CANDIDA</i> SPP. ISOLADAS DE SANGUE DE PACIENTES DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE LONDRINA	70
3 CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

1 INTRODUÇÃO

O Hospital Universitário (HU) é um órgão suplementar da Universidade Estadual de Londrina, que iniciou seu funcionamento em 1971, sendo um hospital público de grande porte na região norte do estado do Paraná, onde é centro de referência regional para o Sistema Único de Saúde (SUS), tendo sua área de influência também em outros estados.

Mesmo com a crescente importância que as infecções causadas por leveduras do gênero *Candida* vem assumindo no Brasil e no mundo, até o momento nenhum estudo havia sido conduzido com referência à avaliação da incidência de *Candida* no HU. A emergência destes organismos como patógenos significativos tem importantes implicações no interior dos hospitais, pois geram altos índices de morbidade, longos períodos de permanência em hospitais, dificuldade e alto custo do tratamento, assim como altas taxas de mortalidade (ALMIRANTE et al., 2005; COLOMBO et al., 2006).

Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo principal o estudo da incidência de espécies de *Candida* ssp., obtidas de sítios anatômicos distintos, de pacientes internados no HU no período de julho de 2004 a julho de 2007. Os isolados foram identificados pelo emprego da metodologia de PCR, utilizando oligonucleotídeos espécie-específicos. As amostras provenientes de episódios de candidemia foram avaliadas quanto à susceptibilidade aos antifúngicos mais comumente utilizados na prática clínica. Doenças subjacentes e fatores de risco associados aos pacientes foram também avaliados.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 GÊNERO *CANDIDA*

O gênero *Candida* é constituído de aproximadamente 200 espécies encontradas em diversos nichos corporais, como orofaringe, cavidade bucal, pele, secreções brônquicas e vagina, coloniza indivíduos saudáveis em estado comensal (TAVANTI et al., 2004; BONASSOLI et al., 2005; SHINOBU et al., 2007; FURLANETO-MAIA et al., 2008), estando assim em equilíbrio com a microbiota normal e o sistema imune do hospedeiro. Dentre as espécies do gênero, *Candida albicans* ocorre amplamente distribuída na natureza, ocupando diversos habitats, sendo que as demais espécies apresentam distribuição mais limitada (KREGEN-VAN RIJ, 1984; SAMARANAYKE et al., 2001; KOGA-ITO et al., 2006).

Contudo, determinados fatores predisponentes que levam a alterações do estado fisiológico ou imune do hospedeiro, podem favorecer a mudança do estado comensal destas leveduras para um estado de patogenia, tornando-as capazes de causar um amplo espectro de infecções. Estes quadros que variam desde lesões superficiais até infecções disseminadas em pacientes imunocomprometidos, neutropênicos e diabéticos, além daqueles submetidos a determinadas condições, a exemplo de antibiótico-terapia, cirurgias abdominais, uso de cateter e hemodiálise (CARVALHO et al., 2003; PINTO, 2003; KOJIC et al., 2004; ALMIRANTE et al., 2005; CHENG et al., 2005; AQUINO et al., 2005;). Espécies de *Candida* são responsáveis pela maioria das infecções fúngicas em indivíduos hospitalizados (WROBLEWSKA et al., 2002) e estão relacionadas a elevadas taxas de mortalidade (NAGLIK et al., 2003; BOO et al., 2005; CHENG et al., 2005;).

Embora ainda seja relatada a maior prevalência de *C. albicans* nos casos de infecções por leveduras deste gênero, a proporção de diagnósticos de infecções ocasionadas por espécies não-*albicans* tem aumentado, com destaque para as espécies *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei* (REX; PFALLER, 2002; PFALLER; DIEKEMA, 2004; SPELLBERG et al., 2006).

Espécies pertencentes ao gênero *Candida* apresentam características macromorfológicas e micromorfológicas distintas, sendo estas, uma das bases dos métodos clássicos de identificação. Macroscopicamente em meio de cultura solidificado, *C. albicans* apresenta colônias úmidas, cremosas, de aspecto liso ou rugoso e coloração branco-amarelada, *C. tropicalis* apresenta colônias de tonalidade creme, sendo lisas e opacas, com bordas micelianas após incubação prolongada, *C. parapsilosis* colônias de tonalidade creme, podendo variar de elevadas a umbonadas, de opacas a brilhantes e lisas ou sulcadas, já *C. glabrata*, apresenta colônias de tonalidade creme, sendo lisas e opacas e as células leveduriformes geralmente são ovais, isoladas ou com brotamentos e *C. krusei* apresenta colônias de tonalidade creme, lisas, opacas, com aspecto vítreo (KREGEN-VAN RIJ, 1984, SOUZA, 1990).

Microscopicamente em ágar fubá, *C. albicans* pode formar pseudomicélios, micélios verdadeiros e clamidósporos, *C. tropicalis* evidencia micélio e pseudomicélios extensos, com parede celular delgada e hialina e nas constrições das pseudo-hifas são encontrados blastoconídios de formato globoso a oval, de parede celular delgada, isolados em cadeias curtas e em aglomerados, em *C. parapsilosis* ocorre formação de pseudomicélio reto constituído de células alongadas onde ramificações regulares conferem ao pseudomicélio aspecto de pinhos da floresta, com blastoconídios esféricos ou ovais formados nas constrições das pseudo-hifas, *C. krusei* revela cadeias de células alongadas (pseudo-hifas) ramificadas com blastoconídios globosos a ovais com parede celular delgada são produzidas isoladamente, aos pares ou agrupados, nas constrições das pseudo-hifas. Em ágar fubá acrescido de Tween 80 em *C. glabrata* observa-se células ou blastoconídios ovais, com ou sem brotamento não apresentando diferenciação em pseudomicélio (KREGEN-VAN RIJ, 1984, SOUZA, 1990).

Em estado de patogenia, *C. albicans* e espécies não-*albicans* expressam uma série de fatores de virulência e estratégias específicas que possibilitam sobrepujar as defesas do hospedeiro, colonizar e causar infecções (CALDERONE; FONZI, 2001). Tais fatores de virulência são determinados geneticamente e seletivamente expressos de acordo com o tipo, estágio e sítio anatômico da infecção, com a resposta natural do organismo, assim como os fatores de predisposição do indivíduo. O estado fisiológico do hospedeiro é o primeiro fator que influencia a etiologia de infecções causadas por espécies do gênero *Candida*,

contribuindo para o desencadeamento de um extenso repertório de fatores de virulência (CUTLER, 1991; STAIB et al., 2000; HAYNES, 2001; 2001; FELK et al., 2002; KANTARCIOGLU; YÜCEL, 2002; NAGLIK et al., 2003; FOTEDAR; AL-HEDAITHY, 2003; ARSENIJEVIC et al., 2004).

2.2 IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *CANDIDA*

A elevada mortalidade e morbiletalidade das infecções causadas por algumas espécies e as diferenças na susceptibilidade às drogas entre as espécies de *Candida* spp., faz com que os estudos de identificação e origem dos isolados em infecções nosocomiais se tornem de grande importância (MELO et al., 1998; ERGON; GÜLAY, 2004).

As técnicas convencionais para a identificação denominada clássica são amplamente utilizadas e permitem a identificação de várias espécies do gênero *Candida* sendo em contrapartida técnicas laboriosas, onde o resultado é dependente da somatória de vários procedimentos. Primeiramente é realizada a análise morfológica, onde se verifica a habilidade em formar tubos germinativos a 37°C em soro, seguida de análise microformológica realizada pelo cultivo em ágar fubá, observando-se a filamentação e a presença de clamidósporos. Em seguida são realizados testes de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio (auxanograma) e de fermentação de carboidratos (zimograma). Em alguns casos, testes bioquímicos adicionais são realizados, como hidrólise da uréia e resistência a ciclohexidina. Desde 1995 nos laboratórios têm sido empregados sistemas automatizados ou manuais de identificação tais como API 20C AUX (BioMériux System), ID 32 C (BioMériux System), Candifast (International Microbiol) e Vitek (WILLIAMS et al., 1995). Por serem baseados em caracteres fenotípicos, todos os testes acima estão sujeitos a variações, e a maioria fornece resultados somente após 48 h (MELO et al., 1998).

Ainda a cerca da identificação de espécies de *Candida*, têm sido desenvolvidos meios de cultura diferenciais que por conter substratos cromogênicos, reagem com enzimas secretadas pelo microrganismo alvo produzindo colônias de diferentes colorações, e assim permitem a diferenciação das espécies. Atualmente,

dois destes meios: Candida ID agar (BioMérieux, Marcy Étoile, France) e CHROMagar® Candida (CHROMagar, Company Ltd., Paris France) tem sido utilizados em laboratórios de micologia para a identificação presuntiva de *Candida* spp. (COOKE et al., 2002). O meio Candida ID agar contém o substrato cromogênico indolil glicosaminidase, que é hidrolisado por *C. albicans* resultando em um produto insolúvel de cor turquesa ou azul. Já *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii* aparecem com coloração rosa, e as demais espécies de *Candida* como colônias de coloração branca. O meio CHROMagar® Candida contém o substrato β -glicosaminidase, que quando hidrolisado por enzimas espécie-específicas, permite a identificação de *C. albicans* (colônias de coloração verde), *C. tropicalis* (colônias de coloração azul metálico) e *C. krusei* (colônias rugosas de coloração rosa) (BAUMGARTNER, FREYDIERE; GILLE, 1996; HOSPENTAHN et al., 2006).

Apesar de amplamente empregada, a identificação presuntiva apresenta algumas limitações como baixa sensibilidade e/ou especificidade (identificam apenas um número limitado de espécies) (LEHMANN; LIN; LASKER, 1992; STEFFAN et al., 1997; ROWEN et al., 1999; AHMAD et al., 2002; BAUTISTA-MUÑOZ et al., 2003). Além disso, podem resultar em identificação errônea dependendo do tempo de cultivo (Tabela 1), dentre outros fatores.

Tabela 1 – Coloração de colônias de espécies de *Candida* após crescimento em CHROMagar® *Candida* em função do tempo de incubação*

Espécies (nº amostras)	Verde	Branco	Branco cremoso	Rosa claro	Rosa	Cinza	Violeta claro	Violeta	Azul claro	Azul metálico	Rosa <i>Dry-flat</i>	Rosa <i>Rat-light</i>
<i>C. albicans</i> (15)												
24h	15**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48h	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i> (17)												
24h	-	-	13	04	-	-	-	-	-	-	-	-
48h	-	-	07	10	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. glabrata</i> (16)												
24h	-	04	-	11	01	-	-	-	-	-	-	-
48h	-	02	01	04	09	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i> (17)												
24h	-	-	01	-	-	-	16	-	-	-	-	-
48h	-	-	-	-	-	-	01	-	-	16	-	-
<i>C. krusei</i> (13)												
24h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	-
48h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	-

* Fonte: PARITPOKEE et al. (2005).

** Corresponde ao número de amostras analisadas.

Mais recentemente, métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm sido utilizados para a detecção rápida e específica de espécies de *Candida* envolvidas em processos infecciosos. Esta metodologia se baseia na amplificação exponencial seletiva de uma quantidade reduzida de DNA inicial (DNA molde). A metodologia de PCR empregando-se oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos tem sido utilizada na identificação molecular de várias espécies de *Candida* de importância médica (GUIVER et al., 2001; NAZZAL et al., 2005; FURLANETO-MAIA et al., 2007; JEWTUCHOWICZ et al., 2008; YONG et al., 2008; LUQUE et al., 2009).

A técnica de PCR também tem sido empregada para a detecção de espécies de *Candida* diretamente a partir de materiais biológicos, a exemplo de sangue (ENGLEBERG; EISENSTEIN, 1992; MAIWALD et al., 1994; SULLIVAN et al., 1996). Moreira-Oliveira et al. (2005) obtiveram 72,1% de sensibilidade na identificação de *C. albicans* em relação aos métodos microbiológicos da hemocultura.

Atualmente existem várias técnicas resultantes de modificações da PCR que têm sido amplamente empregadas no diagnóstico microbiológico, dentre as quais, a nested-PCR, multiplex PCR e PCR em tempo real.

A nested PCR, que é empregada para aumentar a quantidade de produto amplificado final e/ou a sensibilidade, também têm sido muito útil na detecção de espécies de *Candida* diretamente a partir de materiais biológicos (AHMAD et al., 2002; KHLIF et al., 2007).

Já a PCR multiplex é uma reação de amplificação desenhada para detectar múltiplas seqüências-alvo numa mesma amostra. Vários autores têm lançado mão desta metodologia para a detecção de amostras clínicas de *Candida* (LUO E MITHELL, 2002, CARVALHO et al., 2007; LIGUORI et al., 2009), inclusive a partir de materiais biológicos (LI et al., 2003; CARVALHO et al., 2007; LAU et al., 2008). Segundo Li et al. (2003), o emprego desta metodologia permitiu a identificação simultânea de oito espécies diretamente de amostras de sangue.

A metodologia de PCR em tempo real vem ganhando espaço nos diagnósticos clínicos por apresentar a capacidade de gerar dados quantitativos, ou seja, consegue realizar a avaliação do número de moléculas produzidas a cada ciclo, permitindo, portanto, a detecção e quantificação de patógenos simultaneamente. Espécies de *Candida* têm sido detectadas com sucesso pelo

emprego de PCR em tempo real, em materiais biológicos diversos (SELVARANGAN et al., 2003; ARANCIA et al., 2006; SCHABEREITER-GURTNER et al., 2007).

Outra variante da PCR, a metodologia denominada RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), também tem sido utilizada na identificação de espécies bem como na genotipagem entre linhagens de uma mesma espécie ou mesmo entre as diferentes espécies com propósitos epidemiológicos (LEHMANN et al., 1992; MELO et al., 1998; JAIN et al., 2001; BAUTISTA-MUÑOZ et al., 2003; MOREIRA-OLIVEIRA et al., 2005; VALÉRIO et al., 2006; XAVIER et al., 2008). Esta técnica é baseada na amplificação de fragmentos de DNA pelo emprego de oligonucleotídeos iniciadores pequenos (9 a 10 bases) e baixa temperatura de anelamento (36°C). Estes oligonucleotídeos hibridizam aleatoriamente em sítios do genoma, e caso dois destes sítios estejam localizados proximamente (poucos kilobases), então a seqüência interveniente é amplificada e pode ser visualizada em um gel de eletroforese (ROBERT et al., 1995).

Em 1992 a metodologia de RAPD foi aplicada com sucesso na identificação e diferenciação de isolados de *C. albicans* e espécies não *albicans* (*C. lusitaniae*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*) (LEHMANN et al., 1992). Melo et al. (1998) também aplicaram a metodologia de RAPD para a identificação de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Estes autores observaram perfis de RAPD distintos para isolados das diferentes espécies analisadas.

O desenvolvimento de técnicas de genotipagem, como no caso de RAPD, tem permitido a avaliação de relações entre isolados clínicos. Perfis de RAPD são relativamente fáceis e rápidos de se obter, não requerem sondas radioativas e, uma vez que oligonucleotídeos iniciadores de seqüências arbitrárias são utilizados, nenhum conhecimento prévio do DNA a ser analisado é essencial.

A genotipagem por RAPD foi empregada com sucesso na diferenciação de linhagens de *Candida* spp. resistentes a azoles (XU et al., 2000; JAIN et al., 2001; LIAN et al., 2004; CHONG et al., 2007). Xu et al. (2000) observaram uma alta similaridade genética nas amostras resistentes ao fluconazol, ao contrário do foi obtido por Jain et al. (2001), que encontraram similaridade genética para todas as linhagens sensíveis de *C. albicans* ao antifúngico fluconazol.

Além do RAPD, a genotipagem de amostras clínicas de *Candida* também pode ser realizada pelo emprego da metodologia de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorfism*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*).

RFLP é o polimorfismo no comprimento de fragmentos obtidos por corte da fita dupla de DNA, e é evidenciado pela fragmentação do DNA através do uso de enzimas de restrição e observado por hibridização destes fragmentos com sequências homólogas de DNA marcadas com radioatividade ou compostos que desencadeiam uma reação de luminescência (DEAK et al., 2004; FRUTOS et al., 2004) . Para que o polimorfismo seja detectado, é necessário que as sequências de nucleotídeos nas fitas de DNA de dois ou mais indivíduos comparados sejam distintas. Há 25 anos os marcadores RFLP foram estudados pela primeira vez em um experimento destinado à detecção de mutações em DNA de vírus (GRODZICKER et al., 1974) já a análise do polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP), envolve a digestão de DNA com enzima de restrição, conforme requer uma análise de RFLP. Neste caso, porém, o DNA é digerido com dois tipos de endonucleases (corte raro e corte frequente), gerando fragmentos de diferentes tamanhos. Adicionam-se então adaptadores que complementam as sequências do sítio de restrição e oligonucleotídeos complementares aos adaptadores. A reação de polimerase em cadeia nestas condições amplifica segmentos de DNA ao acaso no genoma (ZABEAU e VOS, 1993). Ainda entre outros marcadores moleculares utilizados estão SAMPL (*Selective Amplification of Microsatellite Polimorphic Loci*), microsátélites, microarranjos.

2.3 INFECÇÕES CAUSADAS POR *CANDIDA*

Em 1839, Langenbeck observou pela primeira vez a mais importante levedura patogênica ao homem, hoje conhecida como *C. albicans*, em aftas bucais de um paciente com tifo, mas somente em 1923 o gênero e a espécie foram definitivamente denominados (BIRMAN, 2002). As infecções causadas pelas diferentes espécies de *Candida* variam desde lesões superficiais até infecções invasivas, as quais são frequentemente fatais.

Dentre as lesões superficiais, destacam-se as onicomicoses, caracterizadas por infecções tanto de unhas das mãos quanto dos pés. Nestas infecções, as espécies de *Candida* têm mostrado ao longo dos anos mudança no perfil de isolamento. Daniel et al. (1998) e Brilhante et al. (2005) observaram a

prevalência de *C. albicans* seguida de outras espécies como *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. No entanto, em trabalhos recentes realizados por Furlaneto-Maia et al. (2007) e Martins et al. (2007) foi observado que das amostras provenientes de raspados de unha apenas 11% e 20% respectivamente eram *C. albicans*, sendo o restante distribuído entre espécies não-*albicans*.

As leveduras podem se comportar como patógenos primários invadindo a unha normal, principalmente em pacientes com candidíase mucocutânea crônica e pacientes aidéticos. Já em pacientes imunocomprometidos, freqüentemente são patógenos secundários, invadindo a unha previamente alterada por trauma, hiper-hidratação ou irritação por contato com substâncias químicas (DANIEL et al., 1998).

Quanto às infecções de mucosas, *C. albicans* coloniza preferencialmente às superfícies da mucosa oral, vaginal e gastrointestinal (ELAHI et al., 2001). No entanto, candidíase oral é a infecção fúngica mais comum em humanos, afetando não somente indivíduos cuja saúde está debilitada, mas também pessoas saudáveis. É uma infecção fúngica oportunista freqüente, causada por uma proliferação ou infecção da cavidade bucal por leveduras do gênero *Candida*, observada principalmente na primeira infância, senescência e em pacientes imunocomprometidos (LYNCH; MEMPHIS, 1994; AKPAN; MORGAN, 2002,). Dados indicam que portadores da levedura geralmente apresentam contagem de colônias inferiores a 1.000 UFC/ mL, enquanto indivíduos com a infecção tendem a manifestar os sinais clínicos de infecção e apresentar contagens superiores a 4.000 UFC/mL (FARAH et al., 2000).

Na mucosa vaginal, aproximadamente 75% de mulheres saudáveis já apresentaram pelo menos um episódio sintomático provocado por *Candida* spp. ao longo da vida, e destas, mais de 5% sofrem infecções recorrentes da doença (SAFDAR et al., 2001; DE MEEÛS et al., 2002; VARGAS et al., 2002; DE REPENTIGNY et al., 2004). Dados da literatura relatam que a maioria dos casos de vulvovaginite (80 a 90%) é ocasionada por *C. albicans* e em menor freqüência por espécies de *Candida* não-*albicans* (*C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*) (PAULITSCH et al., 2006). Consolaro et al. (2004) descreveram uma correlação entre as espécies de *Candida* e sintomas em pacientes com candidíase vulvovaginal (CVV) na cidade de Maringá-PR. Segundo este estudo, dentre as culturas positivas para leveduras ocorreu predomínio de *C. albicans*, tanto em

pacientes com CVV quanto em pacientes com CVV recorrente (CVVR). Nesse mesmo conceito, Ferraza et al. (2005) demonstraram a distribuição das leveduras isoladas de secreção vaginal em mulheres sintomáticas e assintomáticas em duas cidades da região Sul, havendo prevalência de *C. albicans* nas duas populações. Apesar da prevalência de *C. albicans* nesse estudo, das 25 mulheres sintomáticas, 16% estavam infectadas por *C. glabrata*, que é uma importante espécie entre as denominadas *Candida* não-*albicans*, que vem emergindo como patógeno.

2.3.1 *Candida* e infecções no ambiente hospitalar

A relevância das infecções por *Candida* em ambiente hospitalar passou a ganhar importância a partir da década de 80, associadas principalmente ao surgimento da SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Humana) e a realização de transplantes e também dos avanços da tecnologia científica médica e do melhor conhecimento dos mecanismos desencadeadores de doenças, propiciando uma sobrevivência maior ao homem. Entre as infecções do gênero *Candida* mais comumente relacionadas ao ambiente hospitalar estão a candidúria e a candidemia.

O termo candidúria refere-se à infecção urinária, mas não necessariamente sintomática. Trata-se de um evento muito freqüente entre pacientes expostos a determinados fatores de risco, sendo que 20 a 50% de pacientes hospitalizados podem apresentar candidúria ao longo de sua internação, particularmente em unidades de terapia intensiva (UTI) (FEBRÉ et al., 1999; SAINT; LIPSKY, 1999, NUCCI, 2000; MERLE et al., 2002). Aproximadamente 80% das infecções nosocomiais do trato urinário estão associadas com o uso de cateteres urinários ou algum outro tipo de dispositivo de drenagem (SALKIN; SAID, 1993; MULHALL et al., 1988). Outros fatores de risco incluem: colonização genital por *Candida*, diabetes mellitus, longo período de internação, câncer, imunossupressão, uso de antibióticos, idade avançada e sexo feminino (SOBEL, 1999; KAUFFMAN et al., 2000; NUCCI, 2000).

Aproximadamente 50% dos pacientes com candidúria são simultaneamente colonizados em outros sítios anatômicos (SELLAMI et al., 2006).

Além disso, candidúria está correlacionada com alta colonização ($\geq 10^4$ UFC/ml de urina) e índice de colonização (CI) $> 0,5$ (revisado por TOYA et al., 2007).

Entre as infecções invasivas causadas por espécies de *Candida*, cabe ressaltar a relevância clínica dos casos de infecção da corrente sanguínea, conhecida como candidemia ou candidíase hematogênica. Este termo engloba um espectro amplo de situações clínicas, incluindo desde episódios isolados até casos onde o fungo dissemina-se para os órgãos do hospedeiro infectado, resultando na formação de microabcessos, lesões cutâneas embólicas, abcessos renais e hepatoesplêncios, endocardite, meningite, artrite, osteomielite e outros (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Nas últimas duas décadas, espécies de *Candida* têm sido a quarta causa mais comum de infecções hematogênicas adquiridas nos hospitais dos Estados Unidos (EDMOND et al., 1999), e a terceira causa mais comum de fungemia nas unidades de terapia intensiva, estando associadas com alta taxa de mortalidade (WISPLINGHOFF et al., 2004).

No Brasil, estudos relacionados a episódios de candidemia ainda são escassos e limitados a algumas regiões (MATSUMOTO et al., 2001; COLOMBO et al., 2003, 2006; ANTUNES et al., 2004; AQUINO et al., 2005; RUIZ et al., 2005; MEDRANO et al., 2006; PASSOS et al., 2007; CHANG et al., 2008). Colombo et al. (2006) descreveram índices de 2,49 casos de candidemia a cada 1000 admissões e 0,37 episódios por dia a cada 1000 pacientes em um estudo feito em 11 hospitais terciários em 09 cidades do Brasil. No geral, a ordem das cinco espécies mais isoladas tem sido *C. albicans* seguido de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*.

2.4 EPIDEMIOLOGIA

O número de indivíduos predispostos a sofrer infecções por espécies do gênero *Candida* tem aumentado significativamente nas últimas décadas, seja pela emergência de doenças que causam diretamente ou indiretamente imunossupressão, ou por outros fatores predisponentes que desencadeiam

desequilíbrios fisiológicos favoráveis à proliferação deste fungo (PFALLER et al., 2005; PFALLER et al., 2006).

Do mesmo modo, o emprego crescente de técnicas invasivas e do uso cada vez mais comum de terapias agressivas utilizadas nas unidades de terapia intensiva, conduziram a um maior número de sobrevida dos indivíduos, mas igualmente contribuíram para um aumento no número de pessoas vulneráveis a ocorrência de infecções fúngicas (RICHARDSON, 2005).

Quando da emergência de candidíases, *C. albicans*, representava índices superiores a 80% do total de isolados, sendo que todas as demais espécies eram designadas como *Candida* não-*albicans* (BANERJEE et al., 1991; BECK-SAGUE et al., 1993; DEBUSK et al., 1994).

Porém, o desenvolvimento de novas metodologias de identificação e diagnóstico microbiológico e a emergência de infecções causadas pelas demais espécies do gênero *Candida*, tem revelado mudança nesse perfil. Diversos estudos apontam uma mudança significativa na epidemiologia das infecções provocadas por *Candida* spp. nas últimas décadas, demonstrando uma maior diversificação de espécies. Aproximadamente metade dos casos relatados de candidemia tem sido relacionada a espécies de *Candida* não-*albicans* (HAYNES, 2001; KCRMERY; BARNES, 2002; CAPOOR et al., 2005; CHENG et al., 2005; HACHEM et al., 2008). Quando consideradas as espécies individualmente, em alguns casos, observa-se igualdade dos índices de isolamento e até mesmo a prevalência de espécies de *Candida* não-*albicans* (SANDVEN et al., 2000; HAZEN et al., 2003; PFALLER et al., 2005; PFALLER et al., 2006; SANDVEN et al., 2006; FURLANETO-MAIA et al., 2007).

Mais de 17 diferentes espécies de *Candida* têm sido relatadas como agente etiológico de infecções em humanos (HAZEN, 1995; PFALLER; DIEKEMA, 2004), sendo que mais de 90% das infecções invasivas são causadas por cinco espécies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (REX; PFALLER, 2002; PFALLER; DIEKEMA, 2004; SPELLBERG et al., 2006).

Em países como os Estados Unidos, Suíça e Reino Unido têm-se observado um aumento notável na frequência de isolamento de *C. glabrata*. Já na América Latina e em demais regiões européias, as espécies *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* têm sido as mais freqüentemente isoladas após *C. albicans* (Tabela 1).

Tabela 2 – Distribuição global de *Candida* spp. associada a fungemias*.

	Nº of Pacientes	<i>Candida</i> <i>albicans</i>	<i>Candida</i> <i>glabrata</i>	<i>Candida</i> <i>parapsilosis</i>	<i>Candida</i> <i>tropicalis</i>	<i>Candida</i> <i>krusei</i>	<i>Candida</i> <i>spp.</i>
EUA/Canadá	71	35 (49%)	13 (18%)	08 (11%)	10 (14%)	01 (1%)	04 (6%)
América Latina	73	27 (37%)	02 (3%)	22 (30%)	18 (25%)	01 (1%)	03 (4%)
Europa/Rússia	51	25 (49%)	04 (08%)	09 (18%)	04 (8%)	03 (6%)	06 (12%)
Ásia/Austrália	15	08 (53%)	04 (27%)	01 (7%)	02 (14%)	00 (0%)	00 (0%)
Total	210	95 (45%)	23 (11%)	40 (19%)	34 (16%)	05 (2%)	13 (6%)

* **Fonte:** Colombo et al. (2003).

Em um estudo realizado por Oliveira et al. (2001), as espécies de *Candida* não-*albicans* foram os principais agentes de candidúria, sendo considerados patógenos emergentes no trato urinário em pacientes gravemente enfermos. Neste estudo, espécies não-*albicans* corresponderam a 64% dos isolados, destacando-se *C. tropicalis* que foi identificada em 53 de 101 isolados. A investigação sobre candidúria em outros 53 pacientes, porém referente ao ano de 1993, mostrou predomínio de *C. albicans* (68%) seguida de *C. tropicalis* (17%). A mudança da espécie predominante em um período de cinco anos reflete uma tendência em ambientes hospitalares (OLIVEIRA et al., 2001).

No Brasil, a maioria dos estudos relativos à candidíases esta concentrada em candidemias que tem se tornado um problema crescente. Um estudo, realizado em seis hospitais terciários dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, envolvendo 145 episódios de candidemia, revelou que as espécies mais freqüentemente isoladas foram *C. albicans* (37%), *C. parapsilosis* (25%), *C. tropicalis* (24%), *C. rugosa* (5%) e *C. glabrata* (4%) (COLOMBO et al., 2003). Outro estudo realizado em hospitais de nove cidades das regiões sul, sudeste e região central do Brasil, envolvendo 712 episódios de candidemia, demonstraram que as espécies mais isoladas foram *C. albicans* 291 (40.9%), *C. tropicalis* 149 (20.9%), *C. parapsilosis* 146 (20.5%), *C. pelliculosa* 44 (6.2%) e *C. glabrata* 35 (4.9%) (COLOMBO et al., 2006).

C. tropicalis apresenta considerável potencial biológico como agente oportunista quando o hospedeiro encontra-se neutropênico, quando há supressão da microbiota bacteriana pelo uso de antimicrobianos ou danos na mucosa. Em estudos de candidemia, *C. tropicalis* têm sido a mais freqüentemente isolada dentre as não-*albicans* em algumas regiões brasileiras (sudeste e sul) (COLOMBO et al., 2003, 2006). Já *C. parapsilosis* é responsável principalmente por candidemias em crianças e recém-nascidos prematuros, chegando a 50% de prevalência (LEVY, 1998).

C. krusei tem-se mostrado como um patógeno hospitalar ocasional, particularmente, em pacientes portadores de doenças hematológicas malignas (IWEN et al., 1995). Fungemia causada por *C. krusei* é extremamente raro em UTI e em pacientes transplantados. Munõz et al. (2005) descreveram 02 casos em pacientes transplantados, 03 episódios em pacientes HIV positivos e 01 episódio de um bebê com diarréia massiva e intolerância a lactose que foi excepcional. Crescimento fúngico tem sido relatado para diarréia, principalmente em crianças e lesões na mucosa intestinal pode ser a origem da fungemia (TALWAR et al., 1990; PONNUVEL et al., 1996).

C. krusei tem sido ainda, detectada nas mãos dos profissionais da saúde (potencial reservatório de transmissão nosocomial), mas isso não evidencia disseminação nosocomial (PFALLER et al., 1998; HOPE et al., 2002). *C. glabrata* surge como um importante patógeno hospitalar, sendo mais prevalente em pacientes idosos (DIEKEMA, et al., 2002).

2.5 FATORES DE RISCO

São múltiplos os fatores de risco associados à candidíases, particularmente nos casos de infecções invasivas, a exemplo das candidemias. Dentre estes, destaca-se a exposição a agentes antimicrobianos de amplo-espectro, quimioterapia contra o câncer, colonização da mucosa por *Candida* spp., presença de cateter vascular (especialmente cateter venoso central), nutrição parenteral, neutropenia, cirurgia gastrointestinal, deficiência renal e hemodiálise (DIEKEMA; PFALLER, 2004; PUZNIAK et al., 2004; PAPHITOU et al., 2005).

Até a década de 90, o risco aumentado de candidemia relacionava-se a pacientes com câncer e neutropênicos (PRENTICE et al., 2000), entretanto, o foco tem mudado nos últimos anos para os pacientes hospitalizados em UTI, e em especial aqueles em UTI cirúrgica (UTIC). Entre estes pacientes, o mais importante fator para a ocorrência de candidíase é o tempo prolongado de permanência nestas unidades (OSTROSKY-ZEICHNER; PAPPAS, 2006).

A maioria dos fatores de risco apontados representa intervenções comuns ou procedimentos de UTI, e que quando considerados individualmente, são de pouca ajuda na determinação do risco para o estabelecimento da candidíase (MUNOZ et al., 2000; OSTROSKY-ZEICHNER, 2004). Sabe-se ainda que determinados indivíduos sejam mais susceptíveis a fatores de risco devido a condições subjacentes, tais como, pacientes com câncer hematológico ou neutropenia, aqueles que sofreram cirurgia gastrointestinal, as crianças prematuras e pacientes com idade acima de 70 anos (BLUMBERG et al., 2001; ANTONIADOU et al., 2003; HAJJEH et al., 2004;). Além disso, a hospitalização em UTI propicia a transmissão de *Candida*, tornando-se um fator de risco adicional e independente (WENZEL; GENNINGS, 2005). Algumas características relacionadas à episódios de candidemia no Brasil são apontadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Características de 712 episódios de candidemia em onze hospitais brasileiros.

Características	Nº.
Idade média (anos)	41 (0-96)
Sexo Masculino/Feminino	56%/44%
Duração média (dias) de hospitalização prévia à candidemia	20 (0-385)
Pacientes na UTI	317 (44%)
Câncer	195 (27%)
Cirurgia prévia	281 (39%)
Mortalidade	383 (54%)

* **Fonte:** Colombo et al., (2006)

No caso de episódios de candidúria, Araujo et al. (2005) relataram que os principais fatores de risco predisponentes compreenderam terapia antimicrobiana (100%) e uso de sonda vesical (92,6%). Neste estudo, ainda foi verificado que a presença de *Candida* na urina é maior no sexo feminino e que a grande maioria dos pacientes (80,9%) apresentava três procedimentos invasivos simultâneos.

2.6 SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

Em decorrência das características inerentes aos organismos eucariotos, as drogas antifúngicas detêm, em sua maioria, baixa toxicidade seletiva. Isto ocasiona uma considerável redução do arsenal terapêutico antifúngico, e compromete ainda mais a situação debilitante apresentada pelos pacientes com infecções fúngicas. A eficácia da terapêutica antifúngica depende diretamente da precocidade do diagnóstico, assim como do estado imunológico do paciente. Portanto, pacientes imunocomprometidos podem não responder satisfatoriamente ao tratamento independentemente das propriedades do antifúngico utilizado. Do mesmo modo, dadas as dificuldades diagnósticas já mencionadas, muitas vezes a introdução terapêutica específica ocorre tardiamente, contribuindo para os altos índices de mortalidade observados em infecções fúngicas invasivas (COSTA, 1999; PINTO, 2003).

Além das espécies de *Candida* apresentarem características epidemiológicas particulares, outro fator importante que incentiva a identificação ao nível de espécie é a variação que ocorre quanto à susceptibilidade aos antifúngicos mais comumente utilizados na clínica.

Os antifúngicos derivados de azoles incluem os imidazoles (miconazol e cetoconazol) e triazoles (fluconazol, itraconazol e voriconazol). Estes compostos são menos tóxicos do que a maioria dos antifúngicos polienos e atuam por inibição da biossíntese de ergosterol, o principal esterol da membrana fúngica. O voriconazol é um agente triazólico que atua sinergicamente na potência e ação do fluconazol pela introdução de um grupo α metila na estrutura principal da propila,

levando a resultados promissores no controle de isolados de *Candida* inicialmente resistentes aos azólicos (LEE et al., 2005).

No final dos anos 1950, a anfotericina B já era utilizada em alguns casos clínicos e em 1965 foi o primeiro agente antifúngico a ser aprovado pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) (WU, 1994; DISMUKES, 2000). O polieno anfotericina B exerce sua atividade ao se ligar aos ergosteróis na membrana celular fúngica, comprometendo a integridade de membrana e ocasionando a morte celular (LEE et al., 2005). As reações adversas agudas a anfotericina B tais como febre, calafrios, tremores, náusea, vômitos e dor de cabeça ocorrem freqüentemente e estão principalmente relacionadas à infusão (SCHÖFFSKI et al., 1998; NUCCI et al., 1999; WALSH et al., 1999; MORA-DUARTE et al., 2002). Alterações cardiovasculares como hipotensão, hipertensão e arritmia cardíaca foram observados com menor freqüência (WALSH et al., 1999; MORA-DUARTE et al., 2002). Hipocalemia, hipernatremia, diurese aumentada, (GERBAUD et al., 2003), hipomagnesemia, disfunção renal e efeitos tóxicos sobre a medula óssea (anemia, leucopenia e trombocitopenia) estavam associados com administrações repetidas (SCHÖFFSKI et al., 1998). O tratamento com anfotericina B quase sempre resulta em algum grau de disfunção renal, que varia em gravidade de um paciente para outro, sendo claramente uma função da dose total (MORA-DUARTE et al., 2002). Os principais mecanismos envolvidos no desenvolvimento da resistência às drogas poliênicas compreendem a diminuição ou ausência de esteróis de membrana ou formação de ergosterol, e o aumento da atividade da enzima catalase na célula fúngica, impedindo a formação de radicais livres responsáveis pela formação de “poros” na membrana fúngica. O uso de drogas distintas também pode contribuir para alterar a fisiologia dos fungos, selecionando aqueles resistentes aos fármacos poliênicos (BRAJTBURG et al., 1990).

Classicamente o termo resistência de um microrganismo é descrito como a persistência ou progressão de uma infecção no hospedeiro, mesmo que a concentração da droga no sítio da infecção seja máxima (PERFECT; COX, 1999). A eficácia da resposta clínica ao tratamento depende não somente da sensibilidade do agente infeccioso, mas também de fatores do hospedeiro, como sítio de infecção, resposta imunológica, capacidade de virulência do isolado, presença de corpo estranho no local da infecção e farmacocinética da droga (WHITE et al., 1998; PERFECT; COX, 1999).

A resposta *in vitro* em leveduras pode ser descrita como primária quando uma cepa é resistente previamente a sua exposição ao fármaco. Resistência intrínseca demonstra-se quando todos os membros da espécie são resistentes a certa droga ou classe de agente antifúngico, podendo ser exemplificado pela resistência intrínseca de *C. krusei* ao fluconazol. Resistência secundária ou adquirida se desenvolve em resposta à prévia exposição a uma droga (PERFECT; COX, 1999; WHITE et al., 1998). Estudos que abordam a sensibilidade das espécies de *Candida* aos principais antifúngicos demonstram que *C. glabrata*, seguida por *C. krusei* e *C. tropicalis*, são as espécies menos susceptíveis e apresentam uma maior propensão à resistência, particularmente quanto aos azólicos (fluconazol e itraconazol). Estas análises revelaram que a sensibilidade aos antifúngicos pode variar com a espécie de *Candida* considerada, com a região demográfica, assim como características da população estudada (SANGLARD et al., 2003; PFALLER et al., 2005; SANGUINETTI et al., 2005; PFALLER et al., 2006). Estudos realizados em hospitais brasileiros revelaram baixa frequência de amostras clínicas de *Candida* ssp. resistentes à antifúngicos (COLOMBO et al., 2003; PASSOS et al. 2007).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, S.; KHAN, Z.; MUSTAFA, S.A.; KHAN, U.Z. Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection and biochemical methods for species identification. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.2483-2489, 2002.

AKPAN, A.; MORGAN, R. Oral candidiasis. **Postgraduate Medical Journal**, v.78, p.455-9, 2002.

ALMIRANTE, B.; RODRÍGUEZ, D.; PARK, B.J.; CUENCA-ESTRELLA, M.; PLANES, A.M.; ALMELA, M.; MENSA, J.; SANCHEZ, F.; AYATS, J.; GIMENEZ, M.; SABALLS, P.; FRIDKIN, S.K.; MORGAN, J.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; WARNOCK, D.W.; PAHISSA, A. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 1829-1835, 2005.

ANTONIADOU, A.; TORRES, H.A.; LEWIS, R.E.; THORNBY, J.; BODEY, G.P.; TARRANT, J.P.; HAN, X.W.; ROLSTON, K.V.; SAFDAR, A.; RAAD, I.I.; KONTOYIANNIS, D.P. Candidemia in a tertiary care center: in vitro susceptibility and its association with outcome of initial antifungal therapy. **Medicine**, v. 82, p.309–321, 2003.

ANTUNES, A.G.V.; PASQUALOTTO, A.C.; DIAZ, M.C. AZEVEDO, P.A. SEVERO, L.C. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, p. 239-241, 2004.

AQUINO, V.R.; LUNARDI, L.W.; GOLDANI, L.Z.; BARTH, A.L. Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in southern Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.9, p.411-418, 2005.

ARANCIA, S.; CARATTOLI, A.; LA VALLE, R.; CASSONE, A.; DE BERNARDIS, F. Use of 65kDa mannoprotein gene primers in real time PCR identification of *Candida albicans* in biological samples. **Molecular and Cellular Probes**, v.20, n.05, p.263-268, 2006.

ARAUJO, C.R.; MIRANDA, K.C.; PASSOS, X.S. Identificação das leveduras do gênero *Candida* por métodos manuais convencionais e pelo método cromógeno CHROMagar™ *Candida*. , **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, p. 37-42, 2005.

ARSENIJEVIC, V.A.; ARSOVIC, N.; D'AMIC, A.; TRPKOVIC, A.; ZEC, I.K.; DUKIC, V. Protease activities of *Candida* spp. Isolated from immunocompetent patients with otomycosis. **Jugoslav Medical and Biochemistry**, v.23, p.171-174, 2004.

BANERJEE, S.N.; EMORI, T.G.; CULVER, T.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 in the United States, 1980–1989. National Nosocomial Infections Surveillance System. **American Journal of Medicine**, v. 91, p. 86S–89S, 1991.

BAUMGARTNER, C.; FREYDIERE, A.; GILLE, Y. Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using albicans ID and CHROMagar® *Candida* plates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.2, p.454-456, 1996.

BAUTISTA-MUÑOZ, C.; BOLDO, X.M.; VILLA-TANAKA, L.; HERNÁNDEZ-RODRIGUEZ, C. Identification of *Candida* spp. by Randomly Amplified Polymorphic DNA analysis and differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by direct PCR methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.1, p.414-420, 2003.

BECK-SAGUE, C.; JARVIS, W.R. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980–1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. **Journal of Infection Disease**, v. 167, p. 1247–1251, 1993.

BIRMAN, E.G. *Candida* e Candidoses. In: TOMMASI, M.H. **Diagnóstico em Patologia Bucal**, 3ª Ed. São Paulo: Pancast, p. 198-199, 2002.

BLUMBERG, H.M.; JARVIS, W.R.; SOUCIE, J.M.; EDWARDS, J.E.; PATTERSON, J.E.; PFALLER, M.A.; RANGEL-FRAUSTO, M.S.; RINALDI, M.G.; SAIMAN, L.; WIBLIN, R.T.; WENZEL, R.P. Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. **Clinical Infectious Disease**, v. 33, p.177–186, 2001.

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

BOO, T.W.; O'REILLY, B.; O'LEARY, J.; CRYAN, B. Candidemia in a Irish tertiary referral hospital: epidemiology and prognostic factors. **Mycoses**, v.48, p.251-259, 2005.

BRAJTBURG, J.; SVETLANA, E.; GEORGE, S. KOBAYASHI.; MEDOFF, G. Inhibition of amphotericin B (Fungizone) toxicity to cells by egg lecithin-glycocholic acid mixed micelles. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, n.12, p.2415-2416, 1990.

BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A.; MEDRANO, R.A.; ROCHA, M.F.G.; MONTEIRO, A.J.; CAVALCANTI, C.S.P.; MEIRELES, T.E.F.; SIDRIM, J.J.C. Onychomycosis in Ceará (Northeast Brazil): epidemiological and laboratory aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n.02, p.131-135, 2005.

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

CAPOOR, M.R.; NAIR, D.; DEB, M.; VERMA, P.K.; SRIVASTA, L; AGGARWAL,P. Emergence of non-albicans *Candida* species and antifungal resistance in a tertiary care hospital. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v.58, n.06, p.344-348, 2005.

CARVALHO, L.P.; BACELLAR, O.; NEVES, N.A.; CARVALHO, E.M.; DE JESUS, A.R. Avaliação da resposta imune celular em pacientes com candidíase recorrente. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n.5, p. 571-576, 2003.

CARVALHO, A.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; MARTINS, M.L.; PINA-VAZ, C. RODRIGUES, A.G.; LUDOVICO, P.; RODRIGUES, F. Multiples PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species. **Medical Mycology**, v.45, n.07, p.619-627, 2007.

CHANG, M.R.; CORREIRA, F.P.; COSTA, L.C.; XAVIER, P.C.N.; PALHARES, , D.B.; TAIRA, D.L.; PANIAGO, A.M.M.; PONTES, E.R.J.C.; MACHADO, V.E. *Candida* bloodstream infection: data from a teaching hospital in Mato Grosso do Sul. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, vol. 50, p. 265-268, 2008.

CHENG, M.F.; YANG, Y.L.; YAO, T.J.; LIN, C.Y.; CRYAN, B. Candidemia in a Irish tertiary referral hospital: epidemiology and prognostic factors. *Mycoses*, v.48, p.251-259, 2005.

CHONG, P.P.; HADI, S.R.A.; LEE, Y.L. Genotyping and drug resistance profile of *Candida* spp in recurrent and one-off vaginitis, and high association of non-*albicans* with non-pregnant status. **Infection Genetics and Evolution**, vol. 7, p. 449-456, 2007.

COLOMBO A.L.; GUIMARÃES T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, p.599-607, 2003.

COLOMBO AL, PERFECT J, DINUBILE M, BARTIZAL K, MOTYL M, HICKS P, LUPINACCI R, SABLE C, KARTSONIS N. Global distribution and outcomes for *Candida* species causing invasive candidiasis: results from an international randomized double-blind study of caspofungin versus amphotericin B for the treatment of invasive candidiasis. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 22, p. 470-474, 2003.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. The Brazilian network candidemia study. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 2816–2823, 2006.

CONSOLARO, M.E.L.; ALBERTONI, T.A.; YOSHIDA, C.S.; MAZUCHELI PERALTA, R.M.; SVIDIZIBSKI, T.I.E. Correlation of *Candida* species and symptoms among patients with vulvovaginal candidiases in Maringá, Paraná, Brasil. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.21, p.2002-2005, 2004.

COOKE, V.M.; MILES, R.J.; PRICE MIDGLEY, G.; KHAMRI, W.; RICHARDSON, A.C. New chromogenic agar medium for the identification of *Candida* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.3622-3627, 2002.

COSTA, L.J.; BIRMAN, E.G.; ALVES, S.H.; CURY, A.E. Antifungal susceptibility of *C. albicans* isolated from oral mucosa of patients with cancer. **Revista de Odontologia da Universidade de S. Paulo**, v.13, n.3, p.1-8, 1999.

CURY, A.E. Resistência a antifúngicos In: Zait. **Compêndio de Micologia Médica**. Medsi. Rio de Janeiro. 413-421. 1998.

CUTLER, J.E. Putative virulence factors of *Candida albicans*. **Annual Review of Microbiology**, v. 45, p.187-218, 1991.

DANIEL, C.R.I.; GUPTA, A.K.; DANIEL, M.P. *Candida* infection of the nail: role of *Candida* as a primary or secondary pathogen. **Dermatology**, v.37, p.904-907, 1998.

DEBUSK CH, DAOUD R, THIRUMOORTHY MC, WILSON FM, KHATIB R. Candidemia: current epidemiologic characteristics and a long-term follow-up of the survivors. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v.26, p.697-703, 1994.

DEAK, R.; BODAI, L.; AARTS, H.J.M.; MARAZ, A. Development of a novel, simple and rapid molecular identification system for clinical *Candida* species. **Medical Mycology**, v.42, n.04, p.311-318, 2004.

DE MEEÛS, T.; RENAUD, F.; MOUVEROUX, E.; REYNES, J.; GALEAZZI, G.; MALLIÉ, M.; BASTIDE, J.M. Genetic structure of *Candida glabrata* populations in AIDS and non-AIDS patient. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.2199-2206, 2002.

DE REPENTIGNY, L.; LEWANDOWSKI, D.; JOLICOEUR, P. Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, p.729-759, 2004.

DIEKEMA, D.J.; MESSER, S.A.; BRUEGGEMANN, A.B.; COFFMAN, S.L.; DOERN, G.V.; HERWALDT, L.A.; PFALLER, M.A. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.1298-1302, 2002.

DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M.A. Nosocomial candidemia: an ounce of prevention is better than a pound of cure. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 25, p.624–626, 2004.

DISMUKES, W.E. Introduction to antifungal drugs. **Clinical Infectious Diseases**, v.30, p.653-657, 2000.

ELAHI, S.; GERALD, P.; ROBERT, A.B.; ROBERT, C. Nitric oxide-enhanced resistance to oral candidiasis. **Immunology**, London, v.104, p.447-454, 2001.

ENGLEBERG, N.C.; EISENSTEIN, B.I. Detection of microbial nucleic acids for diagnostic purposes. **Annual Review of Medicine**, v.43, p.147-155, 1992.

ERGON, M.C.; GÜLAY, Z. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from urine at an intensive care unit. **Mycoses**, v.48, p.126-131, 2004.

EDMOND, M.B.; WALLACE, S.E.; MC CLICH, D.K.; PFALLER, M.A.; JONES, R.N.; WENZEL, R.P. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v.29, p.239-244, 1999.

FARAH, C.S.; ASHMAN, R.B.; CHALLACOMBE, S.J. Oral Candidosis. **American Journal of Clinical Dermatology**, v.18, p.553-62, 2000.

FEBRÉ, N.; SILVA N.; MEDEIROS, E.A.S.; WEY, S.B.; COLOMBO, A.L.; FISCHMANN, O. Microbiological characteristics of yeasts isolated from urinary tracts of intensive care unit patients undergoing urinary catheterization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 1584-1586, 1999.

FELK, A.; KRETSCHMAR, M.; ALBRECHT, A.; SCHALLER, M.; BEIHAUER, S.; NICHTERLEIN, T.; SANLARD, D.; KORTING, H.C.; SCHÄFER, W.; HUBE, B. *Candida albicans* hyphal formation and expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenquimal organs. *Infection and Immunity*, v.70, p.3689-3700, 2002.

FERRAZA, M.H.S.H.; MALUF, M.L.F.; CONSOLARO, M.E.L.; SHINOBU, C.S.; SVIDZINSKI, T.I E.; BATISTA, M.R. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.27, n.02, p.58-63, 2005.

FOTEDAR, R.; AL-HEDAITHY, S.S.A. Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. **Mycoses**, v.48, p. 62-67, 2003.

FRUTOS, R.D.; FERNANDEZ-ESPINAR, M.T.; QUEROL, A. Identification os species of genus *Candida* by analisis of the 5.8S rRNA gene and two ribosomal internal transcribed spacers. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v.85, n.03, p.175-185, 2004.

FURLANETO-MAIA, L.; SPECIAN, A.F.; WILNERZON, D.S.; OLIVEIRA, M.T.; FURLANETO, M.C. Estudo da incidência de amostras clínicas do gênero *Candida* isoladas de diverso sítios anatômicos. **Acta Scientiarum Health Sciences**, v.29, p. 33-37, 2007.

FURLANETO-MAIA, L.; SPECIAN, A.F.; BIZERRA, F.C.; OLIVEIRA, M.T.; FURLANETO, M.C. *In vitro* evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida* spp obtained from elderly healthy individuals. **Mycopathologia**, v. 166, p. 209-217, 2008.

GERBAUD, E.; TAMION, F.; GIRAULT, C.; CLABAULT, K.; LEPRETRE, S.; LEROY, J.; BONMARCHAND, G. Persistent acute tubular toxicity after switch from conventional amphotericin B to liposomal amphotericin B (AmBisome). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.51, p.473-475, 2003.

GRODZICKER, T., ANDERSON, C., PHILLIP A. SHARP, P.A., SAMBROOK, J. Conditional Lethal Mutants of Adenovirus 2-Simian Virus 40 Hybrids. **American Society for Microbiology**, v.13, n.06, p.1237-1244, 1974.

GUIVER, M.; LEVI, K.; OPPENHEIM, B.A. Rapid identification of *Candida* species by TaqMan PCR. **Journal of Clinical Pathology**, v.54, n.05, p.362-366, 2001.

HACHEM, R.; HANNA, H.; KONTOYIANNIS, D. JIANG, Y.; RAAD, I. The changing epidemiology of invasive candidiasis: *Candida glabrata* and *Candida krusei* as the leading causes of candidemia in hematologic malignancy. **Cancer**, v.112, n.11, p.2493-2499, 2008.

HAJJEH, R.A.; SOFAIR, A.N.; HARRISON, I.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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p.1519– 1527, 2004.

HAYNES, K. Virulence in *Candida* species. **Trends in Microbiology**, v. 9, p. 591-595, 2001.

HAZEN, K. C. New and emerging yeast pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, p.462–478, 1995.

HAZEN, K.C.; BARON, E. J.; COLOMBO, A. L.; GIRMENIA, C.; SANCHEZ-SOUSA, A.; DEL PALACIO, A.; DE BEDOUT, C.; GIBBS, D. L.; THE GLOBAL ANTIFUNGAL SURVEILLANCE GROUP. Comparison of the susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole and voriconazole in a 4-Year global evaluation using disk diffusion. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 5623–5632, 2003.

HOPE, W., MORTON, A., EISEN, D.P. Increase in prevalence of nosocomial *Candida albicans* candidaemia and the association of *Candida krusei* with fluconazole use. **Journal of Hospital Infection**, v.50, p.56-65, 2002.

HOSPENTHAL, D.R.; BECKIUS, M.L.; FLOYD, K.L.; HORVATH, L.L.; MURRAY, C.K. Presumptive identification of *Candida* species other than *C.albicans*, *C.krusei*, and *C.tropicalis* with the new chromogenic medium CHROMagar Candida®. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, p.5:1, 2006.

IWEN, P.C.; KELLY, D.M.; REED, E.C.; HINRICHS, S.H. Invasive infection due to *Candida krusei* in immunocompromised patients not treated with fluconazole. **Clinical Infectious Diseases**, v.20, p.342-347, 1995.

JAIN, P.; KHAN, Z.K.; BHATTACHARYA, E.; RANADE, S.A. Variation in random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles specific to fluconazole-resistant and sensitive of *Candida albicans*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.41, p.113-119, 2001.

JEWUCHOWICZ, V.M.; MUJICA, M.T.; BRUSCA, M.I.; SORDELLI, N.; MALZONE, M.C.; POLA, S.J.; IOVANNITTI, C.A.; ROSA A.C. Phenotypic and genotypic identification of *Candida dubliniensis* from subgingival sites in immunocompetent subjects in Argentina. **Oral Microbiology and Immunology**, v.23, n.06, p.505-509, 2008.

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

KAUFFMAN, C.A.; VAZQUEZ, J.A.; SOBEL, J.D.; GALLIS, H.A.; MCKINSEY, D.S.; KARCHMER, A.W.; SUGAR, A.M.; SHARKEY, P.K, WISE, G.J.; MANGI, R.; MOSHER, A.; LEE, J.W.; DISMUKES, W.E. Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. **Clinical Infectious Diseases**, v.30, p.14-18, 2000.

KHLIF, M.; SELLAMI, H.; SELLAMI, A.; MAKNI, F.; CHEIKHROUHO, F.; CHELLY, H.; BOUAZIZ, M.; AYADI, A. Detection and identification of *Candida* sp. By PCR in candidemia diagnosis. **Journal de Mycologie Medicale**, v.17, n.04, p.256-260, 2007.

KOGA-ITO, C.Y.; LYON, J.P.; VIDOTTO, V.; RESENDE, M.A. Virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from oral candidosis patients and control individuals. **Mycopathologia**, v. 161, p. 219-223, 2006.

KOJIC, E.M.; DAROUICHE, R.O. *Candida* infections of medicinal devices. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, n.2, p.255-267, 2004.

KREGEN-VAN RIJ, N.J.W. **The yeast: a taxonomic study**. Amsterdam, Elsevier, p.1082, 1984.

LAU, A.; SORRELL, T.C.; CHEN, S.; STANLEY, K.; IREDELL, J.; HALLIDAY, C. Multiplex tandem PCR: a novel platform for rapid detection and identification of fungal pathogens from blood culture specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.09, p.3021-3027, 2008.

LEE, R.E.B.; LIU, T.T.; BARKER, K.S.; LEE, R.E.; ROGERS, P.D. Genome-wide expression profiling of the response to ciclopirox olamine in *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.55, p.655-662, 2005.

LEHMANN, P.F.; LIN, D.; LASKER, B.A. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p.3249-3254, 1992.

LEVY, I.; RUBIN, L.G.; VASISHTHA, S.; TUCCI, V.; SOOD, S.K. Emergence of *Candida parapsilosis* as the predominant species causing candidemia in children. **Clinical Infectious Diseases**, v.26, p.1086-1088, 1998.

LI, Y.L.; LEAW, S.N.; CHEN, J.H.; CHANG, H.C. Rapid identification of yeasts commonly found in positive blood cultures by amplification of the internal transcribed spacer regions 1 and 2. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.22, p.693-696, 2003.

LIAN, C.; ZHAO, J.; ZHANG, Z. genotype of *Candida* species associated with different conditions of vulvovaginal candidosis. **Mycoses**, vol. 47, p. 495-502, 2004.

LIGUORI, G.; DI ONOFRIO, V.; LUCARIELLO, A.; GALLE, F.; SIGNORIELLO, G.; COLELLA, G.; D'AMORA, M.; ROSSANO, F. Oral candidiasis: a comparison between conventional methods and multiplex polymerase chain reaction for species identification. **Oral Microbiology and Immunology**, v.24, n.01, p.76-78, 2009.

LUQUE, A.G.; BIASOLI, M.S.; TOSELLO, M.E.; BINOLFI, A.; LUPO, S.; MAGARO, H.M. Oral yeast carriage in HIV-infected and non-infected populations in Rosario, Argentina. **Mycoses**, v.52, n.01, p.53-59, 2009.

LUO, G.Z.; MITCHELL, T.G. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.08, p.2860-2865, 2002.

LYNCH, D.P.; MEMPHIS, T. Oral candidiasis: history, classification and clinical presentation. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v.78, p.189-93, 1994.

MAIWALD, M.; KAPPE, R.; SONNTAG, H.G. Rapid presumptive identification of medically relevant yeasts to the species level by polimerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.32, p.115-122, 1994.

MARTINS, E.A.; GUERRER, L.V.; CUNHA, K.C.; SOARES, M.M.C.N.; DE ALMEIDA, M.T.G. Onicomicose: estudo clinico, epidemiológico e micológico no município de São José do Rio Preto. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, n.02, p.596-598, 2007.

MATSUMOTO, F.E.; GANDRA, R.F.; RUIZ, L.S.; AULER, M.E.; MARQUES, S.A.V.; PIRES, M.F.C.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R. Yeasts isolated from blood and catheter in children from a Public Hospital of São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v.154, n.2, p.63-69, 2002.

MEDRANO, D.J.A.; BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A.; ROCHA, M.F.G.; RABENHORST, S.H.B.; SIDRIM, J.J.C. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.48, p.17-20, 2006.

MELO, A.S.A.; DE ALMEIDA, L.P.; COLOMBO, A.L. Evolutionary distances and identification of *Candida* species in clinical isolates by Randomly amplified Polymorphic DNA (RAPD). **Mycopathologia**, v.2, p.357-368, 1998.

MERLE, V.; GERMAIN, J.M.; BUGEL, H.; NOUVELLON, M.; LEMELAND, J.F.; CZERNICHOW, P. et al. Nosocomial urinary tract infections in urologic patients: assessment of a prospective surveillance program including 10,000 patients. **European Urology**, v.41, p.483-9, 2002.

MORA-DUARTE, J.; BETTS, R.; ROTSTEIN, C.; COLOMBO, A.L.; THOMPSON-MOYA, L.; SMIETANA, J.; LUPINACCI, R.; SABLE, C.; KARTSONIS, N.; PERFECT, J. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n.25, p.2020-2029, 2002.

MOREIRA-OLIVEIRA, M.S.; MIKAMI, Y.; MIYAJI, M.; IMAI, T.; SCHREIBER, A.Z.; MORETTI, M.L. Diagnosis of candidemia by polymerase chain reaction and blood culture: prospective study in a high-risk population and identification of variables

associated with development of candidemia. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.24, p.721-726, 2005.

MULHALL, A.B.; CHAPMAN, R.G, CROW, R.A Bacteriuria during indwelling urethral catheterization. **Journal of Hospital Infection**, v.11, p.253-62, 1988.

MUNÓZ, P.; BURILLO, A.; BOUZA, E. Criteria used when initiating antifungal therapy against *Candida* spp. in the intensive care unit. **International Journal of Antimicrobials Agents**, v. 15, p.83–90, 2000.

MUNÓZ, P., SÁNCHEZ-SOMOLINOS, M., ALCALÁ, L., RODRÍGUEZ-CRÉIXEMS, M., PELÁEZ, T., BOUZA, E. *Candida krusei* fungaemia: antifungal susceptibility and clinical presentation of na uncommon entity during 15 years in a single general hospital. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.55, p.188-193, 2005.

NAGLICK, J.R.; CHALLACOMBE, S.J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67, p.400-428, 2003.

NAZZAL, D.; YASIN, S.; ABU-ELTEEN, K. A rapid PCR-based method for identification of four important *Candida* species. **New Microbiologica**, v.28, n.03, p.245-250, 2005.

NUCCI, M.; LOUREIRO, M.; SILVEIRA, F.; CASALL, A.R.; BOUZAS, L.F.; VELASCO, E.; SPECTOR, N.; PULCHERI, W. Comparison of the toxicity of amphotericin B in 5% dextrose with that of amphotericin B in fat emulsion in a randomized trial with cancer patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, p.1445-1448, 1999.

NUCCI, M. Candiduria in hospitalized patients: A review. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.4, p.168-172, 2000.

ODDS, F.C. Resistance of yeasts to azole-derivative antifungals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.39, p.1696-1699, 1993.

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

OSTROSKY-ZEICHNER, L. Prophylaxis and treatment of invasive candidáses in the intensive care setting. **European Journal Clinical of Microbiology and Infectious Disease**, v.23, p.739–744, 2004.

OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PAPPAS, L.G. Invasive candidiasis in the intensive care unit. **Critical Care Medicine**, v. 34, p.857–863, 2006.

PAPHITOU, N.I.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REX, J.H. Rules for identifying patients at increased risk for candidal infections in the surgical intensive care unit: approach to developing practical criteria for systematic use in antifungal prophylaxis trials. **Medical Mycology**, v. 43, p.235–243, 2005.

PARITPOKEE, S.; HALL, G.; PROPOC, G. Rapid identification of Yeast Isolates using BD BBL™ CHROMagar® Candida. **As presented at the 105th General Meeting of the American Society for Microbiology**, 2005.

PASSOS, X. S.; COSTA, C. R.; ARAÚJO C. R.; NASCIMENTO, E. S.; SOUZA, L. K. H.; FERNANDES, O. F. L.; SALES, W. S.; SILVA, M. R. R. Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* spp. Bloodstream isolates from a Brazilian tertiary care hospital. **Mycopathologia**, v.163, p.145-151, 2007.

PAULITSCH, A.; WEGAR, W.; GINTER-HANSELMAYER, G.; MARTH, E.; BUZINAI, W. A 5-years (2000-2004) epidemiological survey of *Candida* and non-*Candida* yeast species causing vulvovaginal candidáses in Graz, Australia. **Mycoses**, v.49, p.471-475, 2006.

PERFECT, J.R.; COX, G.M. Drug resistance in *C. neoformans*. **Drug Resist. Update**, v.2, p.259-269, 1999.

PFALLER, M. A.; MESSER, S.A.; HOLLIS, R.J. Strain delineation and antifungal susceptibilities of epidemiologically related and unrelated isolates of *Candida lusitaniae*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, p.127–133, 1994.

PFALLER, M.A., MESSER, S.A., HOUSTON, A. National epidemiology of mycoses survey: a multicenter study of strain variation and antifungal susceptibility among isolates of *Candida* species. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.31, p.289-296, 1998.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D.J. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p.4419–4431, 2004.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; RINALDI, M. G.; BARNES, R.; HU, B.; VESELOV, A. V.; TIRABOSCHI, N.; NAGY, E.; GIBBS, D. L.; and GLOBAL ANTIFUNGAL SURVEILLANCE GROUP. Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 5848–5859, 2005.

PFALLER, M. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D. J. *in vitro* susceptibilities of *Candida* spp. to caspofungin: four years of global surveillance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44 (3), p. 760–763, 2006.

PINTO, P.M. Caracterização fenotípica e análise da variabilidade genética de espécies do gênero *Candida* isoladas de pacientes portadores ou não de doenças de base. 148f. Tese. **ICB-UFMG**. Belo Horizonte, 2003.

PONNUVEL, K.M., RAJKUMAR, R., MENON, T. Role of *Candida* in indirect pathogenesis of antibiotic associated diarrhoea in infants. **Mycopathologia**, v.135, p.145-147, 1996.

PRENTICE, H.G.; KIBBLER, C.C.; PRENTICE, A.G. Towards a targeted, risk-based, antifungal strategy in neutropenic patients. **British Journal of Haematology**, v. 110, p.273-284, 2000.

PUZNIAK, L.; TEUTSCH, S.; POWDERLY, W.; POLISH, L. Has the epidemiology of nosocomial candidemia changed?. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 25, p.628–633, 2004.

REX, J. H.; PFALLER, M.A. Has antifungal susceptibility testing come of age? **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, p.982–989, 2002.

RICHARDSON, M.D. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.56, p. 5-11, 2005.

ROBERT, F.; LEBRETON, F.; BOUGNOUX, M.E.; PAUGAM, A.; WASSERMANN, D.; SCHLOTTERER, M.; TOURTE-SCHAEFER, C.; DUPOUY-CAMET, J. Use of random amplified polymorphic DNA as a typing method for *Candida albicans* in

epidemiological surveillance of a burn unit. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.2366-2371, 1995.

ROWEN, J.L.; TATE, J.M.; PASSARELL, L.; MEGINNIS, M.R. *Candida* isolates from neonates: frequency of misidentification and reduced susceptibility to fluconazole. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.3735-3737, 1999.

RUIZ, L.S.; SUGIZAKI, M.F.; MONTELLI, A.C.; MATSUMOTO, F.E.; PIRES, M.F.C.; DA SILVA, B.C.M.; SILVA, E.H.; GANDRA, R.F.; GONÇALVES DA SILVA, E.; AULER, M.E.; PAULA, C.R. Fungemia by yeasts in Brazil: occurrence and phenotypic study of strains isolated at the Public Hospital, Botucatu, São Paulo. **Journal of Medical Mycology**, v.15, n.01, p.13-21, 2005.

SAFDAR, A.; CHATURVEDI, V.; CROSS, E.W.; PARK, S.; BERNARD, E.M.; ARMSTRONG, D.; PERLIN, D.S. Prospective study of *Candida* species in patients at a comprehensive cancer center. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.45, p.2129-2133, 2001.

SAINT, S.; LIPSKY, B.A. Preventing catheter-related bacteriuria: should we? Can we? How? *Archives of Internal Medicine*, v.159, p.800-8, 1999.

SALKIN, D.; SAID, A. Nosocomial funguria: resultant morbidity and therapeutic intervention. **Clinical Infectious Diseases**, v.17, p.1066-1067, 1993.

SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. Experimental Oral candidiasis in animal models. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14 (2), p. 398–429, 2001.

SANDVEN, P. Epidemiology of candidemia. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.17, p.73-81, 2000.

SANDVEN, P.; BEVANGER, L.; DIGRANES, A.; HAUKLAND, H. H.; MANNSÅKER, T.; GAUSTAD, P.; AND THE NORWEGIAN YEAST STUDY GROUP. Candidemia in Norway (1991 to 2003): Results from a Nationwide Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 1977–1981, 2006.

SANGLARD, D.; ISCHER, F.; PARKINSON, T.; FALCONER, D.; BILLE, J. *Candida albicans* Mutations in the Ergosterol Biosynthetic Pathway and Resistance to Several Antifungal Agents. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 47 (8), p. 2404–2412, 2003.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; FIORI, B.; RANNO, S.; TORELLI, R.; FADDA, G. Mechanisms of Azole Resistance in Clinical Isolates of *Candida glabrata* Collected during a Hospital Survey of Antifungal Resistance. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 49 (2), p. 668–679, 2005.

SCHABEREITER-GURTNER, C.; SELITSCH, B. ROTTER, M.L.; HIRSCHL, A.M.; WILLINGER, B. Development of novel real-time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important *Aspergillus* and *Candida* species in clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.03, p.906-914, 2007.

SCHÖFFSKI, P.; FREUND, M.; WUNDER, R.; PETERSEN, D.; KÖHNE, C.H.; HECKER, H.; SCHUBERT, U.; GANSER, A. Safety and toxicity of amphotericin B in glucose 5% or intralipid 20% in neutropenic patients with pneumonia or fever of unknown origin: randomized study. **British Medical Journal**, v.317, p.379-384, 1998.

SELLAMI, A.; SELLAMI, H.; MAKNI, F. Candiduria in intensive care unit: significance and value of yeast numeration in urine. **Annales Francaises D Anesthesie ET DE Reanimation**, v. 25, p. 584-588, 2006.

SELVARANGAN, R.; BUI, U.; LIMAYE, A.P.; COOKSON, B.T. Rapid identification of commonly encountered *Candida* species directly from blood culture bottles. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.12, p.5660-5664, 2003.

SHINOBU, C.S.; OGATTA, S.F.Y.; BIZERRA, F.; FURLANETO, L.; PERALTA, R.M.; SVIDZINSKI, T.I.E.; CONSOLARO, M.E.L. Lack of Association Between Genotypes and Virulence Factors in *C. albicans* Strains Isolated From Vaginal Secretion. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p. 467-471, 2007.

SPELLBERG, B. J.; FILLER, S.G.; EDWARDS, JR, J.E. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, p.244–251, 2006.

SOBEL, J.D. Management of asymptomatic candiduria. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.11, p.285-288, 1999.

SOUZA, E.M.B. Aspectos morfo-fisiológicos, fatores de virulência e sensibilidade a antifúngicos de amostras de *C. albicans*, sorotipos A e B, isoladas em São Paulo, Brasil. **Revista de Microbiologia**, v. 21, p.247-253, 1990.

STAIB, P.; KRETSCHMAR, M.; NICHTERLEIN, T.; HOF, H.; MORSCHHÄUSER, J. Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 97, p. 6102–6107, 2000.

STEFFAN, P.; VASQUEZ, J.A.; BOIKOV, D.; XU, C.; SOBEL, J.D.; AKINS, R.A. Identification of *Candida* species by Randomly Amplified Polymorphic DNA fingerprinting of colony lysates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.2031-2039, 1997.

SULLIVAN, D.; HENMAN, M.; MORAN, G.; O'NEILL, L.; BENNETT, D.; SHANLEY, D.; COLEMAN, D. Molecular genetic approaches to identification, epidemiology and taxonomy of non-*albicans* *Candida* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, p.399-408, 1996.

TALWAR, P., CHAKRABARTI, A., CHAWLA, A. Fungal diarrhoea: association of different fungi and seasonal variation in their incidence. **Mycopathologia**, v.110, p.101-105, 1990.

TAVANTI, A.; PARDINI, G.; CAMPA, D.; DAVINI, P.; LUPETTI, A.; SENESI, S. Differential Expression of Secretory Aspartyl Proteinase Genes (*SAP1-10*) in Oral *Candida albicans* Isolates with Distinct Karyotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, 4726–4734, 2004.

TOYA, S.P.; SCHRAUFNAGEL, D.E.; TZELEPIS, G.E. Candiduria in intensive care units: association with heavy colonization and candidemia. **Journal of Hospital Infection**, v. 66, p. 201-206, 2007.

VALERIO, H.M.; WEIKERT-OLIVEIRA, R.D.B.; DE RESENDE, M.A. Differentiation of *Candida* species obtained from nosocomial candidemia using RAPD-PCR technique. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina**, v.39, n.02, p.174-178, 2006.

VANDEN BOSSCHE, H.; WARNOCK D.W.; DUPONT, B.; KERRIDGE, D.; SEN GUPTA, S.; IMPROVISI, L.; MARICHAL, P.; ODDS, F.C.; PROVOST, F.; RONIN, O. Mechanisms and clinical impact of antifungal drug resistance. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.32, n.1, p.189-202, 1994.

VARGAS, K.G.; JOLY, S. Carriage frequency, intensity of carriage and strains of oral yeast species vary in progression to oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive individuals. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.341-350, 2002.

WALSH, T.; FINBERG, R.W.; ARNDT, C.; HIEMENZ, J.; SCHWARTZ, C.; BODENSTEINER, D.; PAPPAS, P.; SEIBEL, N.; GREENBERG, R.N.; DUMMER, S.; SCHUSTER, M.; HOLCENBERG, J.S. Liposomal amphotericin B por empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia. **The New England Journal of Medicine**, v.340, p.764-771, 1999.

WARNOCK, D.W. Azole drug resistance in *Candida* species. **Journal of Medical Microbiology**, v.37, p.225-226, 1992.

WENZEL, R.P.; GENNINGS, C. Bloodstream infections due to *Candida* species in the intensive care unit: identifying especially high-risk patients to determine prevention strategies. **Clinical Infectious Disease**, v. 41, n.6, p.389–393, 2005.

WHITE, T.C.; KIEREN, A.M.; RALEIGH, A.B. Clinical cellular and molecuar factos that contribute to antifungal drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, p.382-402, 1998.

WILLIAMS, D.W.; WILSON, M.J.; LEWIS, M.A.O.; POTTS, A.J.C. Identification of *Candida* species by PCR and restriction fragment length polymorphism analyses of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.2476-2479, 1995.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; M. TALLENT, S.M.; SEIFERT, H.; RICHARD P. WENZEL, R.P.; EDMOND, M.B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, p.309-317, 2004.

WROBLEWSKA, M.M.; SWOBODA-KOPEC, E.; ROKOSZ, A.; KRAWCZYK, E.; MARCHEL, H.; LUCZAK, M. Epidemiology of clinical isolates of *Candida albicans* and their suscepitibility to triazoles. **International. Journal of Antimicrobial Agents**, v.20, p.472-475, 2002.

WU, T.C. On the development of antifungal agents: perspective of the U.S. Food and Drug Administration. **Clinical Infectious Diseases**, v.19, p.54-58, 1994.

XAVIER, P.C.N.; CHANG, M.R.; NUNES, M.O; PALHARES, D.B.; SILVA, R.A.E.; BONFIM, G.F.; ALMEIDA, N.F. Neonatal candidemia in a public hospital in Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, n.05, p.459-463, 2008.

XU, J.; ADELA, R.R.; RYTAS, V.; THOMAS, G.M. Clonal and spontaneous origins of fluconazol resistance in *Candida albicans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.03, p.1214-1220, 2000.

YONG, P.V.C.; CHONG, P.P.; LAU, L.Y.; YEOH, R.S.C.; JAMAL, F. Molecular identification of *Candida orthopsilosis* isolated from blood culture. **Mycopathologia**, v.165, n.02, p.81-87, 2008.

ZABEAU, M., VOS, P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. **European Patent Application**, publication number 0 534 858 A1, 1993.

PARTE I

FREQUÊNCIA DE ESPÉCIES DE *Candida* spp. NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO (HU) - LONDRINA: IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E DISTRIBUIÇÃO EM RELAÇÃO AO SÍTIO DE ISOLAMENTO

1 INTRODUÇÃO

Leveduras do gênero *Candida* estão freqüentemente presentes em humanos na forma comensal, compondo a microbiota normal da pele e de membranas mucosas (WROBLEWSKA et al., 2002; SCHOFIELD et al., 2003). Contudo, estas leveduras podem causar um amplo espectro de doenças, desde infecções superficiais de mucosas até infecções sangüíneas disseminadas, afetando principalmente pacientes imunocomprometidos (SCHOFIELD et al., 2003; ALMIRANTE et al., 2005; AQUINO et al., 2005).

A emergência destes organismos como patógenos significativos tem importantes implicações, pois geram altos índices de morbidade, longos períodos de permanência em hospitais, dificuldade e alto custo do tratamento, assim como altas taxas de mortalidade (BIRMAN, 2002).

Estudos epidemiológicos relativos às candidíases, em diversas partes do mundo têm revelado um aumento significativo na incidência de espécies de *Candida* não-*albicans* (PFALLER et al., 1996; DIEKEMA et al., 2002; ALMIRANTE et al., 2005). Considerando os diferentes sítios anatômicos de isolamento, *C. albicans* tem sido o patógeno mais comumente encontrado em candidíases cutâneas e de orofaringe (REX et al., 2000). Quanto às infecções superficiais, em 1998 Daniel et al. descreveram que *C. albicans* foi a espécie predominante em infecções de unha. No entanto, em trabalho recente, Furlaneto-Maia et al. (2007) demonstraram que 89% das amostras provenientes de raspado de unha corresponderam a espécies não-*albicans*, com predominância de *C. glabrata* (29%).

Quanto às infecções do trato urinário, segundo alguns autores, *Candida* spp. são responsáveis por até 30% dos casos em pacientes internados em UTI (FEBRÉ et al., 1999; LUNDSTROM; SOBEL, 2001). Oliveira et al. (2001)

descreveram predominância de espécies não-*albicans* (64%), sendo estas consideradas patógenos emergentes do trato urinário em pacientes gravemente enfermos. Neste estudo, de um total de 101 isolados obtidos, 53 eram *C. tropicalis*. Segundo estes autores, ainda são escassos dados relativos à frequência, características e implicações da candidúria em pacientes brasileiros.

Apesar da importância crescente que as candidíases vêm assumindo no interior dos hospitais, no Brasil os estudos relativos à incidência de *Candida* spp. ainda são escassos (AQUINO et al., 2005; COLOMBO et al., 2003, 2006; PASSOS et al., 2007; FURLANETO-MAIA et al., 2007). A maioria dos estudos concentra-se em casos de infecção da corrente sanguínea (candidemia), que tem se tornado um problema crescente em quase todas as regiões demográficas. Em estudo realizado em seis hospitais terciários dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, envolvendo 145 episódios de candidemia, foi observado que as espécies mais frequentemente isoladas foram *C. albicans* (37%), *C. parapsilosis* (25%), *C. tropicalis* (24%), *C. rugosa* (5%) e *C. glabrata* (4%) (COLOMBO et al., 2003). Dados semelhantes foram observados em estudo mais recente, realizado em hospitais de nove cidades das regiões sudeste, sul e região central do Brasil, envolvendo 712 episódios de candidemia (COLOMBO et al., 2006).

A existência de diferenças espécie-específicas quanto à susceptibilidade aos diferentes antifúngicos, e a elevada mortalidade e morbiletalidade das infecções causadas por algumas espécies de *Candida* não-*albicans*, fazem com que a identificação ao nível de espécie e a origem dos isolados, em infecções nosocomiais, sejam de grande importância na monitoração das taxas de infecção hospitalar bem como na identificação precoce de surtos (ERGON; GÜLAY, 2004; MELO et al., 1998).

Os métodos denominados clássicos de identificação de leveduras, baseados em assimilação de açúcares, reações de fermentação e morfologia (WILLIAMS et al., 1995), embora sejam eficientes na maioria dos casos, são laboriosos e requerem longo tempo de análise (LEHMANN et al., 1992; STEFFAN et al., 1997; ROWEN et al., 1999; AHMAD et al., 2002; BAUTISTA-MUÑOZ et al., 2003). A identificação presuntiva, que se baseia no emprego de meios diferenciais, contendo substratos cromogênicos, também têm sido amplamente empregada, embora apresente algumas limitações, como identificação de um número limitado de espécies (ARAUJO et al., 2005; COOKE et al., 2005).

Métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), e algumas de suas variações, a exemplo de nested-PCR e PCR multiplex, têm sido desenvolvidos para a detecção rápida e específica de espécies de *Candida* envolvidas em processos infecciosos. Vários são os exemplos do emprego destas metodologias e oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos (GUIVER et al., 2001; AHMAD et al., 2002; LUO; MITHELL, 2002; LI et al., 2003; NAZZAL et al., 2005; FURLANETO-MAIA et al., 2007; KHLIF et al., 2007; CARVALHO et al., 2007; JEWUCHOWICZ et al., 2008; YONG et al., 2008; LAU et al., 2008; LUQUE et al., 2009; LIGUORI et al., 2009). Outros métodos, a exemplo de RAPD (*randomly amplified polymorphic DNA*) (BAUTISTA-MUÑOZ et al., 2003) e RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) (CIRAK et al., 2003) também têm sido aplicados com sucesso na identificação de espécies de *Candida*.

Embora o Hospital Universitário de Londrina (HU) seja um dos principais hospitais públicos de grande porte na região norte do Paraná, sendo um centro de referência regional para o SUS, até o momento nenhum estudo havia sido conduzido com referência à avaliação da frequência de espécies de *Candida* no HU.

Considerando o exposto, torna-se de fundamental importância o emprego de metodologias rápidas e confiáveis de identificação de amostras clínicas de *Candida*, bem como o conhecimento relativo à frequência e distribuição das espécies em pacientes atendidos no HU. Estes aspectos podem auxiliar em práticas de rotina microbiológica clínica na adoção de medidas profiláticas e terapêuticas eficientes.

1.1 OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos:

- avaliação da frequência e distribuição das espécies em relação aos sítios anatômicos de isolamento;
- identificação, por método molecular, de amostras clínicas de *Candida* spp. isoladas de pacientes do HU;
- levantamento de características relacionadas aos pacientes quanto a sexo, idade e unidade de internação.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Neste estudo foram isoladas 270 amostras clínicas de *Candida* spp., obtidas de pacientes atendidos no HU, localizado na cidade de Londrina -PR/Brasil, no período de julho de 2004 a julho de 2007. Quanto aos sítios anatômicos de isolamento, as amostras foram obtidas de sangue, urina, lesões superficiais (lesões em geral e raspados de unha) e mucosas (cavidade oral, nasal, ouvido, vaginal e secreção traqueal). Ainda, a cerca dos pacientes, foram obtidos dados quanto ao sexo, idade e unidade de internação, fornecidos pelo HU.

2.2 IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA DAS AMOSTRAS

A identificação presuntiva das amostras foi realizada empregando-se o meio de cultivo cromogênico diferencial CHROMagar® *Candida* (CHROMagar, Company Ltd., Paris France) (BERNAL et al., 1996; COOKE et al., 2002), conforme instrução do fabricante. Neste meio, após 48 horas de incubação a 37°C, *C. albicans* originou colônias de coloração verde, *C. tropicalis* colônias azuis metálico, *C. krusei* colônias rosa rugosa e as colônias de coloração branca a violeta foram classificadas como *Candida* sp.

2.2.1 Identificação das amostras de *Candida dubliniensis*

Na identificação presuntiva, uma das amostras apresentou coloração verde escura e não foi possível identificar esta molecularmente. Este isolado foi então submetido à técnica descrita por Zia et al. (2004), permitindo assim sua identificação. Essa técnica se baseia no emprego do meio denominado tabaco agar.

Para tal, 50g de tabaco (cigarro Marlboro) foi adicionado a um 1 L de água destilada. A mistura foi fervida por 30 minutos e filtrada em camadas de gaze. Ao filtrado foi acrescido 20g de ágar e o volume foi ajustado para 1 L. O pH do meio foi ajustado para 5,4 e em seguida autoclavado a 121°C por 15 minutos. O inóculo foi feito de modo a obterem-se colônias isoladas, e a placa incubada a 28°C por 96 horas, até a observação de colônias características: *Candida dubliniensis* com coloração marrom-amarelada rugosa e presença de hifas periféricas.

2.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

A identificação molecular das espécies de *Candida* foi realizada pelo emprego da técnica de PCR. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados são espécie-específicos e foram desenhados com base nas regiões ITS (*Internal transcribed spacer*) 1 e 2 do gene rRNA (ácido ribonucléico ribossômico) (LI et al., 2003) (Tabela 1).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na identificação de *Candida* spp.

Espécie	Sequência (5` - 3`)	Tamanho do amplicon (pb)
<i>Candida albicans</i> (CA)	TCA ACT TGT CAC ACC AGA TTA TT	402
<i>Candida tropicalis</i> (CT)	AAG AAT TTA ACG TGG AAA CTT A	149
<i>Candida parapsilosis</i> (CP)	GGC GGA GTA TAA ACT AAT GGATAG	126
<i>Candida glabrata</i> (CGL)	CAC GAC TCG ACA CTT TCT AAT T	632
<i>Candida krusei</i> (CK)	GAT TTA GTA CTA CAC TGC GTG A	475
(ITS4) (oligonucleotídeo universal reverso)	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	

* pb: pares de bases

2.3.1 PCR

O DNA utilizado nas reações de PCR foi obtido diretamente a partir de células de colônias isoladas em meio Saboraud ágar dextrose (Difco). Com a ajuda de uma ponteira esterilizada, uma pequena quantidade de células foi colocada no tubo de reação.

Na reação de amplificação foram utilizados para cada amostra 0,5µL do oligonucleotídeo iniciador (20pmol/µL) espécie-específico, 0,5µL do oligonucleotídeo iniciador ITS4 (20pmol/µL) (Tabela 1), 0,8µL de desoxinucleotídeos 2,5µM (dATP, dCTP, dTTP e dGTP) (Invitrogen), 0,2µL de Taq polimerase 5U/µL (Invitrogen) juntamente com 2µL do tampão (10x) e 0,6µL de cloreto de magnésio MgCL₂ 50mM/mL, completando-se um volume final de 20µL de reação com água bidestilada.

Todas as amplificações foram realizadas em termociclador (Eppendorf, Mastercycle gradiente). O ciclo inicial de amplificação foi de 5 minutos a 96°C, seguido de 34 ciclos de: 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, ao final dos 34 ciclos houve mais 5 minutos a temperatura de 72°C para assim encerrar a reação.

A visualização dos produtos de amplificação foi realizada através de eletroforese em gel de agarose (1.4%). Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídeo, observado sob luz ultravioleta e as imagens dos géis foram capturadas empregando o sistema Digi-Doc (Amersham-Pharmacia). O resultado foi positivo considerando a ocorrência de um único amplicon de tamanho predito para cada espécie (Tabela 1).

3. Resultados e Discussão

Durante o período de estudo foi obtido um total de 270 amostras clínicas de *Candida* spp. de pacientes do HU. Estas amostras foram obtidas de urina (n=156), sangue (n=40), mucosas (n=54) e lesões superficiais (n=20) (Tabela 2).

A identificação presuntiva das amostras foi realizada empregando-se o meio CHROMagar® Candida que permite, segundo o fabricante, a identificação de três espécies: *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Neste estudo foi também possível diferenciar colônias de *C. glabrata* (colônias de coloração violeta escuro com bordas esbranquiçadas), como descrito por alguns autores (PFALLER et al., 1996; HOSPENTHAL et al., 2002).

Para estas espécies, os dados obtidos na identificação presuntiva foram 100% concordantes com a identificação molecular. Resultados semelhantes quanto à concordância entre identificação presuntiva e molecular de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* foram obtidos por Furlaneto-Maia et al. (2007, 2008). No entanto, a identificação presuntiva pelo emprego de CHROMagar® Candida tem apresentado limitações. Araujo et al. (2005) relatou discordância na identificação de *C. tropicalis* empregando-se este meio e métodos convencionais. Além disso, alguns autores têm ainda relatado a ocorrência de identificação errônea quando do emprego do meio CHROMagar® Candida (WILLINGER et al., 2001; SAUNTE et al., 2005; SIVAKUMAR et al., 2008), com ocorrência de colônias de colorações atípicas, inclusive para amostras de *C. albicans*.

No presente trabalho, o emprego de PCR e oligonucleotídeos espécie-específico (5'-GGCGGAGTATAAACTAATGGATAG-3') permitiu ainda a identificação de amostras de *C. parapsilosis*, o que não havia sido possível pelo emprego de CHROMagar® Candida. Somado a isto, a identificação molecular foi otimizada possibilitando a análise direta a partir de células advindas de colônias crescidas em meio Saboraud, sem necessidade prévia de extração de DNA genômico, aumentando a praticidade e a rapidez na identificação. Isso pôde ser confirmado em teste realizado comparando-se a identificação molecular feita diretamente da colônia com o DNA extraído das espécies a serem identificadas (Figura 1).

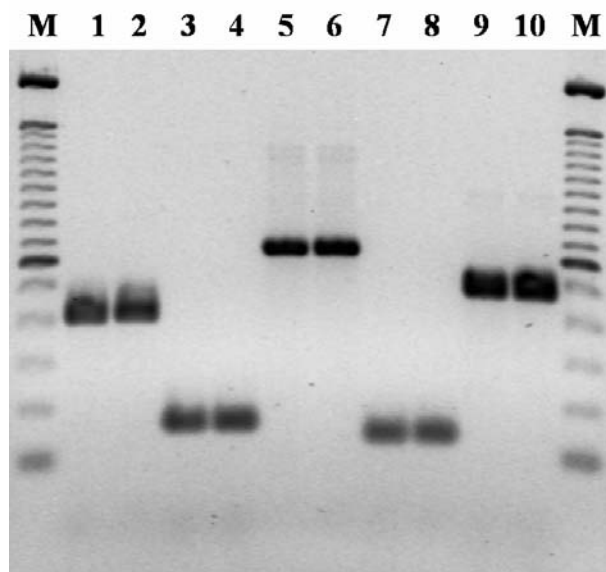


Figura 1 – Teste dos oligonucleotídeos. M – Marcador 1Kb, 1- *C. albicans* DNA, 2 - *C. albicans* colônia, 3 - *C. tropicalis* DNA, 4 - *C. tropicalis* colônia, 5 - *C. glabrata* DNA, 6 - *C. glabrata* colônia, 7 - *C. parapsilosis* DNA, 8 - *C. parapsilosis* colônia, 9 - *C. krusei* DNA, 10 - *C. krusei* colônia.

Do total das amostras analisadas, *C. albicans* correspondeu a 37,4%, sendo e a maioria dos isolados corresponderam a espécies de *Candida* não-*albicans*. Deste total, 05 amostras (1,85%) não foram identificadas ao nível de espécie (Tabela 2). Empregando-se o meio diferencial ágar - tabaco foi possível identificar 01 amostra de *C. dubliniensis*.

Quando da emergência de candidíases, a espécie *C. albicans*, representava índices superiores a 80% do total de isolados, sendo as demais espécies designadas como *Candida* não-*albicans* (BANERJEE et al., 1991; BECK-SAGUE et al., 1993; DEBUSK et al., 1994). Porém, o desenvolvimento de metodologias de identificação e diagnóstico microbiológico e a emergência de infecções causadas pelas demais espécies do gênero *Candida*, tem revelado mudança nesse perfil. Mais de 17 diferentes espécies de *Candida* tem sido relatada como agente etiológico de infecções em humanos (HAZEN, 1995; PFALLER; DIEKEMA, 2004). Entretanto mais de 90% das infecções invasivas são atribuídas a cinco espécies, sendo estas, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (PFALLER; DIEKEMA, 2004; REX; PFALLER, 2002; SPELLBERG et al., 2006).

Nossos dados demonstraram que a frequência de ocorrência das diferentes espécies variou com o sítio anatômico de isolamento. Nas amostras de

urina a maior freqüência foi de *C. albicans* (46%), seguida de *C. tropicalis* (35%) que prevaleceu entre as espécies de *Candida* não-*albicans*, já em amostras de sangue *C. tropicalis* ocorreu em maior freqüência (32,5%) seguido de *C. albicans* (25%) e *C. parapsilosis* (22,5%). Em amostras isoladas de mucosas a espécie prevalente foi *C. parapsilosis* (52%) seguida de *C. albicans*. Já em amostras obtidas de lesões superficiais *C. parapsilosis* foi a espécie predominantemente isolada (45%) seguida de *C. tropicalis* (30%). *C. krusei* foi observada em amostras de sangue (5%) e urina (1,4%) com uma freqüência de 1,5% do número total de amostras (Tabela 2). *C. krusei* presente na urina mesmo que com baixa freqüência é um dado bem relevante já que essa espécie é normalmente encontrada causando infecções sistêmicas em paciente com doenças malignas (IWEN et al., 1995).

Em estudo realizado com amostras clínicas de um laboratório particular de Análises Clínicas de Londrina, foi também possível evidenciar que a prevalência de espécies de *Candida* depende do sítio anatômico de isolamento (FURLANETO-MAIA et al., 2007). Segundo estes autores, em amostras obtidas de raspado de pele e unha, também houve predomínio de espécies de *Candida* não-*albicans*, particularmente *C. krusei* e *C. glabrata*.

Já em trabalho realizado por Crocco et al. (2004) na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, no período de 1999 a 2001, observou-se prevalência de *C. albicans* (76%) entre as amostras provenientes de lesões superficiais. Além disso, estes autores relataram prevalência de *C. krusei* (20%) dentre as não-*albicans* isoladas destas lesões.

No presente estudo, quanto às amostras isoladas de mucosas, foi observada maior prevalência de *C. parapsilosis*, diferentemente do observado por Crocco et al. (2004), que descreveram maior prevalência de *C. albicans*. *C. parapsilosis* é um patógeno exógeno que pode ser encontrado na pele ou na superfície de mucosas (HOBSON, 2003; CLARK et al., 2004), possuindo uma notória habilidade para formar biofilmes em cateteres ou em outros dispositivos implantáveis (BRANCHINI et al., 1994; CLARK et al., 2004; FRIDKIN, 2005).

Tabela 2 – Número de isolados de *Candida* spp. de pacientes do Hospital Universitário de Londrina (HU) nos diferentes sítios anatômicos e distribuição das espécies em relação ao sítio anatômico de isolamento.

Sítio de isolamento	Espécies de <i>Candida</i>						
	<i>C.albicans</i>	<i>C.tropicalis</i>	<i>C.parapsilosis</i>	<i>C.glabrata</i>	<i>C.krusei</i>	<i>C.dublinsiensis</i>	<i>Candida</i> sp.
Urina	72* (46)	55 (35)	07 (4.5)	19 (12.4)	02 (1.4)	01 (0.7)	-
Sangue	10 (25)	13 (32.5)	09 (22.5)	02 (5)	02 (5)	-	04 (10)
Mucosas	16 (29.5)	10 (18.5)	28 (52)	-	-	-	-
Lesões superficiais	03 (15)	06 (30)	09 (45)	01 (5)	-	-	01 (5)
Total	101 (37.4)	84 (31)	53 (19.6)	22 (8.15)	04 (1.5)	01 (0.5)	05 (1.85)

* Número de amostras obtidas nos diferentes sítios anatômicos; valores em parênteses correspondem a % de amostras num mesmo sítio anatômico.

Da mesma forma que o observado no presente trabalho, estudos envolvendo episódios de candidemia no Brasil, tem revelado a prevalência de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, dentre as espécies não-*albicans* (COLOMBO et al., 2003, 2006; ANTUNES et al., 2004; AQUINO et al., 2005; RUIZ et al., 2005).

Quanto às amostras isoladas de episódios de candidúria, foi observada predominância de não-*albicans* (54%). Este resultado corrobora com os dados da literatura (FEBRÉ et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2001; KOBAYASHI et al., 2004). Kobayashi et al. (2004) analisaram amostras de urina provenientes de pacientes do Hospital de Urgências de Goiânia, e também observaram, como nós, maior prevalência de *C. tropicalis* (22,2%) dentre as espécies não-*albicans*. Dados semelhantes foram obtidos por Oliveira et al. (2001). Já em trabalho realizado por Febré et al. (1999) compreendendo pacientes internados em UTI em um hospital na cidade de São Paulo, a espécie não-*albicans* predominante foi *C. glabrata* (30,7%).

Neste estudo, uma das amostras de candidúria foi identificada como *C. dubliniensis*. Esta espécie tem sido considerada emergente, cujas características morfológicas e bioquímicas são muito semelhantes a *C. albicans*. Esta nova espécie foi descrita inicialmente na Irlanda, sendo observada na cavidade oral de 17 a 35% dos pacientes HIV/AIDS positivos (SULLIVAN et al., 1998). Em estudo realizado com 548 amostras de leveduras armazenadas na banco de leveduras do Laboratório Especial de Micologia da UNIFESP (Universidade Federal de São Paulo), verificou-se que 2,0% das amostras originalmente identificadas como *C. albicans* eram *C. dubliniensis* (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). Atualmente, ainda são raros os casos de doenças sistêmicas relacionadas a esta espécie, sendo a maior parte dos casos associados a infecções de mucosa oral (KRCMERY et al., 2002; ALVES et al., 2006).

Muitos autores relatam que a incidência cada vez maior de candidíases e a distribuição das diferentes espécies nos diferentes sítios anatômicos estaria relacionada à fatores de risco, ou ainda à determinadas características dos pacientes tais como, sexo e idade, além da unidade de internação. Como observado na Tabela 3, nos episódios de candidemia ocorreu predominância de pacientes do sexo masculino, corroborando com dados da literatura (COLOMBO et al., 2006; AQUINO et al., 2005). A faixa etária predominante foi de neonatos (35%), seguido de pacientes idosos (≥ 61 anos) (Tabela 3). Destes pacientes, 85% estavam internados em UTI, incluindo UTI neonatal (35%).

Os dados que mais se destacaram foi a alta frequência de candidemia em neonatos (85%), comparativamente ao observado em estudo realizado por Aquino et al. (2005), cuja frequência foi de 8,4%, e a alta frequência de pacientes internados em UTIs (85%) comparativamente ao descrito por outros autores (COLOMBO et al., 2006; AQUINO et al., 2005).

Quanto às amostras isoladas de urina, o sexo não foi um fator discriminatório, como relatado por alguns autores, que observaram prevalência no sexo feminino (KOBAYASHI et al., 2004; FEBRÉ et al., 1999).

Tabela 3 – Características relacionadas aos pacientes internados no HU de Londrina com candidíases em relação aos diferentes sítios anatómicos de isolamento.

Características/No. Pacientes (%)				
Variável	Sítios de isolamento (Nº. pacientes)			
	Urina (n=156)	Sangue (n=40)	Mucosas (n=54)	Lesões superficiais (pele/unha) (n=20)
Sexo				
Masculino	(54.5) ^a	(40)	(53.7)	(28.6)
Feminino	(45.5)	(25)	(46.3)	(71.4)
Idade				
	≤1-18 (10)	Neonatos (35)	5 – 18 (6.5)	38 – 61 (43)
	19 – 35 (20.5)	≤1 - 18 (10)	27 – 60 (25.8)	≥ 61 (57)
	36 – 60 (25.5)	19 - 35 (15)	≥ 61 (67.7)	
	≥ 61 (44)	36 - 60 (17.5)		
		≥ 61 (22.55)		
Localização				
	UTI Adulto (84)	UTI Adulto (50)	ND	ND
	Hospitalizado (16)	UTI Neonato (35)		
		Pediatria (5)		
		Outros (10)		

^a porcentagem de pacientes; ND – não determinado

Pode-se observar que ocorreu predominância de isolamento em pacientes com idade avançada (44%), com prevalência de *C. albicans* e *C. tropicalis* assim como relatado por Kobayashi et al. (2004) e Colondner et al. (2008).

Do total de amostras, 84% foram isoladas de pacientes hospitalizados em UTIs. Esse fato é evidente nos estudos acerca de candidúria, que em sua maioria são realizados somente com amostras provenientes de pacientes internados em unidades de terapia intensiva.

Tanto amostras isoladas de mucosas quanto de lesões superficiais ocorreu predominância em pacientes de faixa etária ≥ 61 . Além disso, o isolamento de amostras de lesões superficiais foi predominante em pacientes do sexo feminino. Estes dados concordam com os descritos por Crocco et al. (2004).

Os dados obtidos neste trabalho, que representa o primeiro estudo de frequência de espécies de *Candida* no HU de Londrina (PR) Brasil, fornecem subsídios à práticas adequadas de terapia e profilaxia, além de possibilitar estudos comparativos com dados de outras regiões brasileiras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, S.; KHAN, Z.; MUSTAFA, S.A.; KHAN, U.Z. Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection and biochemical methods for species identification. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.2483-2489, 2002.
- ALMIRANTE, B.; RODRÍGUEZ, D.; PARK, B.J.; CUENCA-ESTRELLA, M.; PLANES, A.M.; ALMELA, M.; MENSA, J.; SANCHEZ, F.; AYATS, J.; GIMENEZ, M.; SABALLS, P.; FRIDKIN, S.K.; MORGAN, J.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; WARNOCK, D.W.; PAHISSA, A. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 1829-1835, 2005.
- ALVES, S.H.; DA MATTA, D.A.; AZEVEDO, A.C.; LORETO, E.S.; BOFF, E.; SANTURIO, J.M.; GUARRO, J. *In vitro* activities of new and conventional antimycotics against fluconazole-susceptible and non-susceptible Brazilian *Candida* spp. **Mycoses**, v.49, p.220-225, 2006.
- ANTUNES, A.G.V.; PASQUALOTTO, A.C.; DIAZ, M.C. AZEVEDO, P.A. SEVERO, L.C. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, p. 239-241, 2004.
- AQUINO, V.R.; LUNARDI, L.W.; GOLDANI, L.Z.; BARTH, A.L. Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in southern Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.9, p.411-418, 2005.
- ARAÚJO, C.R.; MIRANDA, K.C.; PASSOS, X.S. Identificação das leveduras do gênero *Candida* por métodos manuais convencionais e pelo método cromógeno CHROMagar™ *Candida*. , **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, p. 37-42, 2005.
- BANERJEE, S.N.; EMORI, T.G.; CULVER, T.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 in the United States, 1980–1989. National Nosocomial Infections Surveillance System. **American Journal of Medicine**, v. 91, p. 86-89, 1991.
- BAUTISTA-MUÑOZ, C.; BOLDO, X.M.; VILLA-TANAKA, L.; HERNÁNDEZ-RODRIGUEZ, C. Identification of *Candida* spp. by Randomly Amplified Polymorphic DNA analysis and differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*

by direct PCR methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.1, p.414-420, 2003.

BECK-SAGUE, C.; JARVIS, W.R. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980–1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. **Journal of Infection Disease**, v.167, p.1247–1251, 1993.

BERNAL S.; MARTIN M.E.; GARCIA M.; ALLER.; MARTINEZ M.A.; GUTIERREZ M.J. Evaluation of CHROMagar Candia medium for the isolation and presumptive identification of species of *Candida* of clinical importance. **Diagnosis and Microbiology Infectious Diseases**, v.24, p.201-204, 1996.

BRANCHINI, M.L.; PFALLER, M.A.; RHINE-CHALBERG, J.; FREMPONG, T.; ISENBERG, H.D. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p.452-456, 1994.

CARVALHO, A.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; MARTINS, M.L.; PINA-VAZ, C. RODRIGUES, A.G.; LUDOVICO, P.; RODRIGUES, F. Multiples PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species. **Medical Mycology**, v.45, n.07, p.619-627, 2007.

CIRAK, M.Y.; KALKANCII, A.; KUSTIMUR, S. Use of molecular methods in identification of *Candida* species and evaluation of fluconazole resistance. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n.08, p.1027-1032, 2003.

CLARK, T.A.; SLAVINSKI, S.A.; MORGAN, J.; LOTT, T.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; BRANDT, M.E.; WEBB, R.M.; CARRIER, M.; FLOWERS, R.H.; FRIDKEN, S.K.; HAJJEH, R.A. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.4468-4472, 2004.

COLODNER R.; NURI Y.; CHAZAN B.; RAZ R. Community-acquired and hospital-acquired candiduria: comparison of prevalence and clinical characteristics. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.27, p.301-305, 2008.

COLOMBO A.L.; GUIMARÃES T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, p.599-607, 2003.

COLOMBO AL, PERFECT J, DINUBILE M, BARTIZAL K, MOTYL M, HICKS P, LUPINACCI R, SABLE C, KARTSONIS N. Global distribution and outcomes for *Candida* species causing invasive candidiasis: results from an international randomized double-blind study of caspofungin versus amphotericin B for the treatment of invasive candidiasis. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 22, p. 470-474, 2003.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. The Brazilian network candidemia study. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 2816–2823, 2006.

COOKE, V.M.; MILES, R.J.; PRICE MIDGLEY, G.; KHAMRI, W.; RICHARDSON, A.C. New chromogenic agar medium for the identification of *Candida* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.3622-3627, 2002.

CROCCO, E.I.; MÍMICA, M.J.L.; MURAMATU, H.L. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica in vitro: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.79, p.689-697, 2004.

DANIEL, C.R.I.; GUPTA, A.K.; DANIEL, M.P. *Candida* infection of the nail: role of *Candida* as a primary or secondary pathogen. **Dermatology**, v.37, p.904-907, 1998.

DEBUSK, C.H.; DAOUD, R.; THIRUMOORTHY, M.C.; WILSON, F.M.; KHATIB, R. Candidemia: current epidemiologic characteristics and a long-term follow-up of the survivors. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v.26, p.697-703, 1994.

DIEKEMA, D.J.; MESSER, S.A.; BRUEGGEMANN, A.B.; COFFMAN, S.L.; DOERN, G.V.; HERWALDT, L.A.; PFALLER, M.A. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.1298-1302, 2002.

ERGON, M.C.; GÜLAY, Z. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from urine at an intensive care unit. **Mycoses**, v.48, p.126-131, 2004.

FEBRÉ, N.; SILVA, V.; MEDEIROS, E.A.S.; WEY, S.B.; COLOMBO, A.L.; FISCHMAN, O. Microbiological characteristics of yeasts isolated from urinary tracts of intensive care unit patients undergoing urinary catheterization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 1584-1586, 1999.

FRIDKIN, S.K. The changing face of fungal infections in health care settings. **Clinical Infectious Diseases**, v.41, p.1455-1460, 2005.

FURLANETO-MAIA, L.; SPECIAN, A.F.; WILNERZON, D.S.; OLIVEIRA, M.T.; FURLANETO, M.C. Estudo da incidência de amostras clínicas do gênero *Candida* isoladas de diverso sítios anatómicos. **Acta Scientiarum Health Sciences**, v.29, p. 33-37, 2007.

FURLANETO-MAIA, L.; SPECIAN, A.F.; BIZERRA, F.C.; OLIVEIRA, M.T.; FURLANETO, M.C. *In vitro* evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida* spp obtained from elderly healthy individuals. **Mycopathologia**, v. 166, p. 209-217, 2008.

GUIVER, M.; LEVI, K.; OPPENHEIM, B.A. Rapid identification os *Candida* species by TaqMan PCR. **Journal of Clinical Pathology**, v.54, n.05, p.362-366, 2001.

HAZEN, K.C. New and emerging yeast pathogens. **Clinical Microbiology. Reviews**, v.8, p.462-478, 1995.

HOBSON, R.P. The global epidemiology of invasive *Candida* infections— is the tide turning? **Journal of Hospital Infection**, v.55, p.159-168, 2003.

HOSPENTHAL, D.R.; MURRAY, C.K.; BECKIUS, M.L.; GREEN, J.A.; DOOLEY, D.P. Persistence of pigment production by yeast isolates grown on CHROMagar *Candida* media. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.4768-4770, 2002.

JEWTOCHOWICZ, V.M.; MUJICA, M.T.; BRUSCA, M.I.; SORDELLI, N.; MALZONE, M.C.; POLA, S.J.; IOVANNITTI, C.A.; ROSA A.C. Phenotypic and genotypic identification of *Candida dubliniensis* from subgingival sites in immunocompetent subjects in Argentina. **Oral Microbiology and Immunology**, v.23, n.06, p.505-509, 2008.

KHLIF, M.; SELLAMI, H.; SELLAMI, A.; MAKNI, F.; CHEIKHROUHO, F.; CHELLY, H.; BOUAZIZ, M.; AYADI, A. Detection and identification of *Candida* sp. By PCR in candidemia diagnosis. **Journal de Mycology Medicale**, v.17, n.04, p.256-260, 2007.

KOBAYASHI, C.C.; FERNANDES, O.F.; MIRANDA, K.C.; EFIGÊNIA, S.D.; SILVA, M.R.R. Candiduria in hospital patients: a study prospective. **Mycopathologia**, v.158, p.49-52, 2004.

- KRCMERY, V.; BARNES, A.J. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungemia: pathogenicity and antifungal resistance. **Journal of Hospital Infection**, v.50, p.243-260, 2002.
- LAU, A.; SORRELL, T.C.; CHEN, S.; STANLEY, K.; IREDELL, J.; HALLIDAY, C. Multiplex tandem PCR: a novel platform for rapid detection and identification of fungal pathogens from blood culture specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.09, p.3021-3027, 2008.
- LEHMANN, P.F.; LIN, D.; LASKER, B.A. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p.3249-3254, 1992.
- LI, Y.L.; LEAW, S.N.; CHEN, J.H.; CHANG, H.C. Rapid identification of yeasts commonly found in positive blood cultures by amplification of the internal transcribed spacer regions 1 and 2. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.22, p.693-696, 2003.
- LIGUORI, G.; DI ONOFRIO, V.; LUCARIELLO, A.; GALLE, F.; SIGNORIELLO, G.; COLELLA, G.; D'AMORA, M.; ROSSANO, F. Oral candidiasis: a comparison between conventional methods and multiplex polymerase chain reaction for species identification. **Oral Microbiology and Immunology**, v.24, n.01, p.76-78, 2009.
- LUQUE, A.G.; BIASSOLI, M.S.; TOSELLO, M.E.; BINOLFI, A.; LUPO, S.; MAGARO, H.M. Oral yeast carriage in HIV-infected and non-infected populations in Rosario, Argentina. **Mycoses**, v.52, n.01, p.53-59, 2009.
- LUNDSTROM, T. e SOBEL, J. Nosocomial candiduria: a review. **Clinical and Infectious Diseases**, v. 32, p. 1602-1607, 2001.
- LUO, G.Z.; MITCHELL, T.G. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.08, p.2860-2865, 2002.
- MELO, A.S.A.; DE ALMEIDA, L.P.; COLOMBO, A.L. Evolutionary distances and identification of *Candida* species in clinical isolates by Randomly amplified Polymorphic DNA (RAPD). **Mycopathologia**, v.2, p.357-368, 1998.

NAZZAL, D.; YASIN, S.; ABU-ELTEEN, K. A rapid PCR-based method for identification of four important *Candida* species. **New Microbiologica**, v.28, n.03, p.245-250, 2005.

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

PASSOS , X. S.; COSTA, C. R.; ARAÚJO C. R.; NASCIMENTO, E. S.; SOUZA, L. K. H.; FERNANDES, O. F. L.; SALES, W. S.; SILVA, M. R. R. Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* spp. Bloodstream isolates from a Brazilian tertiary care hospital. **Mycopathologia**, v.163, p.145-151, 2007.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p.4419–4431, 2004.

PFALLER, M. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D. J. *in vitro* susceptibilities of *Candida* spp. to caspofungin: four years of global surveillance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44 (3), p. 760–763, 2006.

REX, J. H.; PFALLER, M.A. Has antifungal susceptibility testing come of age? **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, p.982–989, 2002.

REX, J.H.; WALSH, T.J.; SOBEL, J.D. Practice guidelines for the treatment of candidiases. **Journal of Infectious Diseases**, v.30, p.662-678, 2000.

ROWEN, J.L.; TATE, J.M.; PASSARELL, L.; MEGINNIS, M.R. *Candida* isolates from neonates: frequency of misidentification and reduced susceptibility to fluconazole. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.3735-3737, 1999.

RUIZ, L.S.; SUGIZAKI, M.F.; MONTELLI, A.C.; MATSUMOTO, F.E.; PIRES, M.F.C.; DA SILVA, B.C.M.; SILVA, E.H.; GANDRA, R.F.; GONÇALVES DA SILVA, E.; AULER; M.E.; PAULA, C.R. Fungemia by yeasts in Brazil: occurrence and phenotypic study of strains isolated at the Public Hospital, Botucatu, São Paulo. **Journal of Medical Mycology**, v.15, n.01, p.13-21, 2005.

SAUNTE, D.M.; KLINGSPOR, L.; JALAL, S.; ARNAU, J.; ARENDRUP, M.C. Four cases of *Candida albicans* infections with isolates developing pink colonies on CHROMagar *Candida* plates. **Mycoses**, vol 48, p. 378-381, 2005.

SCHOFIELD, D.A.; WESTWATER, C.; WARNER, T.; NICHOLAS, P.J.; PAULLING, E.E.; BALISH, E. Hydrolytic gene expression during oroesophageal and gastric candidiasis in immunocompetent and immunodeficient gnotobiotic mice. **The Journal of Infectious Diseases**, v.188, p.591–599, 2003.

SIVAKUMAR V.G.; SHANKAR P.; NALINA K.; MENON T. Use of CHROMagar in differentiation of common species of *Candida*. **Mycopathologia**, 2008, DOI: 10.1007/s11046-008-9149-5.

SPELLBERG, B.J.; FILLER, S.G.; EDWARDS JR, J.E. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, p.244–251, 2006.

STEFFAN, P.; VASQUEZ, J.A.; BOIKOV, D.; XU, C.; SOBEL, J.D.; AKINS, R.A. Identification of *Candida* species by Randomly Amplified Polymorphic DNA fingerprinting of colony lysates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.2031-2039, 1997.

SULLIVAN, D.; COLEMAN, D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.329-334, 1998.

WILLINGER, B.; HILLOWOTH, C.; SELITSCH, B.; MANAFI, M. Performance of Candida ID, a new chromogenic medium for presumptive identification of *Candida* species, in comparison to CHROMagar Candida. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.3793-3795, 2001.

WROBLEWSKA, M.M.; SWOBODA-KOPEC, E.; ROKOSZ, A.; KRAWCZYK, E.; MARCHEL, H.; LUCZAK, M. Epidemiology of clinical isolates of *Candida albicans* and their susceptibility to triazoles. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.20, p.472-475, 2002.

YONG, P.V.C.; CHONG, P.P.; LAU, L.Y.; YEOH, R.S.C.; JAMAL, F. Molecular identification of *Candida orthopsilosis* isolated from blood culture. **Mycopathologia**, v.165, n.02, p.81-87, 2008.

ZIA U. K.; SUHAIL A.; EIMAN M.; RACHEL C. Tobacco agar, a new medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.4796-4798, 2004.

PARTE II

DISTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DE AMOSTRAS CLÍNICAS DE *Candida* spp. ISOLADAS DE SANGUE DE PACIENTES DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE LONDRINA /PR/ BRASIL

1 INTRODUÇÃO

O número de indivíduos predispostos a infecções causadas por espécies do gênero *Candida* tem aumentado significativamente nas últimas décadas, seja pela emergência de doenças que causam diretamente ou indiretamente imunossupressão, ou por outros fatores predisponentes que desencadeiam desequilíbrios fisiológicos favoráveis à proliferação do fungo (PFALLER et al., 2005, 2006). Além disso, o emprego crescente de técnicas invasivas utilizadas nas unidades de terapia intensiva tem conduzido a uma maior sobrevivência de indivíduos gravemente acometidos, mas igualmente tem contribuído para um aumento na vulnerabilidade a infecções fúngicas (RICHARDSON et al., 2003).

Entre as infecções invasivas causadas pelo gênero *Candida*, vale salientar a relevância clínica dos casos de infecção de corrente sanguínea, complicação esta conhecida como candidemia ou candidíase hematogênica.

A ocorrência de casos de candidemia em hospitais terciários aumentou substancialmente nas últimas duas décadas em diferentes partes do mundo. Espécies de *Candida* tem sido a quarta causa mais comum de infecções nosocomiais hematogênicas nos Estados Unidos (PFALLER et al., 1998) e Canadá (KARLOWSKY et al., 1997). Dados semelhantes foram observados em estudo recente realizado em Portugal (COSTA-de-OLIVEIRA et al., 2008).

No Brasil, estudos relacionados a episódios de candidemia ainda são escassos e limitados a algumas regiões, incluindo região sudeste (MATSUMOTO et al., 2001; COLOMBO et al., 2003, 2006; RUIZ et al., 2005; DA MATTA et al. 2007), região Nordeste (Fortaleza) (MEDRANO et al., 2006) Centro-

Oeste: Goiânia (PASSOS et al., 2007) e Mato Grosso do Sul (CHANG et al., 2008). Em relação à região Sul, até o momento, somente três estudos foram relatados (ANTUNES et al., 2004; AQUINO et al., 2005; COLOMBO et al., 2006). Estes trabalhos revelam que apesar do índice de isolamento de *C. albicans* ainda ser alto na maioria dos casos, a mudança de perfil de espécies tem sido cada vez mais evidente, onde as espécies não-*albicans* tem ocorrido em alta frequência. No geral, a ordem das cinco espécies mais isoladas tem sido *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*.

No entanto, a epidemiologia de espécies do gênero *Candida* varia de acordo com as características da região geográfica e do grupo de indivíduos estudados, assim como características particulares referentes a cada espécie. Por exemplo, episódios de candidemia causados por *C. parapsilosis* estão associados com cateteres vasculares e nutrição parenteral (CLARK et al., 2004), já os causados por *C. tropicalis* estão associados com câncer e neutropenia (NUCCI; COLOMBO, 2007), e a exposição prévia a antifúngicos da classe dos azoles está relacionada a fungemias causadas por *C. krusei* e *C. glabrata* (TRICK et al., 2002).

Outros fatores, como a faixa etária dos pacientes também influencia a distribuição das espécies deste gênero. Alta taxa de incidência de *C. parapsilosis* em neonatos tem sido relatada (LEVY et al., 1998; FILIOTI et al., 2007) e de *C. glabrata* e *C. tropicalis* em pacientes adultos e de idades avançada (MORRELL et al., 2005; BASSETI et al., 2006; COLOMBO et al., 2006; NUCCI; COLOMBO, 2007).

A eficácia da terapêutica antifúngica contra as infecções invasivas depende diretamente da precocidade do diagnóstico, assim como do estado imunológico do paciente. Devido às dificuldades diagnósticas, muitas vezes a introdução terapêutica específica ocorre tardiamente, contribuindo para os altos índices de mortalidade.

As espécies de *Candida* mais comumente associadas a episódios de candidemia apresentam diferentes susceptibilidades aos antifúngicos utilizados na terapia clínica. A existência destas diferenças espécies-específicas na suscetibilidade das infecções causadas por algumas espécies não-*albicans* faz com que os estudos de identificação dos isolados em infecções nosocomiais se tornem de grande importância (MELO et al., 1998; ERGON; GÜLAY, 2004).

Os estudos relacionados a episódios de candidemia, no Brasil, têm revelado altos níveis de susceptibilidade das amostras aos antifúngicos, tanto aos da

classe dos azoles quanto à anfotericina B (GODOY et al., 2003; COLOMBO et al., 2007; PASSOS et al., 2007; DA MATTA et al., 2007).

No estado do Paraná, particularmente no Hospital Universitário (HU) de Londrina / PR/ Brasil, até o momento nenhum estudo foi conduzido referente a episódios de candidemia.

1.1 OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos:

- identificação, por métodos moleculares, de amostras de *Candida* spp. isoladas de sangue de pacientes do HU, no período de julho de 2004 a julho de 2007;
- levantamento de características relacionadas aos pacientes quanto a sexo, idade, unidade de internação e doenças de base;
- levantamento dos fatores de risco mais comumente envolvidos nos episódios de candidemia;
- determinação da sensibilidade das amostras aos antifúngicos: fluconazol, itraconazol, cetoconazol e anfotericina B.
- genotipagem de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* para avaliar possíveis correlações quanto à resistência aos antifúngicos testados.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Neste trabalho foram analisadas 40 amostras clínicas de *Candida* spp. provenientes do sangue de pacientes internados em unidades do HU.

2.1.1 Levantamento de dados

Características relacionadas aos pacientes quanto ao sexo, idade, unidade de internação, doenças subjacentes, período de internação e fatores de risco foram levantadas segundo banco de dados fornecidos pelo HU com autorização prévia.

2.2 IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

2.2.1 Identificação presuntiva

A identificação presuntiva das amostras foi realizada empregando-se o meio de cultivo cromogênico diferencial CHROMagar® *Candida* (CHROMagar, Company Ltd., Paris France) (BERNAL et al., 1996; COOKE et al., 2002), conforme instrução do fabricante. Neste meio, após 48 horas de incubação a 37°C, *C. albicans* originou colônias de coloração verde, *C. tropicalis* colônias azuis metálico, *C. krusei* colônias rosa rugosas e as colônias de coloração branca a violeta foram classificadas como *Candida* sp.

2.2.2 Identificação molecular

A identificação molecular das espécies de *Candida* foi realizada pelo emprego da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de PCR são espécie-específicos e foram desenhados com base nas regiões ITS (*Internal transcribed spacer*) 1 e 2 do gene rRNA (ácido ribonucléico ribossômico) (LI et al., 2003) (Tabela 1).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na identificação de *Candida* spp.

Espécie	Sequência (5' - 3')	Tamanho do amplicon (pb)
<i>Candida albicans</i> (CA)	TCA ACT TGT CAC ACC AGA TTA TT	402
<i>Candida tropicalis</i> (CT)	AAG AAT TTA ACG TGG AAA CTT A	149
<i>Candida parapsilosis</i> (CP)	GGC GGA GTA TAA ACT AAT GGATAG	126
<i>Candida glabrata</i> (CGL)	CAC GAC TCG ACA CTT TCT AAT T	632
<i>Candida krusei</i> (CK)	GAT TTA GTA CTA CAC TGC GTG A	475
(ITS4) (oligonucleotídeo universal reverso)	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	

* pb: pares de bases

2.2.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA utilizado nas reações de PCR foi obtido diretamente a partir de células de colônias isoladas em meio Saboraud ágar dextrose (Difco), sem necessidade de extração de DNA genômico.

Na reação de amplificação foram utilizados para cada amostra 0,5µL do oligonucleotídeo iniciador (20pmol/µL) espécie-específico, 0,5µL do

oligonucleotídeo iniciador ITS4 (20pmol/ μ L) (Tabela 1), 0,8 μ L de desoxinucleotídeos 2,5 μ M (dATP, dCTP, d TTP e dGTP) (Invitrogen), 0,2 μ L de Taq polimerase 5U/ μ L (Invitrogen) juntamente com 2 μ L do tampão (10x) e 0,6 μ L de cloreto de magnésio MgCL₂ 50mM/mL, completando-se um volume final de 20 μ L de reação com água bidestilada.

Todas as amplificações foram realizadas em termociclador (Eppendorf, Mastercycle gradiente). O ciclo inicial de amplificação foi de 5 minutos a 96°C, seguido de 34 ciclos de: 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, ao final dos 34 ciclos houve mais 5 minutos a temperatura de 72°C para assim encerrar a reação.

A visualização dos produtos de amplificação foi realizada através de eletroforese em gel de agarose (1.4%). Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídeo, observado sob luz ultravioleta e as imagens dos géis foram capturadas empregando o sistema Digi-Doc (Amersham-Pharmacia). O resultado foi positivo considerando a ocorrência de um único amplicon de tamanho predito para cada espécie (Tabela 1).

2.3 FUNGIGRAMA

Para o teste de sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos foi empregada a técnica de difusão em ágar (E-test) (AB Biodisk, Suécia). Este teste baseia-se na utilização de fitas contendo antifúngico que permite a liberação de um gradiente determinado de concentração. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada conforme instruções do fabricante como a menor concentração do antifúngico na qual a borda da zona de inibição intercepta a escala da fita.

O meio de cultivo utilizado foi o RPMI 1640 (SIGMA) contendo L-glutamina, sem bicarbonato, acrescido de glicose (2%) e ágar (1,5%) (Difco), e pH ajustado para 7.0, que foi distribuído em placas de petri (90 mm) até completar uma espessura de aproximadamente 04 mm. Das amostras a serem analisadas, foi feita uma suspensão celular (2,5 x 10⁶ células/ml) em salina, a partir de colônias isoladas. Com auxílio de um “swab” estéril, o inóculo foi feito a partir dessa suspensão celular

em três direções, sendo o procedimento repetido uma vez. Por fim, a fita de E-test foi colocada utilizando-se um pinça esterilizada, e a placa incubada a 35°C. As leituras foram realizadas após 24 e 48 horas de incubação.

A interpretação dos resultados de sensibilidade foi feita de acordo com as instruções do fabricante. Amostras com CIMs entre 16 e 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para FLU (Fluconazol) e 0.25 - 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ITR (Itraconazol) ou KET (Cetoconazol) foram considerados susceptíveis - dose dependentes. Amostras com CIMs $\leq 8 \mu\text{g mL}^{-1}$ para FLU, $\leq 0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$ para ITR e KET e $\leq 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ para AmB (Anfotericina B) foram consideradas susceptíveis. Amostras com CIMs $\geq 64 \mu\text{g mL}^{-1}$ para FLU, $\geq 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ para ITR ou KET e $\geq 2 \mu\text{g mL}^{-1}$ para AmB foram consideradas resistentes. Além da variação do Cim para cada isolado os dados foram também apresentados em CIM50 e CIM90, que correspondem à concentração de cada antifúngico capaz de inibir 50% ou 90% dos isolados, respectivamente.

2.4 GENOTIPAGEM

A caracterização genotípica das amostras foi realizada empregando-se a análise do polimorfismo do DNA amplificado ao acaso, denominada RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) (WILLIAMS et al., 1995). Esta análise envolve a amplificação simultânea de vários locos anônimos do genoma utilizando vários princípios de seqüência arbitrária.

2.4.1 Isolamento de DNA genômico

A extração de DNA genômico foi realizada a partir de 3 mL de cultivo em meio ágar Sabouraud dextrose líquido, por 18 horas a 28°C à 180 rpm. Após este período, as células foram sedimentadas por centrifugação (1200 rpm por 05 minutos), lavadas pela adição de 1,5 mL de água destilada esterilizada e centrifugadas novamente nas mesmas condições. Esse procedimento foi repetido

duas vezes. Em seguida, as células foram ressuspensas em 500 μ L de tampão de lise (10 mM Tris pH 8.0 contendo 2% triton-X-100, SDS 1%, 100 mM NaCl e 01 mM EDTA), e 500 μ L de fenol, na presença de 3 pérolas de vidro. A mistura foi agitada vigorosamente com o auxílio de um agitador tipo vórtex por 3 minutos, seguida de centrifugação por 10 minutos a 12.000 rpm. A fase aquosa foi removida para um novo tubo.

O lisado resultante foi desproteinizado pela adição de 500 μ L de clorofane (fenol – clorofórmio- álcool isoamílico) (25:24:1), seguido de centrifugação (10 minutos a 12.000 rpm). À fase aquosa resultante foi adicionada 500 μ L de clorofil (clorofórmio- álcool isoamílico 24:1), seguido de nova centrifugação (10 minutos a 12.000 rpm). Por fim, à fase aquosa foi adicionado 1 mL de etanol absoluto gelado. O tubo foi mantido a -20°C por 24 h para a precipitação do DNA. Após esse período, procedeu-se nova centrifugação (por 20 minutos a 11.000 rpm). O sedimento (DNA) foi lavado pela adição de etanol (70%). Após seco a temperatura ambiente o DNA foi ressuspensão em 20 μ L de água bidestilada esterilizada. O DNA foi mantido a -20°C.

2.4.2 Reações de RAPD

Para a análise de RAPD foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores OPX11, OPAM 04, OPAM 07 e OPE 06 (Operon Technologies Inc.).

As reações foram realizadas em um volume final de 25 μ L contendo 1 μ L de DNA molde (5ng/mL); 0,25 mmol de cada desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, d TTP e dGTP) (Invitrogen); 1 U de Taq polimerase (Invitrogen) com o tampão de reação apropriado, 2,5 mM de MgCl₂ e 2,5 mM do oligonucleotídeos iniciador. Todas as amplificações foram realizadas em termociclador (Eppendorf, Mastercycle gradiente). O ciclo inicial de amplificação foi de 4 minutos a 92°C, seguido de 40 ciclos de: 92°C por 40 segundos, 40°C por 1,5 minutos e 72°C por 2 minutos, ao final dos 40 ciclos houve mais 5 minutos a temperatura de 72°C para assim encerrar a reação. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,4%).

2.4.3 Interpretação do padrão de bandas

Após a corrida eletroforética, os géis foram corados com brometo de etídeo, observados sob luz ultravioleta e as imagens capturadas empregando o sistema Digi-Doc (Amersham-Pharmacia). O perfil de bandas de cada amostra foi analisado visualmente. As bandas foram representadas como presentes (1) ou ausentes (0). Estes dados permitiram a construção de matrizes de valores binários que foram analisadas utilizando o conjunto de programas estatísticos NTSYS-pc versão 1.0 (Applied Biostatistics, Inc.).

As relações genéticas (coeficientes de similaridade) foram calculadas através do coeficiente de Dice (S_{AB}). S_{AB} foi calculado pela fórmula: $S_{AB} = 2n_{11}/(2n_{11} + n_{01} + n_{10})$, onde n_{11} representa o número de bandas compartilhadas por duas amostras, n_{01} representa o número de bandas exclusivas para a primeira amostra e n_{10} representa o número de bandas exclusivas para segunda amostra. Um valor de S_{AB} de 1,00 e 0,99 representa o mesmo genótipo, valores S_{AB} entre 0,80 e 0,99 representam amostras relacionadas clonalmente (altamente similares, mas não idênticas) e valores de S_{AB} inferiores a 0,80 representam amostras distintas.

Os dendogramas baseados nos valores de S_{AB} foram gerados pelo método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method With Arithmetical Averages).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 40 amostras de sangue positivo para *Candida* foi analisado, sendo 16 provenientes de indivíduos do sexo masculino (40%), 10 do sexo feminino (25%) e 14 amostras de recém-nascidos prematuros (35%) (Tabela 2). A idade dos pacientes variou de 07 meses até 79 anos, com destaque para a frequência dos pacientes com idade ≥ 61 (22,5%). Quanto aos recém - nascidos prematuros, os episódios de candidemia foram observados após alguns dias de vida. Durante os episódios de candidemia, 50% dos pacientes estavam internados na unidade de terapia intensiva de adulto (UTI), 14 (35%) internados na unidade de terapia intensiva para neonatos (UTIN), 02 (5%) na unidade básica de pediatria, 02 (5%) na clínica médica, e 06 estavam internados em outras unidades básicas do hospital (Tabela 2). Ao longo dos episódios de candidemia observados, em um dos pacientes a identificação da infecção ocorreu num período de 48 horas de hospitalização, indicando portanto infecção comunidade - adquirida, enquanto que para os demais pacientes a infecção foi considerada nosocomial.

Tabela 2 – Características dos pacientes com candidemia (n=40).

Características	Pacientes n=40 (%)	
Sexo		
Masculino/Feminino	16/10	(40/25)
Idade (anos)		
Neonatos	14	(35)
≤1 - 18	04	(10)
19 - 35	06	(15)
36 - 60	07	(17,5)
≥ 61	09	(22,5)
Localização		
UTI Adulto	20	(50)
UTI neonatal	14	(35)
Pediatria	02	(05)
Outros	04	(10)

Doença Subjacente/Condição		
Prematuros	14	(35)
Trauma	06	(15)
Doenças do trato gastrointestinal	05	(12,5)
Diabetes mellitus	05	(12,5)
Doenças cardiovasculares	03	(7,5)
Câncer	03	(7,5)
Leucemia	02	(0,5)
Doenças genéticas	02	(0,5)
Doença de Chagas	02	(0,5)
Doença neurológica	01	(2,5)
Doença auto-imune	01	(2,5)
Doença do trato respiratório	01	(2,5)
HIV	01	(2,5)

Em levantamento realizado em 11 hospitais terciários das regiões sul, sudeste e central do Brasil, compreendendo um total de 712 episódios de candidemia, foi observado que 56% dos pacientes eram do sexo masculino e que 40% das crianças incluídas no estudo eram recém-nascidos prematuros. Ainda dos 693 pacientes hospitalizados, 46% estavam em UTI incluindo a UTI para neonatos (COLOMBO et al., 2006). A maioria dos estudos baseiam-se em amostras clínicas de pacientes em UTIs (BLUMBERG et al., 2001; MUÑOZ et al., 2000; OSTROSKY-ZEICHNER, 2004; OSTROSKY-ZEICHNER, 2006), fator esse que segundo Pfaller e Diekema (2007), causa ao paciente maior exposição a fatores de risco adicionais.

Os casos de candidemia foram ainda distribuídos de acordo com 13 tipos de doenças de base ou de condições pré-existentes (Tabela 2). Neste contexto, a prematuridade dos recém nascidos (35%) foi um das características predominante, seguida de trauma 15%, doença gastrointestinal e diabetes mellitus com 12,5 % cada. Trauma corresponde a acidentes com objetos perfuro cortantes, acidentes de trânsito, queimaduras ou acidentes em geral. Pacientes com câncer ou doenças hematológicas corresponderam a somente 7,5% e 5%, respectivamente.

Segundo Chapman (2003), as infecções por *Candida* têm se tornado um problema crescente nas UTIs para neonatos, particularmente para neonatos prematuros. O alto índice de neonatos prematuros com candidemia positivo pode ser devido a vários fatores, dentre os quais, por apresentarem uma aumentada permeabilidade na pele e membranas mucosas, desenvolvimento ainda imaturo do sistema imunológico e baixo peso (ROWEN, 1994).

Nosso estudo revelou que nos casos de candidemia em neonatos prematuros, as espécies mais frequentemente isoladas foram *C. parapsilosis* (42,8%), seguida de *C. albicans* (35,7%). Estes dados corroboram com os observados por RICHARDSON (2005). Trabalhos recentes também têm revelado a predominância de *C. parapsilosis* como agente causando candidemia em neonatos (AL-SWEIH et al., 2008; MALAFIEJ et al., 2009).

Como observado na Tabela 2, os episódios de candidemia também estavam relacionados à ocorrência de traumas (15%), sendo essa condição bastante variável dependendo da população atendida no hospital e também do tipo de acidente que o paciente veio a sofrer. A ruptura das barreiras teciduais humanas, advindas de lesões de pele ou membranas mucosas, constitui o princípio básico para o estabelecimento de processos infecciosos por *Candida*. Pappas et al. (2003) e Boo et al. (2005) encontraram 8% e 7,9% dos pacientes acometidos por algum tipo de trauma na triagem dos isolados clínicos.

Doenças do trato gastrointestinal e diabetes mellitus (12,5%), foram a terceira doença de base/condição mais comumente encontrada nos pacientes envolvidos no presente estudo. Acerca das doenças do trato gastrointestinal, é claro seu relacionamento com as infecções por *Candida*. Acredita-se que a maioria dos casos de candidemia seja adquirida por via endógena, pela translocação do patógeno através do trato gastrointestinal, local onde há rica colonização por *Candida* spp em até 70% da população normal. Em estudo realizado por Costa-de-Oliveira et al. (2007) foi observada alta porcentagem de pacientes (45%) com patologias gastrointestinais. Já Aquino et al. (2005) observaram que 10,7% dos pacientes apresentavam tais patologias.

Quanto ao percentual de pacientes acometidos por diabetes mellitus, os valores obtidos neste estudo são semelhantes aos observados por Colombo et al. (2006). Segundo Nucci e Colombo (2007), diabetes mellitus foi a segunda doença de base mais comumente encontrada em pacientes com candidemia causada por *C. tropicalis*, sendo somente a sexta causa em pacientes com candidemia causada por *C. albicans* (17%). Diferentemente, nossos dados revelaram que 80% dos pacientes com candidemia causada por *C. albicans* apresentavam diabetes mellitus. Já *C. tropicalis* foi a espécie predominantemente encontrada nas doenças auto-imunes e anomalias genéticas, estando presente em 40% dos casos de pacientes que foram internados com algum tipo de trauma.

Quanto à distribuição das espécies nos episódios de candidemia, ocorreu prevalência de *C. tropicalis* (32,5%), seguida de *C. albicans* (25%) e *C. parapsilosis* (22,5%). As demais espécies ocorreram em menores frequências (Tabela 3).

Tabela 3 – Distribuição das espécies nos episódios de candidemia (n=40).

Espécie	Nº de amostras (%)*
<i>C. tropicalis</i>	13 (32.5)
<i>C. albicans</i>	10 (25)
<i>C. parapsilosis</i>	09 (22.5)
<i>Candida</i> sp	04 (10)
<i>C. glabrata</i>	02 (05)
<i>C. krusei</i>	02 (05)

* porcentagem em relação ao úmero total de amostras

Embora *C. albicans* tem sido relatada como a espécie predominante na maioria dos episódios de candidemia, inclusive no Brasil, as taxas de candidemia causadas por espécies de *Candida* não-*albicans* vem aumentando (TRICK et al., 2002; COLOMBO et al., 2003; ANTUNES et al., 2004; OQUINO et al., 2005; RUIZ et al., 2005; COLOMBO et al., 2006). Além disso, dois trabalhos realizados em hospitais brasileiros revelaram a predominância de *C. parapsilosis* como causa de candidemia (MATSUMOTO et al., 2001; MEDRANO et al., 2006).

Da mesma forma que o observado no presente estudo, dentre as espécies não-*albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* tem sido predominantes em episódios de candidemia em hospitais brasileiros (COLOMBO et al., 2003,2006; ANTUNES et al., 2004; AQUINO et al., 2005; RUIZ et al., 2005; PASSOS et al., 2007). No entanto, outras espécies têm sido também relatadas por estes autores, embora em frequências menores, a exemplo de *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae*.

Já os estudos realizados na Europa e na América do Norte têm relatado um baixo isolamento de *C. tropicalis* em episódios de candidemia (2- 10%

na Europa e 10 - 12% nos Estados Unidos e Canadá) (ASMUNDSOTTIR et al., 2002; DIEKEMA et al., 2002; GARBINO et al., 2002; ALONSO-VALLE et al., 2003; MARCHETTI et al., 2004; ALMIRANTE et al., 2005; MARTIN et al., 2005). A taxa de isolamento de *C. parapsilosis* em episódios de candidemia também tem sido variável nos Estados Unidos (07 a 21%) e na Europa (6,9 a 30%) (MARTIN et al., 2005; DIEKEMA et al., 2002; KAO et al., 1999).

Ainda acerca da distribuição das espécies, a razão pela qual candidemia causada por *C. glabrata* é incomum no Brasil não é claramente conhecida. Assim como *C. glabrata*, a frequência de *C. krusei* em nossos estudos foi baixa (5%), comparativamente ao observado por outros autores (AQUINO et al. 2005; COLOMBO et al., 2006). Essa espécie tem-se mostrado como um patógeno hospitalar ocasional, particularmente, em pacientes portadores de doenças hematológicas malignas e/ou submetidos a transplante de medula óssea (IWEN et al., 1995). Alguns autores relataram aumento de fungemias causadas por *C. krusei* em pacientes neutropênicos expostos prolongamente ao fluconazol (WINGARD, 1995). A baixa ocorrência de *C. krusei* no HU pode ser devida as características dos pacientes relacionados aos episódios de candidemia: baixa frequência de neutropênicos (7,5%) e portadores de doenças hematológicas malignas (0,5%), além da inexistência de unidades para transplantes de medula óssea no hospital. Um dos pacientes com fungemia causada por *C. krusei* era HIV positivo, e o outro apresentava um grave abscesso cervical. Contudo, apesar de ter sido baixa a ocorrência dessa espécie, é importante destacar sua importância clínica principalmente no que se diz respeito ao tratamento.

Neste estudo, vários fatores de risco parecem estar relacionados aos episódios de candidemia, destacando-se o uso prévio de antibiótico, onde dos presentes 100% faziam uso de uma ou mais drogas amplamente utilizadas em ambiente hospitalar e o uso de cateter venoso central (Intra-Cath®, Heckman®, Port-a-Cath®, Swang ganz, *duplo ou triplo lúmen*) em 87,5% dos pacientes (Tabela 4). Podemos ainda destacar fatores como entubação orotraqueal em 28 pacientes (70%), nutrição parenteral (75%) e presença de cateter urinário (57,5%). Cirurgia gastrointestinal foi relatada em 18 pacientes (45%) (Tabela 4). Alguns destes fatores, particularmente o uso prévio de antibióticos (FRASER et al., 1992; AQUINO et al., 2005; PASSOS et al., 2007) e uso de cateter venoso central (PEMÁN et al., 2005; PASSOS et al., 2007) foram também freqüentes em casos de

candidemias. Intervenção cirúrgica, particularmente abdominal, também se tem destacado (AQUINO et al., 2005; COLOMBO et al., 2006; COSTA-de-OLIVEIRA et al., 2007).

Adicionalmente, a presença de *Candida* foi também observada em outros sítios anatômicos, particularmente urina (12,5%) e cavidade oral (7,5%), além de cateter venoso (12,5%) (Tabela 4). Em um dos pacientes (2,5%), foi detectada a presença de *Candida* na secreção de ferida.

O significado clínico da presença de *Candida* spp. na urina é controverso. A candidúria é usualmente considerada um problema terapêutico desde que a presença da levedura pode indicar contaminação ou mesmo colonização (LUSDSTROM, 2001). No entanto, candidúria pode ser um primeiro sinal que predispõe a ocorrência de infecção (OKULICZ et al., 2007), sendo inclusive considerado um fator predisponente à candidemia (revisado por TOYA et al., 2007).

Acerca do período de internação dos 40 pacientes considerados neste estudo, pode-se observar que ocorreu predominância de longos períodos de internação (72,5% acima de 30 dias) (Tabela 4). Em nosso estudo, a duração média de hospitalização foi de 60 dias e a média de hospitalização entre o dia da internação e a coleta da 1^o amostra de sangue positiva foi de 22 dias. Costa-de-Oliveira et al. (2007) encontraram uma média de 39 dias de internação e uma média de 19 dias do dia da internação e o dia da coleta da 1^o amostra de sangue positiva. Péman et al. (2005) sugeriram que a incidência de candidemia pode ser aumentada nos pacientes com hospitalização prolongada mais que por outros fatores de risco.

Tabela 4 – Fatores de risco correlacionados com a ocorrência de candidemia.

Fatores de Risco (n=40)	Total (%)	<i>C.albicans</i>	<i>C.tropicalis</i>	<i>C.parapsilosis</i>	<i>C.glabrata</i>	<i>C.krusei</i>	<i>C.sp</i>
Uso prévio de antibiótico	40 (100)	10	13	07	02	02	04
Acesso venoso	35 (87,5)	08	12	08	02	02	02
Nutrição parenteral	30 (75)	09	10	06	01	02	02
Ventilação mecânica	28 (70)	07	11	05	01	02	02
Cateter urinário	23 (57,5)	08	08	04	-	02	01
Cirurgia abdominal prévia	18 (45)	06	05	03	-	02	02
Cirurgia não-abdominal	04 (10)	02	02	-	-	-	-
Neutropenia	03 (7,5)	-	02	01	-	-	-
Quimioterapia	02 (5)	-	01	01	-	-	-
Uso de corticóides	01 (2,5)	-	01	-	-	-	-
Outros sítios/materiais							
<i>Candida.spp</i>							
Candidúria	05 (12,5)	04	01	-	-	-	-
Cateter	05 (12,5)	03	01	-	-	-	01
Cavidade oral	03 (7,5)	01	-	01	-	01	-
Período de internação (dias)							
00 - 20	08 (20)	01	03	02	01	01	-
21 - 29	03 (7,5)	01	01	-	-	-	01
30 - 59	11 (27,5)	01	05	04	-	01	-
60 - ≥ 90	18 (45)	07	04	03	01	-	03

Do total de 22 pacientes (55%) que foram a óbito, não foi observada prevalência de nenhuma espécie nem de um fator de risco específico. Entre as diferentes espécies encontradas destacamos que 100% dos pacientes infectados com *C. krusei* foram a óbito. Já 80% dos pacientes infectados com *C. albicans*, 50% com *C. glabrata* e 46,1% com *C. tropicalis* também foram a óbito.

Foi observado que procedimentos comuns e padrão de muitos hospitais como o uso de antibiótico e de cateter são fatores de risco comumente encontrados nos episódios de candidemia estudados. Portanto, evidencia-se ainda mais a importância de estudos sobre o levantamento das espécies de *Candida* e o perfil de susceptibilidade das mesmas para que assim possa ocorrer controle das infecções, e que condutas possam ser tomadas acerca do diagnóstico rápido e preciso, o estabelecimento de tratamento eficaz e principalmente a adoção de medidas profiláticas nos pacientes com hospitalização prolongada e debilidade do sistema imunológico.

Foi realizado o teste de susceptibilidade *in vitro* para quatro antifúngicos mais comumente empregados na terapia clínica. Os resultados obtidos revelaram variações entre as diferentes espécies e entre amostras da mesma espécie quanto à susceptibilidade aos antifúngicos testados (Tabela 5).

A maioria das amostras de *C. albicans* foi susceptível aos antifúngicos testados. O mesmo foi observado para amostras de *C. tropicalis*, embora, 23% das amostras apresentassem resistência ao itraconazol 7,7% resistência a anfotericina B e ao cetoconazol. Alta susceptibilidade também foi evidenciada por outros estudos realizados no Brasil, principalmente no que se diz respeito ao fluconazol (AQUINO et al., 2005; COLOMBO et al., 2006; COLOMBO et al., 2007; DA MATTA et al., 2007).

As amostras de *C. parapsilosis* foram 100% susceptíveis ao fluconazol, cetoconazol e anfotericina B sendo que 11% destas foram resistentes ao itraconazol (Tabela 5).

Neste estudo, o maior nível de resistência foi observado para *C. krusei*. Aquino et al. (2005) relataram que 67% de amostras de *C. krusei* apresentaram resistência ao fluconazol e 33% SDD (susceptível-dose dependente). Perfil semelhante foi observado para amostras de *C. glabrata*, exceto pelo fato de que 100% das amostras foram susceptíveis a anfotericina B. Este fato já foi descrito

previamente por outros autores (REX et al., 1995; NGUYEN et al., 1998; KRCMERY, 1998).

Tabela 5 – Susceptibilidade *in vitro* de 40 amostras isoladas de sangue

Espécies (No.)	Antifúngico	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			% S ^a /SDD ^b /R ^c
		Variação	50%	90%	
<i>C. albicans</i> (10)	AmB	0,047 - 0,38	0,19	0,38	100/-/-
	FLU	0,125 - 0,50	0,19	0,25	100/-/-
	ITR	0,032 - 0,50	0,38	0,50	40/60/-
	KET	0,008 - 0,064	0,016	0,023	100/-/-
<i>C. tropicalis</i> (13)	AmB	0,38 - 02	0,50	0,75	92,3/-/7,7
	FLU	0,125 - 1,5	0,75	1,5	100/-/-
	ITR	0,016 - 02	0,047	01	69,3/7,7/23
	KET	0,003 - 0,50	0,006	0,032	92,3/-/7,7
<i>C. parapsilosis</i> (09)	AmB	0,25 - 03	01	02	100/-/-
	FLU	0,25 - 01	0,50	0,75	100/-/-
	ITR	$\leq 0,002$ - 01	0,19	0,50	44/45/11
	KET	0,012 - 0,094	0,047	0,064	100/-/-
<i>C. glabrata</i> (02)	AmB	0,25 - 0,38	0,25	0,38	100/-/-
	FLU	24 - ≥ 64	24	≥ 64	-/50/50
	ITR	≥ 32	≥ 32	≥ 32	-/-/100
	KET	03 - 04	03	04	-/-/100
<i>C. krusei</i> (02)	AmB	02	02	02	-/-/100
	FLU	≥ 256	≥ 256	≥ 256	-/-/100
	ITR	4-6	04	6	-/-/100
	KET	04	04	04	-/-/100
<i>Candida</i> sp. (04)	AmB	0,064 - 0,75	0,125	0,75	100/-/-
	FLU	1,5 - ≥ 256	03	96	50/-/50
	ITR	0,25 - 2	1,5	02	-/25/75
	KET	0,032 - 0,125	0,125	0,125	100/-/-

S^a: Isolados susceptíveis; SDD^b: Isolados susceptível-dose dependente; R^c: Isolados resistentes aos antifúngicos testados. FLU (fluconazol), ITR (itraconazol), KET (cetoconazol) e AmB (anfotericina B).

Na genotipagem foram utilizados 09 isolados clínicos de *C. parapsilosis*, 13 de *C. tropicalis* e 10 de *C. albicans*. O número de bandas obtido foi específico para cada oligonucleotídeo e para cada espécie analisada, sendo analisados no total 158 *loci*.

A análise dos perfis eletroforéticos de RAPD (Figura 1), permitiu a obtenção de dados para a construção da matriz de similaridade genética e construção do dendrograma de similaridade genética (Figura 2).

O dendrograma de similaridade genética obtido com os quatro oligonucleotídeos gerou três agrupamentos, um correspondente a cada espécie, com valores de coeficientes de similaridade (S_{ABS}) de 86%, 43% e 34% para *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. albicans*, respectivamente.

O primeiro agrupamento compreendeu os isolados de *C. parapsilosis*, desses 56% apresentaram menor susceptibilidade ao itraconazol, 45% dose dependência (SDD) e 11% resistência (R), dessas 80% se reuniram em um único agrupamento com aproximadamente 93% de similaridade genética (isolados altamente semelhantes mais não idênticas).

O segundo agrupamento compreendeu as amostras de *C. tropicalis*, entre as quais 31% apresentaram menor suscetibilidade (23% R e 8% SDD) ao itraconazol. Dentre as resistentes, 67% se uniram em um agrupamento com aproximadamente 78% de similaridade genética.

Por fim, o terceiro agrupamento compreendeu as amostras de *C. albicans*, dessas 60% apresentaram SDD ao itraconazol, sendo que todas se uniram em um único agrupamento com aproximadamente 81% de similaridade genética.

A análise dos coeficientes de similaridade possibilitou identificar, dentro de cada espécie, agrupamentos de linhagens menos susceptíveis e até mesmo resistentes ao itraconazol provenientes de hospedeiros distintos, todavia, com pequena diversidade genética entre elas. Resultado semelhante foi encontrado por Xu et al. (2000) com a respeito às origens de resistência ao fluconazol em *C. albicans*, onde alguns dos isolados possuíam genótipos com elevada similaridade quando não idênticos.

Segundo este autor, o agrupamento genético de linhagens resistentes provenientes de pacientes distintos é intrigante, tendo em vista que grande parte das evidências suportam a idéia de que linhagens resistentes surgem de forma independente, existindo duas possíveis explicações para este

agrupamento: (i) todas as linhagens resistentes no agrupamento surgiram independentemente a partir de uma linhagem previamente resistente e similar geneticamente, e/ou (ii) a mutação para a resistência surgiu uma única vez e se tornou amplamente distribuída (disseminação clonal). Jain et al. (2001) obtiveram um padrão homogêneo de bandejamento para linhagens de *C. albicans* sensíveis ao fluconazol, o mesmo não sendo observado para as linhagens resistentes.

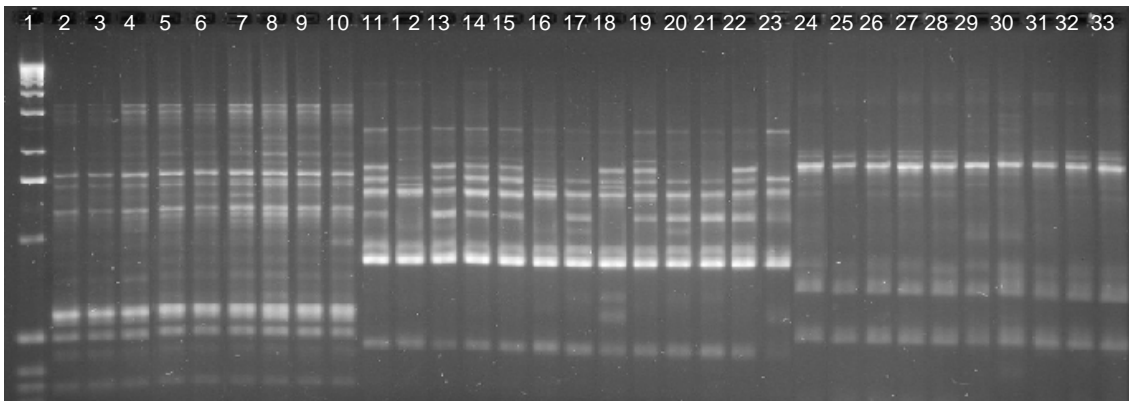


Figura 1 – Padrão de RAPD obtido com o emprego do oligonucleotídeo OPE6. Linha 1 marcador 1 Kb. Linhas 2-10 *C. parapsilosis*, linhas 11-23 *C. tropicalis*, linhas 24-33 *C. albicans*.

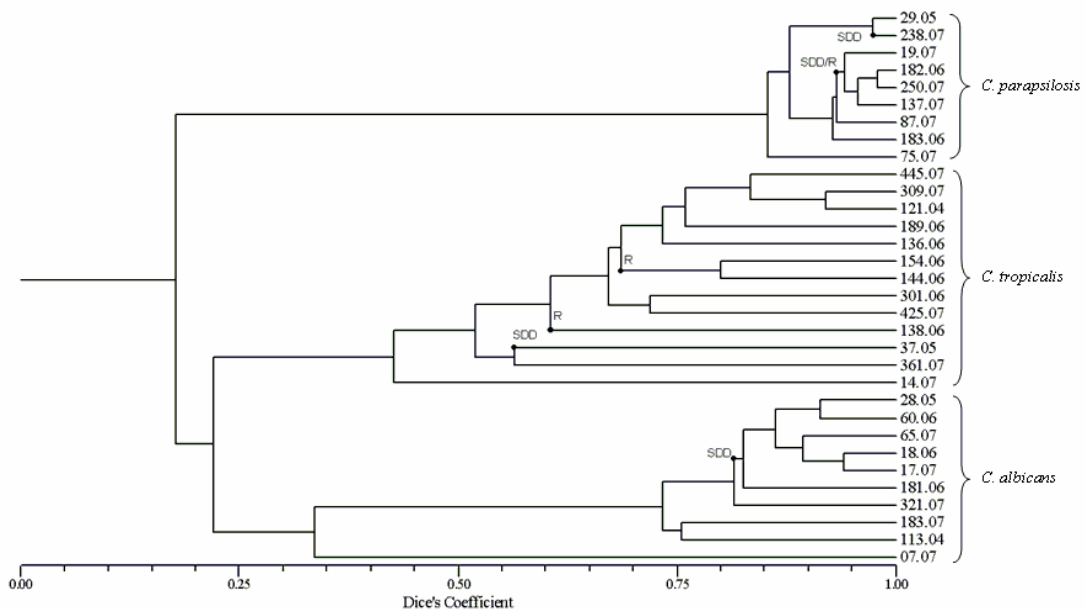


Figura 2 – Dendrograma de similaridade genética das amostras de *Candida* spp. Valores de 0 a 1 na barra inferior representam a similaridade genética (valores em porcentagens). R = resistência; SDD = suscetibilidade dose dependente.

3 CONCLUSÕES

PARTE I

- A identificação molecular pela técnica de PCR e a utilização de DNA obtido a partir de células de colônia são efetivos na identificação de espécies de *Candida*;
- Há uma importante frequência no isolamento de diferentes espécies de *Candida* no HU;
- Há variação na frequência e distribuição de espécies de *Candida* nos diferentes sítios de isolamento no HU;
- A prematuridade seguida de pacientes idosos é um fator de destaque em relação ao desenvolvimento de candidíase;
- Pacientes internados em UTI é um importante fator predisponente na ocorrência de candidúria;

PARTE II

- O tempo prolongado de internação em UTI é um fator chave no estabelecimento de infecções causadas por *Candida*;
- Os fatores de risco relatados parecem estar efetivamente associados aos episódios de candidemia;
- Houve uma clara diferença no perfil de susceptibilidade entre as diferentes espécies de *Candida*;
- *C. krusei* é uma espécie que foi isolada no HU, em diferentes sítios e apresenta uma importante resistência a todos os antifúngicos testados;
- Há uma correlação entre a menor susceptibilidade, e o perfil genotípico de cada espécie submetida à genotipagem em relação ao itraconazol;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMIRANTE, B.; RODRÍGUEZ, D.; PARK, B.J.; CUENCA-ESTRELLA, M.; PLANES, A.M.; ALMELA, M.; MENSA, J.; SANCHEZ, F.; AYATS, J.; GIMENEZ, M.; SABALLS, P.; FRIDKIN, S.K.; MORGAN, J.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; WARNOCK, D.W.; PAHISSA, A. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 1829–1835, 2005.

ALONSO-VALLE, H.; ACHA, O.; GARCIA-PALOMO, J.D.; FARINAS-ALVAREZ, C.; FERNANDEZ-MAZARRASA, C.; FARINAS, M.C. Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology and factors influencing mortality. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.22, p.254-257, 2003.

AL-SWEIH, N.; KHAN, Z.; KHAN, S.; DEVARAJAN, L.V. Neonatal candidemia in Kuwait: a 12-year study of risk factors, species spectrum and antifungal susceptibility. **Mycoses**, 2008. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2008.01637.x.

AMRUTKAR, P.P.; REGE, M.D.; CHEN, H.; LAROCCO, M.T.; GENTRY, L.O.; GAREY, K.W. Comparison of risk factors for candidemia versus bacteremia in hospitalized patients. **Infection**, v.35, n.06, p.322-327, 2006.

ANTUNES, A.G.V.; PASQUALOTTO, A.C.; DIAZ, M.C. AZEVEDO, P.A. SEVERO, L.C. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, p. 239-241, 2004.

AQUINO, V.R.; LUNARDI, L.W.; GOLDANI, L.Z.; BARTH, A.L. Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in southern Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.9, p.411-418, 2005.

ASMUNDSDOTTIR, L.R.; ERLENDSDOTTIR, H.; GOTTFREDSSON, M. Increasing incidence of candidemia: results from a 20-year nationwide study in Iceland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p.3489-3492, 2002.

BASSETTI, M.; RIGHI, E.; COSTA, A.; FASCE, R.; MOLINARI, M. P.; ROSSO, R.; PALLAVICINI, F. B.; VISCOLI, C. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. **BMC Infectious Diseases**, v.6, n.21, 2006.

BERNAL S.; MARTIN M.E.; GARCIA M.; ALLER.; MARTINEZ M.A.; GUTIERREZ M.J. Evaluation of CHROMagar Candia medium for the isolation and presumptive identification of species of *Candida* of clinical importance. **Diagnosis and Microbiology Infectious Diseases**, v.24, p.201-204, 1996.

BLUMBERG, H.M.; JARVIS, W.R.; SOUCIE, J.M.; EDWARDS, J.E.; PATTERSON, J.E.; PFALLER, M.A.; RANGEL-FRAUSTO, M.S.; RINALDI, M.G.; SAIMAN, L.; WIBLIN, R.T.; WENZEL, R.P. Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. **Clinical Infectious Disease**, v. 33, p.177–186, 2001.

BOO, T.W.; O'REILLY, B.; O'LEARY, J.; CRYAN, B. Candidemia in a Irish tertiary referral hospital: epidemiology and prognostic factors. **Mycoses**, v.48, p.251-259, 2005.

CHANG, M.R.; CORREIRA, F.P.; COSTA, L.C.; XAVIER, P.C.N.; PALHARES, D.B.; TAIRA, D.L.; PANIAGO, A.M.M.; PONTES, E.R.J.C.; MACHADO, V.E. *Candida* bloodstream infection: data from a teaching hospital in Mato Grosso do Sul. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, p. 265-268, 2008.

CHAPMAN, R.L. *Candida* infections in the neonate: Infectious diseases and immunization. **Current Opinion in Pediatrics**, v.15, n.01, p.97-102, 2003.

CLARK, T.A.; SLAVINSKI, S.A.; MORGAN, J.; LOYY, T.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; BRANDT, M.E., WEBB, R.M. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 4468-4472.

COLOMBO AL, PERFECT J, DINUBILE M, BARTIZAL K, MOTYL M, HICKS P, LUPINACCI R, SABLE C, KARTSONIS N. Global distribution and outcomes for *Candida* species causing invasive candidiasis: results from an international randomized double-blind study of caspofungin versus amphotericin B for the treatment of invasive candidiasis. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 22, p. 470-474, 2003.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. for the Brazilian Network Candidemia Study. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44 (8), p. 2816–2823, 2006.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L.R.B.F.; MONFARDINI, L.P.A.; CUNHA, A.K.B.; RADY, P.; ALVES, T.; ROSAS, R.C. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.38, n5, p.570-576, 2007.

COOKE, V.M.; MILES, R.J.; PRICE MIDGLEY, G.; KHAMRI, W.; RICHARDSON, A.C. New chromogenic agar medium for the identification of *Candida* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.3622-3627, 2002.

COSTA-de-OLIVEIRA, S.; PINA-VAZ, C.; MENDONÇA, D.; GONÇALVES RODRIGUES, A. A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, p. 365-374, 2008.

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: resulto f a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995 – 2003. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v57, p.399-404, 2007.

DIEKEMA, D.J.; MESSER, S.A.; BRUEGGEMANN, A.B.; COFFMAN, S.L.; DOERN, G.V.; HERWALDT, L.A.; PFALLER, M.A. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.1298-1302, 2002.

ERGON, M.C.; GÜLAY, Z. Molecular epidemiology pf *Candida* species isolated from urine at an intensive care unit. **Mycoses**, v.48, p.126-131, 2004.

FILIOTI, J.; SPIROGLOU, K.; PANTELIADIS, C.P.; ROILIDES, E. Invasive candidiasis in pediatric intensive care patients: epidemiology, risk factors, management and outcome. **Intensive Care Medicine**, v. 33, p. 1272-1283, 2007.

FRASER, V.J.; JONES, M.; DUNKEL, J.; STOFER, S.; MEDOFF, G.; DUNAGAN, W.C. Candidemia in a tertiary care hospital; epidemiology, risk factors and predictors of mortality. **Clinical of Infectious Disease**, v.15, p.414-421, 1992.

GARBINO, J.; KOLAROVA, L.; ROHNER, P.; LEW, D.; PICHNA, P.;PITTET, D. Secular trends of candidemia over 12 years in adult patients at a tertiary care hospital. **Medicine (Baltimore)**, v. 81, p.425-433, 2002.

GODOY, P.; TIRABOSCHI, I.N.; SEVERO, L.C.; BUSTAMANTE, B.; CALVO, B.; DA MATTA, D.A.; COLOMBO A.L. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. Bloodstream isolates from Latin American hospitals. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, p.401-405, 2003.

IWEN, P.C.; KELLY, D.M.; REED, E.C.; HINRICHS, S.H. Invasive infection due to *Candida krusei* in immunocompromised patients not treated with fluconazole. **Clinical Infectious Diseases**, v.20, p.342-347, 1995.

JAIN, P.; KHAN, Z.K.; BHATTACHARYA, E.; RANADE, S.A. Variation in random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles specific to fluconazole-resistant and sensitive of *Candida albicans*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.41, p.113-119, 2001.

KAO, A.S.; BRANDT, M.E.; PRUITT, W.R.; CONN, L.A.; PERKINS, B.A.; STEPHENS, D.S.; BAUGHMAN, W.S.; REINGOLD, A.L.; ROTHROCK, G.A.; PFALLER, M.A.; PINNER, R.W.; HAJJEH, R.A. The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. **Clinical Infectious Diseases**, v.29, p.1164-1170, 1999.

KARLOWSKY, J.A.; ZHANEL, G.G.; KLYM, K.A.; HOBAN, D.J.; KABANI, A.M. Candidemia in a Canadian tertiary care hospital from 1976 to 1996. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 28, p. 5-9, 1997.

KRCMERY, V. Jr. Risk factors and outcome of non-*albicans* candidemia: Report of 38 cases. **Acta Chemotherapy**, v.8, p.23-28, 1998.

LEVY, I.; RUBIN, L.G.; VASISHTHA, S.; TUCI, V.; SOOD, S.K. Emergence of *Candida parapsilosis* as a predominant species causing candidemia in children. **Clinical and Infectious Diseases**, v. 26, p. 1080-1088, 1998.

LUNDSTROM, T.; SOBEL, J. Nosocomial candidúria: A review. **Clinical Infectious Diseases**, v.32, p.1602–1607, 2001.

MALAFIEJ, E.; ADAMIEC, A.C.; TWORZYANSKA, U. Microbial profile and drug resistance of *Candida* strains isolated from the blood of children: an 11-year study. **Mycoses**, v. 52, p. 149-153, 2009.

MARTIN, D.; PERSAT, F.; PIENS, M.A.; PICOT, S. *Candida* species distribution in bloodstream cultures in Lyon, France, 1998–2001. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.24, p.329-333, 2005.

MARCHETTI, O.; BILLE, J.; FLUCKIGER, U.; EGGIMAN, P.; RUEF, C.; GARBINO, J.; CALANDRA, T.; GLAUSSER, M.P.; TAUBER, M.G.; PITTET, D. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. **Clinical Infectious Diseases**, v.38, p.311-320, 2004.

MATSUMOTO, F.E.; GANDRA, R.F.; RUIZ, L.S.; AULER, M.E.; MARQUES, S.A.V.; PIRES, M.F.C.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R. Yeasts isolated from blood and catheter in children from a Public Hospital of São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v.154, n.2, p.63-69, 2002.

MEDRANO, D.J.A.; BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A.; ROCHA, M.F.G.; RABENHORST, S.H.B.; SIDRIM, J.J.C. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.48, p.17-20, 2006.

MELO, A.S.A.; DE ALMEIDA, L.P.; COLOMBO, A.L. Evolutionary distances and identification of *Candida* species in clinical isolates by Randomly amplified Polymorphic DNA (RAPD). **Mycopathologia**, v.2, n.142, p.357-368, 1998.

MORRELL M., FRASER V. J., AND KOLLEF M. H. Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v.49, n.9, p. 3640–3645, 2005.

MUNOZ, P.; BURILLO, A.; BOUZA, E. Criteria used when initiating antifungal therapy against *Candida* spp. in the intensive care unit. **International Journal of Antimicrobials Agents**, v. 15, p.83–90, 2000.

NGUYEN, M.H.; CLANCY, C.J.; YU, V.L. Do *in vitro* susceptibility data predict the microbiologic response to amphotericin B? Results of a prospective study of patients with *Candida* fungemia. **Journal of Infectious Diseases**, v.177, p.425-430, 1998.

NUCCI, M. e COLOMBO, A.L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 58, p. 77-82, 2007.

OKULICZ, J.F.; RIVARD, R.G.; CONGER, N.G.; NGUYEN, M.X.; HOSPENTHAL, D.R. Primary isolation of *Candida* species from urine specimens using chromogenic medium. **Mycoses**, v.51, n.2, p.141-6, 2008.

OSTROSKY-ZEICHNER, L. Prophylaxis and treatment of invasive candidiasis in the intensive care setting. **European Journal Clinical of Microbiology and Infectious Disease**, v.23, p.739–744, 2004.

OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PAPPAS, L.G. Invasive candidiasis in the intensive care unit. **Critical Care Medicine**, v. 34, p.857–863, 2006.

PAPPAS, P.G.; REX, J.H.; LEE, J.; HAMILL, R.J.; LARSEN, R.A.; POWDERLY, W.; KAUFFMAN, C.A.; HYSLOP, N.; MANGINO, J.E.; CHAPMAN, S.; HOROWITZ, H.W.; EDWARDS, J.E.; DISMUKES, W.E. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. **Clinical Infectious Diseases**, v.37, p.634-643, 2003.

PASSOS, X. S.; COSTA, C. R.; ARAÚJO C. R.; NASCIMENTO, E. S.; SOUZA, L. K. H.; FERNANDES, O. F. L.; SALES, W. S.; SILVA, M. R. R. Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* spp. Bloodstream isolates from a Brazilian tertiary care hospital. **Mycopathologia**, v.163, p.145-151, 2007.

PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; GOBERNADO, M.; Spanish ECMM Working Group on Candidemia. Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from blood: results of a 2-year multicentre study in Spain. **European Journal Clinical of Microbiology and Infectious Disease**, v.24, p.23-30, 2005.

PFALLER, M.A.; JONES, R.N.; MESSER, S.A.; EDMOND, M.B.; WENZEL, R.P. National surveillance of nosocomial bloodstream infection due to *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE program. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, p. 327-332, 1998.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, n.01, p.133-163, 2007.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; RINALDI, M. G.; BARNES, R.; HU, B.; VESELOV, A. V.; TIRABOSCHI, N.; NAGY, E.; GIBBS, D. L.; and GLOBAL ANTIFUNGAL SURVEILLANCE GROUP. Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43 (12), p. 5848–5859, 2005.

PFALLER, M. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D. J. *in vitro* susceptibilities of *Candida* spp. to caspofungin: four years of global surveillance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44 (3), p. 760–763, 2006.

REX, J. H.; PFALLER, M.A.; BARRY, A.L.; NELSON, P.W.; WEBB, C.D. For the NIAID Mycoses Study group and the Candidemia Study Group: antifungal susceptibility testing of isolates from a randomized, multicenter trial of fluconazole versus amphotericin B as treatment of nonneutropenic patients with candidemia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.39, p.40-44, 1995.

RICHARDSON, M.D.; WARNOCK, D.W. Fungal infection; diagnosis and management, 3rd ed. **Oxford: Blackwell Publishing**, 2003.

RICHARDSON, M.D. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.56, p.5-11, 2005.

ROWEN, J.L.; TATE, J.M.; PASSARELL, L.; MEGINNIS, M.R. *Candida* isolates from neonates: frequency of misidentification and reduced susceptibility to fluconazole. *Journal of Clinical Microbiology*, v.45, p.3735-3737, 1999.

RUIZ, L.S.; SUGIZAKI, M.F.; MONTELLI, A.C.; MATSUMOTO, F.E.; PIRES, M.F.C.; DA SILVA, B.C.M.; SILVA, E.H.; GANDRA, R.F.; GONÇALVES DA SILVA, E.; AULER, M.E.; PAULA, C.R. Fungemia by yeasts in Brazil: occurrence and phenotypic study of strains isolated at the Public Hospital, Botucatu, São Paulo. *Journal of Medical Mycology*, v.15, n.01, p.13-21, 2005.

TRICK, W.E.; FRIDKIN, S.K.; EDWARDS, J.R.; HAJJEH, R.A.; GAYNES, R.P. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989–1999. *Clinical Infectious Diseases*, v.35, p.627-630, 2002.

TOYA, S.P.; SCHAUFNAGEL, D.E.; TZELEPIS, G.E. Candiduria in intensive care units: association with heavy colonization and candidaemia. *Journal of Hospital Infection*, v. 66, p. 201-206, 2007.

WILLIAMS, D.W.; WILSON, M.J.; LEWIS, M.A.O.; POTTS, A.J.C. Identification of *Candida* species by PCR and restriction fragment length polymorphism analyses of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, v.33, p.2476-2479, 1995.

WINGARD, J.R. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clinical Infectious Diseases*, v.20, p.115-125, 1995.

XU, J.; ADELA, R.R.; RYTAS, V.; THOMAS, G.M. Clonal and spontaneous origins of fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.38, n.03, p.1214-1220, 2000.