

**CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA E SUSCEPTIBILIDADE
A ANTIFÚNGICOS DE LEVEDURAS ISOLADAS DE
INFECÇÃO HOSPITALAR**

PAULO MURILLO NEUFELD

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Orientação: Dra. Márcia dos Santos Lazéra
Dra. Manuela da Silva

Rio de Janeiro
2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA E SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DE LEVEDURAS ISOLADAS DE INFECÇÃO HOSPITALAR

AUTOR: PAULO MURILLO NEUFELD

Tese submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor.

Aprovado:

_____ (INCQS/FIOCRUZ)
Dr. Victor Augustus Marin

_____ (IOC/FIOCRUZ)
Dra Cintia de Moraes Borba

_____ (Faculdade de Farmácia/UFRJ)
Dr. Alexandre dos Santos Pyrrho

_____ (IOC/FIOCRUZ)
Orientadora - Dra. Márcia dos Santos Lazéra

_____ (INCQS/FIOCRUZ)
Orientadora - Dra. Manuela da Silva

Rio de Janeiro
2009

Neufeld, Paulo Murillo

Caracterização taxonômica e susceptibilidade a antifúngicos de leveduras isoladas de infecção hospitalar/ Paulo Murillo Neufeld. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2009.

xxi, 235p., il, tab.

Tese de Doutorado em Vigilância Sanitária - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2009.

Orientadoras: Márcia dos Santos Lazéra e Manuela da Silva.

1. Infecção hospitalar 2. Candidíase 3. *Multiplex*-PCR 4. Antifúngicos 5. Teste de susceptibilidade microbiana. | Título.

Título em inglês: Taxonomical Characterization and antifungal susceptibility of yeasts isolated from hospital infection

“Desde as origens, a humanidade conheceu a trágica experiência do mal e procurou encontrar as suas raízes e explicar-lhe as causas. O mal não é uma força anônima que age no mundo devido a mecanismos deterministas e impessoais. O mal passa através da liberdade humana. No centro do drama do mal e constantemente relacionado a ele está precisamente esta faculdade que distingue o homem dos demais seres vivos sobre a terra. O mal tem sempre um rosto e um nome: o rosto e o nome de homens e mulheres que o escolhem livremente. Visto nas suas componentes mais profundas, o mal é, em última análise, um trágico esquivar-se às exigências do amor. O bem moral, pelo contrário, nasce do amor, manifesta-se como amor e é orientado ao amor. O mal não se derrota com o mal: de fato, por aí, em vez de vencermos o mal, somos por ele derrotados. Quando o bem vence o mal, reina o amor, e onde reina o amor, reina a paz. A paz é o resultado de uma longa e árdua batalha, vencida quando o mal é derrotado com o bem. É uma batalha que se combate validamente somente com as armas do amor. A paz é um bem a ser promovido com o bem: é um bem para as pessoas, as famílias, as nações da terra e toda a humanidade; mas um bem que deve ser conservado e cultivado mediante opções e obras de bem. Nenhum homem, nenhuma mulher de boa vontade pode esquivar-se ao compromisso de lutar para vencer o mal com o bem”.

Sua Santidade João Paulo II
Homilia para a Celebração do Dia Mundial da Paz
Cidade do Vaticano, 8 de dezembro de 2004.

Diz Fernando Pessoa: “O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que elas acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”.

São para essas pessoas inesquecíveis e incomparáveis que eu dedico com profunda emoção e imensa alegria, este trabalho:

Elisabeth (in memoriam), *minha mãe, grande carinho da minha vida;*

Isabel, *companheira de todas as horas, de todos os momentos, de toda essa jornada;*

Elizabeth, *minha filha, luz da minha vida;*

Ramón, *meu pai do coração, o maior exemplo de hombridade;*

Blanca (in memoriam), *minha mãe do coração, querida e muito saudosa;*

Alfred (in memoriam), *meu avô, certeza de que não estou só;*

Paulina (in memoriam), *um sonho de avó;*

Armando (in memoriam) e **Irene** (in memoriam), *meus avós, outro sonho;*

Ramiro (in memoriam), *meu querido e saudoso tio português.*

AGRADECIMENTOS

“Quem acolhe um benefício com gratidão, paga a primeira prestação da sua dívida”

Sêneca

E falando em gratidão, deixo aqui a minha:

À **Elisabeth Candida da Silva**, minha mãe (*in memoriam*), pelo incondicional amor, pela imensa amizade e por tudo que em vida fez por mim. Sem seu apoio, não teria havido a menor possibilidade de chegar até aqui. Obrigado minha mãe! Sua inteligência refinada, sua alegria contagiante e sua companhia adorável é seu legado de recordações;

À **Maria Isabel Figueiras Neufeld**, minha esposa, e **Elizabeth Gutierrez y Figueiras Neufeld**, minha filha, pelo amor, pela amizade, pelo companheirismo e pela enorme paciência e compreensão pelos inúmeros momentos de ausência nestes últimos 4 anos;

À **Dra. Márcia Lazéra**, minha orientadora, que, com a sabedoria nascida da experiência, me ajudou a construir e realizar esta tese de doutorado;

À **Dra. Manuela da Silva**, minha outra orientadora, que, com sua amizade, me deu a oportunidade e o apoio necessários para que este trabalho pudesse ser realizado;

À **Dra. Cintia de Moraes Borba**, pesquisadora do Instituto Oswaldo Cruz, pela fraterna amizade e revisão desta tese;

À **Dra. Márcia de Carvalho Melhem**, pesquisadora do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, que, com seu carisma, amizade e profundo conhecimento, foi fundamental nos estudos de susceptibilidade às drogas antifúngicas;

À **Dra. Maria Walderez Szeszs**, pesquisadora do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, que, com sua amizade, solicitude, generosidade e competência, foi também fundamental para a existência desta tese;

À **Dra. Helena Keiko Toma**, professora da Faculdade de Farmácia da UFRJ, que num gesto de grande amizade e solidariedade, abriu o Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas para a realização dos experimentos moleculares desta tese;

À **Marilia Martins Nishikawa**, tecnóloga do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, pela gentil cessão das cepas de referência;

À **Elizabeth Maciel de Albuquerque**, estatística do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, pela valiosa ajuda na análise dos resultados;

À **Simone Gomes**, secretária do Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Farmácia da UFRJ, pela amizade, ajuda na Pós-Graduação *Lato Sensu* e preocupação comigo e esta tese;

À **Simone Miranda**, técnica do Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Farmácia da UFRJ, pela amizade e ajuda nos experimentos, na rotina do Laboratório de Micologia Clínica e nas aulas práticas da disciplina de micologia clínica;

À **Enádia Tavares da Silva**, auxiliar de serviços gerais do Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Farmácia da UFRJ, pela amizade e inestimável colaboração na organização do laboratório durante realização da tese;

Ao **Luiz Henrique dos Santos**, farmacêutico bioquímico e estudante de mestrado do Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Farmácia da UFRJ, pela amizade e ajuda nos experimentos da tese;

Ao **Marcos Dornelas Ribeiro**, farmacêutico bioquímico do Instituto de Hematologia do Rio de Janeiro, pela amizade e ajuda com parte das cepas de levedura utilizadas neste estudo;

À **Mauricéa de Araújo González e Ana Carolina Rocha Mesquita**, analistas clínicas do Hospital São Vicente de Paulo, pela amizade e ajuda com a identificação bioquímica das cepas de levedura;

Ao **Dr. Carlos Rangel Rodrigues**, Diretor da Faculdade de Farmácia da UFRJ, pela amizade e apoio durante a realização desta tese;

À **Dra. Maria Helena Villas Boas** e aos **amigos** da Coordenação de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, pelo apoio e suporte acadêmico à execução da tese.

RESUMO

Infecções invasivas são um problema crescente em hospitais terciários no Brasil e no mundo. Dentre os diversos agentes etiológicos encontrados no ambiente hospitalar, o gênero *Candida* tem sido o terceiro ou quarto patógeno mais isolado. De maneira geral, infecções fúngicas invasivas estão associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade, dificuldades de diagnóstico, resistência a antimicrobianos, extensão do tempo de internação e aumento dos custos hospitalares. O presente trabalho objetivou avaliar o desempenho de métodos fenotípicos e moleculares na identificação de espécies de *Candida* recuperadas de casos de infecção hospitalar e descrever seus perfis de susceptibilidade a drogas antifúngicas através de metodologias de referência e comerciais. Para tanto, 113 isolados clínicos (108 *Candida* spp., 2 *Rhodotorula glutinis* e 1 *Trichosporon* sp.) de 100 pacientes hospitalizados no estado do Rio de Janeiro foram submetidos a provas em CHROMagar, do tubo germinativo e do clamidósporo, análises bioquímicas em aparelho VITEK e identificação molecular por *multiplex*-PCR. A susceptibilidade ao fluconazol, itraconazol e anfotericina B foi avaliada conjuntamente pelos métodos de difusão em ágar (CLSI/M44-A e CECON) e microdiluição em caldo (CLSI/M27-A2 e EUCAST/E.Dis.7.1) conforme os protocolos de referência do CLSI e EUCAST, bem como pelas instruções do fabricante do método comercial CECON. Com relação às características demográficas dos pacientes, 47% eram do sexo masculino e 37% do sexo feminino, a maioria se encontrava na faixa de 0-20 anos (33%) e as leucemias foram os principais processos de base (20%). *Candida albicans* (41,5%), *C. parapsilosis* (29,2%), *C. guilliermondii* (10,6%) e *C. tropicalis* (9,7%) foram as espécies mais isoladas, considerando a totalidade dos espécimens clínicos. Em cultura de sangue, *C. albicans* (38,4%) também foi preponderante. A identificação cromogênica mostrou 100% de sensibilidade e especificidade para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. As provas do tubo germinativo e do clamidósporo para identificação de *C. albicans* apresentaram 89,4% de sensibilidade e 100% de especificidade. Os testes bioquímicos permitiram a detecção correta e completa de 78,8% dos isolados. A *multiplex*-PCR identificou adequadamente todas as espécies para os quais *primers* tinham sido desenhados. Alta taxas ($\geq 92,9\%$) de susceptibilidade aos 3 antifúngicos testados foram observadas em todas as metodologias empregadas. Resistência foi verificada apenas em *C. krusei* e *Rhodotorula glutinis* frente ao fluconazol. No entanto, concentrações inibitórias mínimas (CIM) mais elevadas foram, igualmente, encontradas em itraconazol. O cálculo do coeficiente de correlação intraclasse (CCI) demonstrou alta correlação (0,88-0,97) entre todos os métodos utilizados para avaliação das susceptibilidades aos antifúngicos. Os resultados apresentados demonstraram que *C. albicans* foi a espécie mais prevalente e também que, depois de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. lambica* foram as espécies menos susceptíveis aos antifúngicos azólicos. Além disto, o CHROMagar e a *multiplex*-PCR foram os mais efetivos na identificação preliminar e na identificação definitiva dos isolados clínicos, respectivamente. As metodologias de difusão em ágar e microdiluição em caldo foram também efetivas tanto na triagem quanto na confirmação das susceptibilidades.

ABSTRACT

Invasive infections are an increasing problem in tertiary care hospitals in Brazil and in the world. The predominant etiologic agents in the nosocomial environment include the genus *Candida* that is the third or fourth most common isolate. In general, invasive fungal infections are associated with high morbidity and mortality, difficulties in the diagnosis, acquisition of resistance, prolonged hospital stay, and high hospital costs. The aim of the present work was to evaluate the performance of phenotypic and molecular methods in the identification of *Candida* spp. isolated from nosocomial infection cases as well as to describe their antifungal drug susceptibility profiles by reference and commercial methodologies. For this, 113 clinical isolates (108 *Candida* spp., 1 *Rhodotorula glutinis*, 1 *Trichosporon* sp.) from 100 hospitalized patients in the Rio de Janeiro state were submitted to CHROMagar, germ tube and chlamydo-spore testing, biochemistry analysis in VITEK equipment, and molecular identification by multiplex-PCR. The susceptibility to fluconazole, itraconazole, and amphotericin B was evaluated by disk-diffusion method (CLSI/M44-A, CECON) and broth microdilution method (CLS/M27-A2, EUCAST/E.Dis.7.1.) according to the CLSI and EUCAST reference protocols and the manufacturer's instructions, in case of CECON. Relatively to the demographic patient characteristics, 47% were male, 37% were female, the majority was between 0-20 years (33%), and leukemias were the main base diseases (20%). *Candida albicans* (41,5%), *C. parapsilosis* (29,2%), *C. guilliermondii* (10,6%) e *C. tropicalis* (9,7%) were the most frequently isolated *Candida* species from all clinical specimens. In hemoculture *C. albicans* (38,4%) was prevalent. The chromogenic identification showed susceptibility and specificity of 100% to *C. albicans*, *C. tropicalis*, and *C. krusei*. The germ tube and chlamydo-spore formation to *C. albicans* identification presented sensibility of 89,4% and specificity of 100%. The biochemistry tests were capable to correct and complete detection of 78% of the isolates. All *Candida* species could be accurately identified by using the designed species-specific primers by multiplex-PCR analysis. High rates ($\geq 92,9\%$) of susceptibility to 3 antifungal drugs tested were verified for all methodologies. Resistance was found only in *C. krusei* and *Rhodotorula glutinis* to fluconazole. However high minimum inhibitory concentrations (MIC) were found to itraconazole as well. The intraclass correlation coefficient (ICC) showed high correlation (0,88-0,97) between all methods used to antifungal susceptibility evaluation. The results demonstrated that *C. albicans* was the most predominant species, and also that after *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. lusitana* were the less susceptible to azoles drug. Besides this, CHROMagar and multiplex-PCR were more effective in the preliminary and definitive identification of clinical isolates, respectively. The disk-diffusion and broth microdilution methods were effective to screening and confirm the susceptibilities.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC	-	American Type Culture Collection
BDA	-	Ágar Batata Dextrosado
CDR	-	<i>Candida</i> Drug Resistance
CIM	-	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	-	Clinical and Laboratory Standards Institute
dATP	-	Deoxi-Adenosina Trifosfato
dCTP	-	Deoxi-Citosina Trifosfato
dGTP	-	Deoxi-Guanididna Trifosfato
dNTP	-	Deoxi-Nucleotideo Trifosfato
dTTP	-	Deoxi-Timidina Trifosfato
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
DNA	-	Ácido Desoxiribonucléico
DNAr	-	DNA Ribossômico
ERG	-	Ergosterol Biosynthetic Enzymes
EUCAST	-	European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing
HCE	-	Hospital Central do Exército
HEMORIO	-	Instituto de Hematologia Arthur da Siqueira Cavalcanti
IBEx	-	Instituto de Biologia do Exército
INCQS	-	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
ITS	-	Internal Transcribed Spacer [Espaçador Interno Transcrito]
LCCN	-	Laboratório de Saúde Pública Noel Nutels
MDR	-	Multidrug Resistance
RPMI	-	Roswell Park Memorial Institute
mL	-	Mililitro
mM	-	Milimolar

μg	-	Micrograma
μL	-	Microlitro
NCCLS	-	National Committee for Clinical Laboratory Standards
nm	-	Nanômetro
PCR	-	Polymerase Chain Reaction [Reação em Cadeia da Polimerase]
R	-	Resistência
RNA	-	Ácido Ribonucléico
S	-	Susceptibilidade
SDD	-	Susceptibilidade dependente de dose
TRIS	-	Tris (Hidroximetil) Aminometano
UFC	-	Unidade Formadora de Colônia
UFRJ	-	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UNIRIO	-	Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

LISTA DE TABELAS

01. Tabela 1. Características demográficas dos 100 pacientes com infecção fúngica.....	63
02. Tabela 2. Distribuição dos isolados por sexo, idade e patologia de base.....	64
03. Tabela 3. Distribuição dos isolados clínicos por sítio anatômico.....	66
04. Tabela 4. Variação de CIM, valores de CIM ₅₀ e CIM ₉₀ e percentual de susceptibilidade ao fluconazol, itraconazol e anfotericina B para os 113 isolados clínicos testados segundo a metodologia de microdiluição em caldo do CLSI e EUCAST.....	74
05. Tabela 5. Intervalo de CIM ₅₀ e CIM ₉₀ e percentual de susceptibilidade para fluconazol estratificados por espécies fúngicas segundo a metodologia de microdiluição em caldo do CLSI e EUCAST.....	75
06. Tabela 6. Intervalo de CIM ₅₀ e CIM ₉₀ e percentual de susceptibilidade para itraconazol estratificados por espécies fúngicas segundo a metodologia de microdiluição em caldo do CLSI e EUCAST.....	79
07. Tabela 7. Intervalo de CIM ₅₀ e CIM ₉₀ e percentual de susceptibilidade para anfotericina B estratificados por espécies fúngicas segundo a metodologia de microdiluição em caldo do CLSI e EUCAST.....	81
08. Tabela 8. Atividade <i>in vitro</i> de fluconazol frente aos isolados fúngicos segundo a metodologia de microdiluição em caldo do CLSI e EUCAST.....	85
09. Tabela 9. Atividade <i>in vitro</i> de itraconazol frente aos isolados fúngicos segundo a metodologia de microdiluição em caldo do CLSI e EUCAST.....	87
10. Tabela 10. Atividade <i>in vitro</i> de anfotericina B frente aos isolados fúngicos segundo a metodologia de microdiluição em caldo do CLSI e EUCAST.....	89
11. Tabela 11. Variação do diâmetro da zona de inibição, faixa de CIM e percentual de susceptibilidade a fluconazol, itraconazol, anfotericina B para os 113 isolados clínicos testados segundo a metodologia de difusão em ágar do CLSI e CECON.....	91
12. Tabela 12. Diâmetro da zona de inibição, faixa de CIM e susceptibilidade a fluconazol, itraconazol e anfotericina B estratificados por isolados fúngicos...	92
13. Tabela 13. Análise descritiva da comparação dos valores de CIM para fluconazol obtidos pelas metodologias de microdiluição em caldo do CLSI e EUCAST.....	96

14. Tabela 14. Análise descritiva da comparação dos valores de CIM para itraconazol obtidos pelas metodologias de microdiluição em caldo do CLSI e EUCAST.....	97
15. Tabela 15. Análise descritiva da comparação dos valores de CIM para anfotericina B obtidos pelas metodologias de microdiluição em caldo do CLSI e EUCAST.....	98
16. Tabela 16. Distribuição da diferença em diluições entre as metodologias do CLSI e EUCAST para os antifúngicos testados.....	99
17. Tabela 17. Comparação entre o diâmetro da zona de inibição obtido por difusão em ágar (CLSI/M44-A) e CIM obtida por microdiluição em caldo (CLSI e EUCAST) para fluconazol.....	100
18. Tabela 18. Comparação entre o diâmetro da zona de inibição obtido por difusão em ágar (CECON) e CIM obtida por microdiluição em caldo (CLSI e EUCAST) para itraconazol	101
19. Tabela 19. Comparação entre o diâmetro da zona de inibição obtido por difusão em ágar (CECON) e CIM obtida por microdiluição em caldo (CLSI e EUCAST) para anfotericina B.....	102
20. Tabela 20. Coeficiente de correlação intraclasse (CCI) por grupo de antifúngico.....	103
21. Tabela 21. Coeficiente de correlação intraclasse (CCI) por espécie fúngica...	104

LISTA DE FIGURAS

01. Figura 1. Estratégia de ação da <i>multiplex</i> -PCR. Organização dos genes ribossomais fúngicos com a indicação dos alvos dos iniciadores universais e espécie-específicos.....	42
02. Figura 2. Esquema para as diluições de antifúngicos insolúveis em água. Diluente DMSO.....	47
03. Figura 3. Preenchimento das placas de microdiluição com a solução de antifúngicos insolúveis em água.....	48
04. Figura 4. Esquema para as diluições de antifúngicos solúveis em água. Diluente RPMI.....	49
05. Figura 5. Preenchimento das placas de microdiluição com a solução de antifúngicos solúveis em água.....	50
06. Figura 6. Preparação do inóculo de leveduras pela metodologia do CLSI.....	51
07. Figura 7. Inoculação das placas de microdiluição pela metodologia do CLSI.....	52
08. Figura 8. Preparação do inóculo de leveduras pela metodologia do EUCAST.....	55
09. Figura 9. Inoculação das placas de microdiluição pela metodologia do EUCAST.....	56
10. Figura 10. Protocolo M44-A para avaliação da susceptibilidade ao fluconazol.....	59
11. Figura 11. Padrão de bandas dos produtos de <i>multiplex</i> -PCR em gel de agarose a 2% de cepas de referência e isolados clínicos de <i>Candida</i> spp. M, marcador de peso molecular (100 pb); linha 1, <i>C. albicans</i> INCQS-40071; linha 2, <i>C. krusei</i> INCQS-40095; linha 3, <i>C. tropicalis</i> INCQS-40042; linha 4, <i>C. parapsilosis</i> INCQS-40038; linha 5, <i>C. guilliermondii</i> INCQS-40037; linha 6, <i>C. glabrata</i> INCQS-40136; linha 7, <i>C. tropicalis</i> INCQS-40042; linha 8, <i>C. lusitaniae</i> INCQS-40137; linha 9, <i>C. famata</i> LMC-307T; linha 10, <i>C. krusei</i> LMC-287T; linha 11, <i>C. albicans</i> LMC-348T; linha 12, <i>C. guilliermondii</i> LMC-263T; linha 13, <i>C. parapsilosis</i> LMC-303T; linha 14, <i>C. tropicalis</i> LMC-338T; linha 15, <i>C. glabrata</i> LMC-360T.....	70

12. Figura 12. Leitura do teste de microdiluição em caldo para fluconazol segundo o documento CLS/M27-A2: colunas 1 e 12 representam os controles de esterilidade e de crescimento, respectivamente, colunas 02 a 11 representam as concentrações de 64 a 0,125µg/mL, linhas A a F mostram os resultados para os isolados clínicos testados e linhas G e H exibem os resultados para as cepas-controle. O crescimento é visualizado pela turbidez..... **73**
13. Figura 13. Leitura do teste de difusão em ágar para fluconazol segundo o documento CLS/M44-A. O diâmetro (mm) da zona de inibição indica a susceptibilidade do fungo à droga testada..... **73**

LISTA DE ANEXOS

01. Anexo 1. Identificação dos isolados fúngicos.....	216
02. Anexo 2. Resultado dos testes de susceptibilidade <i>in vitro</i> de 113 isolados fúngicos frente ao fluconazol, itraconazol e anfotericina B pelos métodos de difusão em ágar e microdiluição em caldo.....	224
03. Anexo 3. Diretrizes interpretativas para o teste de sensibilidade <i>in vitro</i> das espécies de <i>Candida</i> pelo método da diluição em caldo.....	232
04. Anexo 4. Antimicrobianos para infecções por <i>Candida</i> : pontos de corte para fluconazol (versão 1.0).....	233
05. Anexo 5. Diretrizes de interpretação dos testes de sensibilidade <i>in vitro</i> das espécies de <i>Candida</i> pelo método de difusão em ágar: diâmetro de inibição e correspondente concentração inibitória mínima [CIM].....	234
06. Anexo 6. Diretrizes de interpretação dos testes de sensibilidade <i>in vitro</i> das espécies de <i>Candida</i> pelo método de difusão em ágar: diâmetro de inibição e correspondente concentração inibitória mínima [CIM].....	235

SUMÁRIO

1. Introdução	01
1.1. Legislação e Vigilância Sanitária das Infecções Hospitalares.....	01
1.2. Infecções Fúngicas Hospitalares.....	05
1.2.1. Fatores de Risco para Infecções Fúngicas Hospitalares.....	07
1.2.1.1. Unidade de Tratamento Intensivo.....	07
1.2.1.2. Acesso Vascular.....	08
1.2.1.3. Neutropenia.....	09
1.2.1.4. Doenças Neoplásicas.....	10
1.2.1.5. Transplantes de Órgãos e Medula Óssea.....	11
1.2.2. Infecções Hospitalares por <i>Candida</i> spp.....	12
1.2.2.1. Manifestações Clínicas.....	13
1.2.2.2. Diagnóstico Laboratorial.....	19
1.2.2.3. Distribuição Geográfica.....	25
1.2.3. Drogas Antifúngicas	26
1.2.3.1. Mecanismo de Ação e Resistência às Drogas Antifúngicas.	27
1.2.3.2. Testes de Susceptibilidade às Drogas Antifúngicas.....	31
2. Objetivos	35
2.1. Objetivos Gerais.....	35
2.2. Objetivos Específicos.....	35
3. Material e Métodos	36
3.1. Microrganismos.....	36
3.2. Identificação e Preservação das Amostras.....	36
3.2.1. Identificação Cromogênica.....	36
3.2.2. Identificação Morfológica.....	37
3.2.2.1. Prova do Tubo Germinativo.....	37

3.2.2.2. Microcultivo em Lâmina.....	37
3.2.3. Identificação Bioquímica.....	38
3.2.4. Preservação dos Isolados Clínicos.....	39
3.2.5. Identificação Molecular.....	39
3.2.5.1. Cepas de Referência.....	39
3.2.5.2. Extração do DNA Genômico.....	40
3.2.5.3. Iniciadores.....	41
3.2.5.4. Amplificação por <i>Multiplex-PCR</i>	41
3.2.5.5. Eletroforese em Gel de Ágarose.....	42
3.2.5.6. Interpretação dos Resultados.....	43
3.3. Testes de Susceptibilidade aos Antifúngicos.....	43
3.3.1. Método de Microdiluição em Caldo.....	44
3.3.1.1. Protocolo CLSI/M27-A2.....	44
3.3.1.2. Protocolo EUCAST/E.Dis.7.1.....	53
3.3.2. Método de Difusão em Ágar.....	57
3.3.2.1. Protocolo CLSI/M44-A.....	57
3.3.2.2. Protocolo CECON.....	60
3.3.3. Análise Combinada de Resultados das CIM.....	60
3.3.4. Análise Estatística.....	60
4. Resultados.....	61
4.1. Microrganismos.....	61
4.1.1. Prevalência dos Isolados Fúngicos.....	61
4.1.2. Distribuição dos Isolados Fúngicos por Sexo, Idade e Patologia de Base.....	62
4.1.3. Distribuição dos Isolados Fúngicos por Sítio Anatômico.....	62
4.2. Identificação dos Isolados Fúngicos.....	67
4.2.1. Identificação Cromogênica e Morfológica.....	67

4.2.2. Identificação Bioquímica.....	67
4.2.3. Identificação Molecular.....	68
4.2.4. Comparação de Resultados.....	68
4.3. Antifúngicos.....	71
4.3.1. Valores de Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos Antifúngicos Estudados.....	71
4.3.1.1. Protocolo CLSI/M27-A2.....	71
4.3.1.2. Protocolo EUCAST/E.Dis.7.1.....	72
4.3.1.3. Protocolos CLSI/M44-A e CECON.....	72
4.3.2. Perfil de Susceptibilidade ao Fluconazol.....	77
4.3.2.1. Protocolo CLSI/M27-A2.....	77
4.3.2.2. Protocolo EUCAST/E.Dis.7.1.....	77
4.3.2.3. Protocolo CLSI/M44-A.....	78
4.3.3. Perfil de Susceptibilidade ao Itraconazol.....	78
4.3.3.1. Protocolo CLSI/M27-A2.....	78
4.3.3.2. Protocolo EUCAST/E.Dis.7.1.....	78
4.3.3.3. Protocolo CECON.....	83
4.3.4. Perfil de Susceptibilidade à Anfotericina B.....	83
4.3.4.1. Protocolo CLSI/M27-A2.....	83
4.3.4.2. Protocolo EUCAST/E.Dis.7.1.....	83
4.3.4.3. Protocolo CECON.....	84
4.3.5. Comparação de Resultados.....	93
5. Discussão.....	106
6. Conclusão.....	145
7. Referências Bibliográficas.....	148
8. Anexos.....	215

1. INTRODUÇÃO

1.1. LEGISLAÇÃO E VIGILÂNCIA SANITÁRIA DAS INFECÇÕES HOSPITALARES

No século XX, o advento dos antimicrobianos revolucionou o tratamento das doenças infecciosas, mas emergiu com o problema da resistência (FONTANA, 2006). Por serem locais de intenso uso de medicação antimicrobiana, naturalmente, os hospitais foram os primeiros a sofrerem com o surgimento de agentes resistentes (LEVY, 1998). Surto de infecção por *Streptococcus pyogenes* resistentes à sulfonamida, *Mycobacterium tuberculosis* resistentes à estreptomicina e *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina foram observados em hospitais por todo o mundo na primeira metade do século passado (CROFTON & MITCHISON, 1948; LACERDA, 2002; LEVY, 1982). Posteriormente, no terço final do referido século, uma gama de microrganismos gram negativos e fúngicos resistentes vieram a substituir estes cocos gram positivos na prevalência das infecções hospitalares (SELWYN, 1991). Para a comunidade científica internacional, prontamente, ficou claro que o fenômeno de resistência se tornara uma pandemia mundial de complexa resolução, o que estimulou e tem ainda estimulado a busca por medidas de controle e prevenção das infecções adquiridas durante a hospitalização (Grazebrook, 1986; SILVA, 2003).

Apesar do termo *infecção hospitalar* só ter sido empregado na literatura médica nacional a partir da década de 1970, desde os anos 50, acompanhando a tendência internacional, que os textos científicos relatam o problema da transmissão de infecção nos estabelecimentos de saúde do país (LACERDA, 2002). Respondendo a estas publicações e ao problema da pandemia hospitalar por *S. aureus*, a primeira comissão de controle de infecção hospitalar do Brasil foi instalada em um hospital da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, em 1963, como uma iniciativa isolada. Na década de 1970, ainda de forma isolada, alguns hospitais começaram a se preocupar com as infecções hospitalares, estabelecendo algumas medidas de prevenção e controle (SILVA & SANTOS, 2001). A partir da década de 1980, todavia, o assunto torna-se objeto de estudo e ações governamentais (SANTOS et al., 2005).

De acordo com uma investigação realizada pelo Ministério da Saúde, em 1995, a infecção hospitalar acomete cerca de 15% dos pacientes hospitalizados no Brasil (PRADE et al., 1995). Este percentual, mesmo sendo semelhante aos encontrados em alguns países com alto nível tecnológico, está extremamente distanciado da média

mundial de 8,7% definida pela Organização Mundial de Saúde – OMS (TIKHOMIROV, 1987). Diante disso, e acompanhando a tendência internacional de controle da infecção hospitalar, as autoridades sanitárias brasileiras têm implementado esforços no sentido de criar diretrizes e normas de atuação sistematizadas.

Um dos marcos no controle das infecções hospitalares no país foi a publicação da portaria no. 196 de 24 de junho de 1983 pelo Ministério da Saúde que continha, na forma de anexos, instruções para o controle e prevenção de infecção hospitalar. Essa portaria determinava a criação e a manutenção de Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) em todas as instituições de saúde, independentemente da classe mantenedora, bem como definia sua organização e competência. Orientações práticas para a coleta, análise e divulgação de dados, desenvolvimento de recursos humanos e materiais, reconhecimento e diagnóstico de infecções, classificação dos tipos de infecções e cirurgias e seleção de germicidas foram também ensejadas. A norma ainda conceituava a infecção hospitalar como: *infecção adquirida após a internação do paciente e que se manifesta durante a internação, ou mesmo após a alta, quando puder ser relacionada com a hospitalização* (BRASIL, 1983).

Outro momento importante foi a criação da Comissão Nacional de Infecção Hospitalar (CNIH), em 1987, com representação de vários estados brasileiros e formada por diferentes profissionais de saúde, para a elaboração do Programa Nacional de Controle da Infecção Hospitalar (PNCIH). Em 1988, este programa foi oficializado no país e tem como finalidade precípua a coordenação da Política Nacional de Controle de Infecção Hospitalar. Entre outras metas, o PNCIH visa à implantação de CCIH em toda rede hospitalar pública e privada. Para a conscientização nesse sentido, o Governo Federal instituiu, em 1990, o dia 15 de maio como sendo o *Dia Nacional de Controle da Infecção Hospitalar* (ANVISA, 2004a; BRASIL, 1990a).

A maior profissionalização das práticas de controle de infecção hospitalar foi um dos objetivos da portaria no. 930 de 27 de agosto de 1992. Essa portaria substituiu a portaria no. 196, mas reiterou a necessidade de implementação de um Programa de Controle de Infecção Hospitalar (PCIH) institucional. Em seu escopo, estavam a definição da estrutura de funcionamento e as áreas de competência da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) e do recém criado Serviço de Controle de Infecção Hospitalar (SCIH). Além disso, detalharam-se os conceitos e critérios para o diagnóstico e os métodos de vigilância epidemiológica por meio de busca ativa de casos, bem como foram classificadas as cirurgias e estabelecidas normas para a limpeza, desinfecção, esterilização e antisepsia em estabelecimentos de saúde. Pela

portaria, o PCIH foi definido como: *conjunto de ações desenvolvidas deliberada e sistematicamente com vistas à redução máxima possível da incidência e gravidade das infecções hospitalares* (ANVISA, 2004a; BRASIL, 1992).

A edição da Lei Federal no. 9.431 de 06 de janeiro de 1997, que dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção de PCIH pelos hospitais de todo o país, foi mais uma importante iniciativa para a política nacional de infecção hospitalar (BRASIL, 1997). Como consequência dessa Lei, o Ministério da Saúde publicou a portaria no. 2.616 de 12 de maio de 1998, que regula a prevenção e o controle das infecções no ambiente hospitalar, revogando a portaria 930. Nessa portaria, é reafirmado o conceito de infecção hospitalar: *infecção adquirida após a admissão do paciente na unidade hospitalar e que se manifesta durante a internação, ou mesmo após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares*. Além disto, ficam definidas a organização e a competência da CCIH dos hospitais e as áreas de abrangência das Coordenações de Controle de Infecção Hospitalar do Ministério da Saúde, dos estados e distrito federal e dos municípios. A portaria aborda ainda conceitos e critérios diagnóstico das infecções, fornece orientações sobre vigilância epidemiológica e seus indicadores e recomendações sobre lavagem das mãos, normas de limpeza, desinfecção e esterilização, emprego de germicidas, procedimentos em microbiologia, lavanderia e farmácia (BRASIL, 1998).

A Lei no. 8.080 de 19 de setembro de 1990, que dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e cria o Sistema Único de Saúde (SUS), apesar de mais genérica, também se articula com a política de controle de infecção hospitalar, pois regula todas as ações e serviços de saúde executados no país, incluído às ações de vigilância sanitária e vigilância epidemiológica. Pela Lei, a vigilância sanitária é definida como: “conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde”. Por sua vez, a vigilância epidemiológica é entendida como: “conjunto de ações que proporcionam o conhecimento, a detecção ou prevenção de qualquer mudança nos fatores determinantes ou condicionantes de saúde individual ou coletiva com a finalidade de reconhecer e adotar as medidas de prevenção e controle das doenças e agravos” (BRASIL, 1990c). Esses conceitos subsidiam o PNCIH, sendo uma das bases para a operacionalização de seus objetivos (ROSENFELD, 2004).

A Lei no. 9.782 de 27 de janeiro de 1999, que dispõe sobre o Sistema Nacional

de Vigilância Sanitária e cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA] é outra Lei com grande interface com a problemática das infecções no ambiente hospitalar. Atualmente, o desenvolvimento e o fortalecimento de políticas voltadas para o controle e prevenção das infecções nos serviços de saúde no Brasil, por delegação, é de competência da ANVISA. Uma de suas primeiras ações no âmbito da prevenção e controle das infecções hospitalares foi a publicação da Resolução no. 48 de 02 de junho de 2000 que aprova o Roteiro de Inspeção do PCIH, estabelecendo a sistemática para a avaliação do cumprimento das ações do programa. Outras ações importantes para o combate a essas infecções são a implantação do Sistema Nacional de Informação para o Controle da Infecção em Serviços de Saúde [SINAISS] e a formação da Rede de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde. Ambos os programas têm como objetivo precípuo auxiliar na identificação e acompanhamento das infecções, bem como contribuir para a priorização das ações de controle e organização das diretrizes e políticas nas esferas de gestão federal, estadual e municipal (ANVISA, 2004; BRASIL, 1999, 2000a).

A Lei no. 8.078 de 11 de setembro de 1990, também conhecida como Código de Defesa do Consumidor (CDC), que dispõe sobre a proteção dos consumidores, mesmo não legislando diretamente sobre as questões de infecção hospitalar, tem sido empregada como um instrumento disciplinador. Isso tem sido possível porque o CDC tem como um de seus pilares de sustentação o conceito de vulnerabilidade do consumidor. Essa condição vulnerável fundamenta a regulação das relações produção-consumo para a proteção da parte mais frágil, que no âmbito do atendimento hospitalar, é representado pelos pacientes. Como a infecção hospitalar não é fato que goze de presunção legal de caso fortuito e imprevisível e tendo o hospital a responsabilidade de resguardar a incolumidade do paciente/consumidor em tudo que possa lhe trazer dano e ainda sendo a infecção hospitalar, a princípio, a negação do cumprimento deste dever que, no âmbito jurídico, equivale ao dever de responsabilidade de guarda, o Ministério Público tem se valido dessa Lei (Artigos 6 e 14) e do Código Civil Brasileiro (Artigos 159 e 1538) para promover a proteção da saúde dos cidadãos frente aos casos de infecção hospitalar (BRASIL, 1990b, 2002).

Dentre todos os recursos utilizáveis para detecção e controle da infecção hospitalar, o laboratório de microbiologia clínica é preponderante. Classicamente, a maioria dos isolados é de origem bacteriana, mas impulsionados por diversos fatores de risco, os fungos passaram a uma posição de destaque no contexto das infecções hospitalares. A inclusão desses agentes no *SENTRY Antimicrobial Surveillance*

Program, um programa de vigilância epidemiológica multinacional, longitudinal e prospectivo que visa determinar a etiologia de patógenos nosocomiais e o perfil de sensibilidade a antimicrobianos, a partir de procedimentos de diagnóstico laboratorial e biologia molecular, bem como protocolos de referência quantitativos, comprovam essa maior importância (PFALLER et al., 2001).

A despeito da emergência das infecções fúngicas invasivas em pacientes hospitalizados e da conscientização internacional de sua gravidade, no entanto, esses processos são ainda pouco considerados no Brasil. De maneira geral, indicadores de infecção fúngica hospitalar como taxa de infecção fúngica, taxa de paciente com infecção fúngica, distribuição percentual das infecções fúngicas por localização topográfica, procedimentos e etiologia, coeficiente de sensibilidade aos antifúngicos e taxa de letalidade são amplamente desconhecidos (COLOMBO, 2003).

Neste contexto de informação escassa, estudos que investiguem a história natural das infecções fúngicas invasivas e avaliem seu impacto no ambiente hospitalar apresentam uma comunicação direta com a vigilância sanitária e epidemiológica, já que podem subsidiar o estabelecimento de medidas capazes de diminuir ou relativizar o risco desses processos ocorrerem (BRASIL, 1990c; COLOMBO & GUIMARÃES, 2003). Assim, para a prevenção dessas infecções e recomendação e/ou adoção de medidas de controle nosocomial é fundamental o conhecimento dos fatores determinantes de infecções fúngicas invasivas e dos mecanismos pelos quais os indivíduos se defrontam com os agentes causais (BRASIL, 1990c; TAMBELLINI & CÂMARA, 2002).

1.2. INFECÇÕES FÚNGICAS HOSPITALARES

Os avanços experimentados na tecnologia médica, principalmente, nas duas últimas décadas, têm oferecido novas possibilidades terapêuticas para processos patológicos de extrema gravidade. A introdução de métodos de diagnóstico mais eficientes, novas técnicas de cirurgia e transplante, antibióticos e quimioterápicos mais potentes e novos materiais para próteses, sondas e cateteres aumentaram de forma significativa a expectativa e a qualidade de vida dos pacientes críticos (GROLL & WALSH, 2002a; MAERTENS et al., 2001; MÉAN et al., 2008). Em contrapartida, infecções hospitalares surgiram como importantes complicações iatrogênicas (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).

Claramente, são os procedimentos invasivos e os protocolos de tratamento com imunossupressores, bem como o caráter consumptivos de muitos processos de base

que têm tornado os indivíduos susceptíveis aos patógenos encontrados no ambiente hospitalar (CUENCA-ESTRELLA & RODRÍGUEZ-TUDELA, 2002; HOBSON, 2003). Assim, como consequência do profundo comprometimento dos mecanismos de defesa dos hospedeiros hospitalizados, estes microrganismos passaram a se comportar como oportunistas, sendo capazes de causar quadros infecciosos de alta letalidade (NUCCI et al. 1998a; PAUW & PICAZO, 2008; WENZEL, 1995).

Em decorrência deste cenário, mudanças expressivas na epidemiologia das micoses hospitalares também têm sido observadas (FRIDKIN, 2005). Há consenso na literatura sobre o aumento na incidência das infecções fúngicas invasivas e alteração no espectro dos agentes etiológicos (ELLIS, 2001; GUERY et al., 2009a; RICHARDSON, 2005). Dentre essas infecções, aquelas produzidas por *Candida* spp. são as mais importantes causas de morbidade e mortalidade nos pacientes hospitalizados, representando quase 90% de todos os processos fúngicos nosocomiais (BILLE et al., 2005; ROSA et al., 2008; RUHNKE & MASCHMEYER, 2002). *Candida albicans* é responsável pela maioria das infecções, contudo, tem sido relatada a ocorrência de espécies não-*albicans* que, apesar de serem menos invasivas e virulentas, mostram menor sensibilidade aos antifúngicos (KLEPSEK, 2001; KULLBERG & OUDE-LASHOF, 2002). Outros fungos como *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., hifomicetos Dematiaceae e Zygomycota são também cada vez mais reconhecidos como fontes de infecção hospitalar (NUCCI & MARR, 2005; RICHARDSON & LASS-FLÖRL, 2008).

Essa maior incidência de micoses invasivas tem sido acompanhada pelo fenômeno de resistência aos antifúngicos (PERFECT, 2004; SWINNE et al., 2009). Os primeiros relatos de resistência ocorreram na década de 80 em pacientes com candidíase mucocutânea crônica tratados com cetoconazol por longos períodos de tempo (ODDS, 1993). No entanto, o desenvolvimento de resistência aos antifúngicos azólicos parece ter sido, efetivamente, resultado do prolongado e repetido uso de fluconazol para o tratamento da candidíase oral e esofágica em pacientes com aids com baixa contagem de células CD4+, no período anterior ao surgimento da terapia antiretroviral de alta potência (CASALINUOVO et al., 2004; SANGLARD, 2002). Mais recentemente, o emprego maciço de antifúngicos em tratamentos empíricos e profilaxia de pacientes neutropênicos trouxe novo contexto clínico ao problema da resistência aos antifúngicos (HOSPENTHAL et al., 2004; MELLADO et al., 2002; NUCCI & PERFECT, 2008).

1.2.1. FATORES DE RISCO PARA INFECÇÕES FÚNGICAS HOSPITALARES

O estado de imunocomprometimento ocorre quando a integridade do sistema de defesa do hospedeiro é rompida (CARNEIRO-SAMPAIO & COUTINHO, 2007; PIZZO, 1999). Células fagocitárias do sistema polimorfonuclear, imunidade mediada por linfócitos T e barreiras físico-químicas da pele e mucosas são as principais defesas contra as infecções fúngicas (FAVERO, 2000). Diversos fatores (Unidade de tratamento intensivo [UTI], acesso vascular, neutropenia e transplantes) podem produzir ingerências nesses mecanismos de defesa e predispor os indivíduos a processos micóticos (TORRES-RODRÍGUEZ, 1996). Contudo, o risco de infecção é determinado pela interação entre fatores epidemiológicos, grau de imunossupressão e exposição a fungos potencialmente patogênicos no ambiente hospitalar (BOW, 1998).

1.2.1.1. UNIDADE DE TRATAMENTO INTENSIVO

A ecologia dos organismos patogênicos e o tipo de infecção predominante variam entre as diferentes unidades de tratamento intensivo (unidade semi-intensiva, UTI cirúrgica, UTI neonatal, unidade de traumatologia-ortopedia, unidade de queimados, unidade coronariana, unidade respiratória). O padrão epidemiológico das infecções observadas em UTI é resultado da conjugação de fatores relacionados à condição médico-cirúrgica dos pacientes e o grau de intervenção iatrogênica (PETRI et al., 1997; RICHARDS et al., 2003). Unidades de terapia intensiva representam um ponto de interface entre os mais graves pacientes, que recebem terapias múltiplas e agressivas, e os mais resistentes patógenos, que são selecionados pelo uso de terapia antimicrobiana prolongada (LEONE et al., 2003; MEERSSEMAN et al., 2007). No ambiente hospitalar, os pacientes de unidades de terapia intensiva são os mais vulneráveis exatamente porque são aqueles cujo manejo é feito a partir de cateteres intravasculares, sondas vesicais e ventilação mecânica, entre outros métodos invasivos, o que aumenta o risco de infecção oportunista (PETRI et al., 1997; SCHELENZ, 2008). Infecções fúngicas invasivas ou disseminadas são importantes complicações em indivíduos imunocomprometidos e não-imunocomprometidos que recebem cuidados especiais em unidades de terapia intensiva (CORNWELL et al., 1995; VICENT et al., 1998). O aumento da incidência das micoses invasivas em pacientes de UTI está associado, em geral, à quimioterapia antineoplásica, terapia

imunossupressora, antibioticoterapia de largo-espectro, uso de dispositivos de acesso e próteses, cirurgias abdominais e ortopédicas complexas, extensas queimaduras, doenças degenerativas e metabólicas, prematuridade e exposição ambiental e tempo de permanência na unidade (HOLZHEIMER & DRALLE, 2002; PLAYFORD et al., 2008).

1.2.1.2. ACESSO VASCULAR

A cateterização é um dos aspectos mais importantes da moderna prática médica, especialmente, no caso de pacientes com neoplasias, pacientes cirúrgicos e transplantados e outros pacientes críticos de UTI, que requerem fluídos, produtos hematológicos, múltiplas drogas, suporte nutricional e monitorização (O'GRADY et al., 2002). Contudo, tais dispositivos expõem os pacientes a complicações infecciosas de natureza local, sistêmica ou metastásica (GREENE, 1996; RAMASETHU, 2008). Essas infecções podem resultar em aumento dos percentuais de mortalidade, maior tempo de permanência hospitalar e custos médicos mais elevados (CHENG et al., 2005; MOSS & ELLIOT, 1997; PITTET et al., 1997). A incidência de infecção relacionada a cateteres varia consideravelmente com a composição do material e tipo de dispositivo, tempo de permanência, frequência de manipulação, capacidade de aderência ao cateter e fatores de virulência dos patógenos e condição clínica dos pacientes (GREENE, 1996; O'GRADY et al., 2002). As mais graves infecções estão associadas a cateteres venosos centrais (TACCONELLI et al., 1997). Esses dispositivos são a maior fonte de infecção no ambiente hospitalar, sendo responsáveis por mais de 90% de todas as infecções da corrente sanguínea (CALANDRA et al., 2005; GOWARDMAN et al., 1998). O acesso venoso central pode ser necessário por longos períodos de tempo e o cateter pode ser manipulado várias vezes ao dia para administração de substâncias, avaliação hemodinâmica e obtenção de amostras para análise laboratorial, aumentando a possibilidade de eventos infecciosos ocorrerem (MAKI et al., 2006; O'GRADY et al., 2002). Apesar de apresentarem comparativamente menor incidência de infecção e estarem mais relacionados à ocorrência de flebites, cateteres venosos periféricos têm consideráveis taxas de morbidade em decorrência de sua ampla utilização clínica (GREENE, 1996; SAFDAR & MAKI, 2005). Cateteres urinários para monitorização da diurese são também importantes causas de infecção hospitalar, apresentando percentuais de morbi-mortalidade e custos hospitalares significativos (HA

& CHO, 2006; LEONE et al., 2003). *Candida* spp. têm sido isolada em 8% dos casos de infecção nosocomial da corrente sangünea e quase a metade dos isolados é de *Candida não-albicans*, incluindo *Candida glabrata* e *Candida krusei* (GALBÁN & MARISCAL, 2006; O'GRADY et al., 2002). Nesses achados, a emergência de cepas resistentes às drogas antifúngicas tem sido uma tendência (NGUYEN et al., 1996; PFALLER et al, 1998a, 1998b).

1.2.1.3. NEUTROPENIA

A neutropenia decorrente de processos patológicos ou induzida por medicamentos é, provavelmente, um dos mais importantes fatores de risco para a aquisição de infecções invasivas (ANAISSIE, 1992), tendo em vista que a função primária dos neutrófilos é produzir uma resposta contra a agressão de agentes infecciosos (MALECH & GALLIN, 1987). O papel da neutropenia na predisposição às infecções foi inicialmente demonstrado por Bodey et al. (1966). Através de estudos conduzidos a partir da relação entre o número de leucócitos circulantes e a incidência de infecção em pacientes com leucemia aguda, estes autores encontraram taxas de infecção de 14% para contagens de 500-1000 neutrófilos/mm³ e de 24-60% para contagens de 100 neutrófilos/mm³. Condicionando inversamente estas taxas de infecção, estavam o tempo de duração da neutropenia e a velocidade de queda dos neutrófilos (BODEY et al., 1966; DALE et al., 1979). Atualmente, contagens de neutrófilos menores do que 500 células/mm³ por mais de 10 dias é considerado o limite crítico para o desenvolvimento de infecções graves (ASCIOGLU et al., 2002; ROSA et al., 2008). Apesar de serem altamente susceptíveis às micoses invasivas, nem todos os pacientes neutropênicos apresentam o mesmo nível de risco (RÜPING et al., 2008; WALSH et al., 1994). Na verdade, os indivíduos com neutropenia representam uma população heterogênea com uma variedade de aspectos epidemiológicos que determinam o nível de susceptibilidade, tais como o tipo de doença de base (neoplasias sólidas ou hematológicas) e seu estado clínico (processo em remissão ou progressivo), tipo de tratamento para o processo de base (quimioterapia citotóxica, radioterapia ablativa, corticoterapia antibioticoterapia de largo espectro), tipo de intervenção hospitalar/iatrogênica (grandes cirurgias, transplantes de órgãos sólidos e medula óssea, cateterização, nutrição parenteral) e exposição

ambiental (CARRERAS & MENSA, 2005; ELLIS, 2008; FAVERO, 2000; GALAPERALTA et al., 2005; PICAZO, 2004).

1.2.1.4. DOENÇAS NEOPLÁSICAS

Infecções invasivas são também causas comuns de morbidade e mortalidade em pacientes com diversos tipos de processos neoplásicos (BODEY, 2005; GROLL & WALSH, 2002b; SPIRO et al., 2008). Como em outras patologias graves, o risco de infecção nesses pacientes está diretamente relacionado ao grau de comprometimento do seu sistema de defesa (AL-REZQI et al., 2008; PRATT et al., 2007; RUHNKE & MASCHMEYER, 2002). Além do próprio estado consumptivo que muitos processos malignos podem produzir, as defesas do hospedeiro podem ser seriamente abaladas pela quimioterapia anti-tumor (LYMAN, 2006; POUND et al., 2008). Regimes citostáticos empregados para o tratamento de tumores sólidos e hematológicos são administrados durante muitos meses de maneira cíclica, levando a um significativo risco de desenvolvimento de grave infecção, devido aos efeitos mielotóxicos desses protocolos terapêuticos (BOW, 1998). A maioria das infecções oportunistas ocorre em associação com a quimioterapia antineoplásica e a neutropenia e estão tanto relacionadas com os organismos da microbiota, que colonizam naturalmente a pele e as membranas mucosas, quanto com os organismos hospitalares (NETH et al., 2005; VISCOLI et al., 2005). Os quimioterápicos citotóxicos afetam todos aqueles tecidos com alto grau de replicação, incluindo pêlos, gônadas, medula óssea e células epiteliais do trato gastro-intestinal e genito-urinário (SHAW et al., 1979; SLAVIN et al., 1978). Mucosites e lesões ulcerativas da orofaringe, esôfago e intestinos induzidas por terapia citostática têm sido relacionadas à patogênese das infecções oportunistas por fungos colonizantes em pacientes com processos oncohematológicos (BOW et al., 1995; CLARKSON et al., 2008; VOLPATO et al., 2007). Está bem estabelecido que a utilização de antibióticos de largo espectro para prevenção e tratamento de complicações bacterianas, particularmente, aqueles que agem sob altas concentrações no trato gastro-intestinal e que exibem boa atividade contra bactérias anaeróbias gram-negativas, resulta em substancial aumento da população endógena de *Candida* spp. (ANAISSIE, 1992; SEGAL & FREIFELD, 2007). Esse aumento, somado à destruição da barreira epitelial que se segue à quimioterapia antineoplásica, tem sido considerado um

importante fator para o desenvolvimento de candidemias de aquisição endógena (CHENG et al., 2005; SIMS et al., 2005; TIRABOSHI et al., 2000).

1.2.1.5. TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS E MEDULA ÓSSEA

O transplante de órgãos tem se tornado uma importante opção terapêutica para muitas patologias humanas (MONTEJO, 2002). Atualmente, através de modernas técnicas cirúrgicas, podem ser transplantados diversos órgãos, tais como rins, fígado, pâncreas, pulmão, coração e coração-pulmão (DICTAR et al., 2000). Contudo, a rejeição ao transplante e os processos infecciosos são as principais causas de morbidade e mortalidade (KALIL et al., 2007; FISHMAN, 2007). A incidência de infecção no período pós-transplante é determinada por diferentes fatores que fazem com que o paciente submetido a um transplante se torne especialmente susceptível, a saber: tipo de órgão transplantado, estado pré-operatório do paciente, grau de neutropenia, regime quimioterápico imunossupressivo e esteróides, terapia antirrejeição suplementar, antibioticoterapia múltipla e prolongada, profilaxia antifúngica, presença de co-infecção por bactérias e vírus imunomoduladores, dispositivos para suporte e acesso, surgimento de complicações médico-cirúrgicas intra e pós-operatórias e exposição ambiental (CUELLAR-RODRÍGUEZ & SIERRA-MADERO, 2005; DANZIGER-ISAKOV, 2007; GARRIDO et al., 2006). Ocasionalmente, o próprio órgão transplantado pode ser fonte de infecção (LEN & PAHISSA, 2007; SINGER et al., 2008). Apesar dos processos bacterianos e virais ocorrerem com maior frequência, aqueles causados por fungos estão associados com uma alta taxa de mortalidade (SILVEIRA & HUSAIN, 2007). Infecções fúngicas invasivas têm sido relatadas em todos os tipos de transplantes de órgãos e sua prevalência varia em rins de 2-14%, em pâncreas ou pâncreas-rins de 18-38%, em fígado de 2-42%, em coração de 0-32%, em pulmão ou coração-pulmão de 15-35% e em intestino delgado de 33-53% (LORTHOLARY & DUPONT, 1997). As espécies fúngicas e o tipo de infecção diferem com o órgão transplantado e área geográfica. Todavia, *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. são responsáveis por mais de 80% dos casos (MANUEL & KIBBLER, 1998; MARIK, 2006).

O transplante de medula óssea (TMO) autólogo ou alogênico é também uma bem consolidada modalidade terapêutica para uma variedade de processos malignos e não malignos de natureza intrínseca ou adquirida. Leucemias, linfomas, mieloma

múltiplo, anemia aplásica, síndromes mielodisplásicas, talassemia, síndromes metabólicas e genéticas são algumas das patologias para as quais o TMO está indicado. Neuroblastoma, sarcoma de Ewing, tumor de Wilms e leucemia mielomonocítica juvenil são situações em que se realiza o TMO em oncologia pediátrica. O TMO é também opção para a terapia de tumores de células germinativas, tumores primários do sistema nervoso central como gliomas e glioblastomas e diferentes tipos de sarcoma (LEATHER & WINGARD, 2001; MCSWEENEY & STORB, 1996; WAKAYAMA et al., 2002). Não obstante novas tecnologias médico-cirúrgicas, farmacológicas e de diagnóstico estarem disponíveis e permitirem procedimentos de transplantes mais seguros e efetivos, a neutropenia, a doença enxerto contra hospedeiro (DECH), o desenvolvimento de rejeições e o surgimento de infecções são as principais fontes de falhas no tratamento (BJORKLUND et al., 2007; BADDLEY et al., 2001; MESSINA et al., 2008; VILLASÍS-KEEVER & MOSQUEDA, 2005). A ocorrência de infecções após o transplante de medula óssea é esperada devido à imunossupressão produzida pelos regimes de condicionamento mieloablativos e corticoterapia. A duração e o grau de neutropenia variam consideravelmente com o tipo de transplante e determinam a frequência e o tipo de infecção (CAMPS, 2008; STEFANIAK et al., 2001; WINGARD, 1999). Infecções fúngicas são as mais importantes causas de morbidade e mortalidade após o transplante de medula óssea (BROWN, 2004; MARR et al., 2002). Com a melhoria no controle das infecções por citomegalovírus, as micoses invasivas tornaram-se preponderantes. Os patógenos fúngicos mais prevalentes são *Candida* spp. e, em prolongada neutropenia, *Aspergillus* spp. (CASTAGNOLA et al., 2008; RAMAN & MARIK, 2006). Mucosites, antibióticos, cateteres e dispositivos de acesso vascular e infecção por outros patógenos são também fatores predisponentes para infecções fúngicas oportunistas, nesse grupo de pacientes (BROWN, 2004; RÜPING et al., 2008).

1.2.2. INFECÇÕES HOSPITALARES POR *Candida* spp.

A capacidade do fungo em causar infecção parece ser um fenômeno acidental, estando os processos infecciosos, primariamente, relacionadas à condição de saúde do hospedeiro e a exposição ao ambiente (WINGARD, 1999). O meio ambiente é o principal reservatório fúngico, por isso, o contágio entre indivíduos é menos frequente e

a maioria das infecções são contraídas a partir de fontes na natureza ou microbiota (LEVITZ, 1992; WINGARD, 1999).

A infecção fúngica ocorre pela inter-relação de fatores associados tanto ao hospedeiro quanto ao fungo. Objetivamente, o fungo tem que ser capaz de superar o sistema de defesa do hospedeiro. Para tanto, esses patógenos devem possuir a habilidade de crescimento à temperatura de 37°C, aderência e colonização de superfícies e órgãos, adaptação fenotípica e dimorfismo, produção de toxinas (endotoxinas) e enzimas (proteases, fosfolipases e oxi-redutases), interação com hormônios e seqüestro de metais pesados (HENRIQUES et al., 2006; MOHAN-DAS & BALLAL, 2008; RAPPLEYE & GLODMAN, 2006; VARTIVARIAN, 1992).

Como mencionado anteriormente, as micoses de caráter sistêmico surgem frequentemente em pacientes que apresentam falhas em seu sistema de defesa. A proteção contra as infecções invasivas é também multifatorial e dependente de mecanismos não-específicos e específicos (CLEMONS & STEVENS, 2001; FIDEL, 2007). A defesa não-específica inclui a barreira física fornecida pela pele e membranas mucosas íntegras, níveis de pH, competição da microbiota por espaço e nutrientes, secreções naturais e mecanismos de remoção mucociliar, *status* hormonal, fatores séricos não-ímmunes como os quelantes de ferro e resposta inflamatória com ação de neutrófilos e macrófagos (MARÓDI & JOHNSTON, 2007; WANKE et al., 2000). A defesa adquirida compreende basicamente a imunidade celular mediada por linfócitos T (HOHL et al., 2006). Os fatores humorais como anticorpos, complemento e outras proteínas e peptídeos séricos parecem contribuir facilitando o reconhecimento imune, contudo, a importância desses componentes sobre a lise celular ainda é controversa (BLANCO & GARCÍA, 2008; LEVITZ, 1992).

1.2.2.1. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As candidíases são um conjunto de infecções que podem ser classificadas como cutâneo-mucosas e invasivas. As candidíases invasivas (hematogênicas) incluem as candidemias, as candidíases disseminadas agudas e crônicas e aquelas localizadas em um único órgão (KULLBERG & OUDE-LASHOF, 2002; ROSA et al., 2008). A incidência de infecções por *Candida* spp. tem aumentado na maioria dos hospitais, sendo a candidemia a forma de infecção mais comum e associada a elevadas taxas de

mortalidade (PFALLER & DIEKEMA, 2007). Dentre as mais de 100 espécies de *Candida* conhecidas, somente algumas poucas têm sido isoladas de casos humanos. Nesse contexto, destacam-se *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Todas essas espécies podem apresentar manifestações clínicas semelhantes, contudo, a gravidade e as opções terapêuticas podem diferir (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003; PFALLER, 1994).

Candida spp. são parte integrante da microbiota e sua patogenicidade resulta essencialmente das alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro humano (SENET, 1997). Os principais componentes envolvidos na patogênese das candidíases invasivas são o aumento da colonização fúngica, a quebra da barreira cutâneo-mucosa e o comprometimento do sistema imunológico (KOCH et al., 2005; MURRAY et al., 2008). A maioria das infecções disseminadas tem sua origem no trato gastrointestinal, contudo, a pele e o trato genito-urinário podem ser também fontes de infecção (BENDEL, 2003; NUCCI & ANAISSIE, 2001; VILANOVA & CORREIA, 2008). Especialmente no caso das infecções associadas a cateteres vasculares, existem algumas evidências de que a *C. parapsilosis* utiliza preferencialmente a pele como porta de entrada (GREENE, 1996).

A colonização prévia da pele e mucosas oral, intestinal e vaginal por espécies de *Candida* é um elemento crítico para o desenvolvimento de infecções invasivas (FRIDKIN & JARVIS, 1996; HOLZHEIMER & DRALLE, 2002). Cerca de 80% dos pacientes hospitalizados apresentam suas membranas mucosas colonizadas por *Candida* spp. e, dependendo da gravidade dos processos de base e do grau de intervenção iatrogênica, os níveis de colonização podem ser extremamente elevados (JARVIS, 1996; ODDS, 1987; THAWEBON et al., 2008). A destruição das mucosas do trato digestivo do hospedeiro facilita a translocação de *Candida* spp. da luz intestinal para os vasos sangüíneos, levando à infecção (KULLBERG & OUDE-LASHOF, 2002). Apesar do principal reservatório nosocomial de *Candida* spp. ser o próprio paciente hospitalizado, a aquisição exógena dessas leveduras também tem sido documentada (PFALLER, 1995a; VINCENT et al., 1998). A transmissão horizontal de *Candida* spp. pode ocorrer entre pacientes ou através das mãos dos profissionais de saúde (BONASSOLI et al., 2005; CANTÓN et al., 2001). Cerca de 17%-75% do pessoal médico e paramédico das unidades de tratamento intensivo são portadores de *Candida* spp., o que os tornam também importantes reservatórios de infecção nosocomial (MAHAYNI et al., 1995; VAN ASBECK et al., 2007). Outras fontes exógenas de *Candida* spp. estão relacionadas à infusões, medicações, biomateriais, dispositivos de

acesso e superfícies do ambiente hospitalar contaminados (NÁGARAJA , 2005; ROONGPISUTHIPONG et al., 2007).

Uma variedade de fatores de risco bem conhecidos determina a incidência de candidíases e candidemias na população de pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes gravemente enfermos (HOLZHEIMER & DRALLE, 2002; WRIGHT & WENZEL, 1997). O emprego de antibiótico de amplo espectro, principalmente, aqueles com atividade anaeróbica e glicopeptídeos, por longos períodos de tempo, em tratamentos profiláticos, pode determinar modificações na microbiota das membranas mucosas, permitindo a proliferação de *Candida* spp. (COTTEN et al., 2006; VINCENT et al., 1998). A depleção de polimorfonucleares, bem como a produção de mucosites e a destruição da mucosa do trato digestivo pela quimioterapia e radioterapia anti-tumor também contribuem para a multiplicação de *Candida* spp. e invasão da corrente sangüínea (SENET, 1997; YEH et al., 2007). Os imunossupressores e corticóides utilizados como parte da terapia antineoplásica ou para tratamento da DECH podem levar a prejuízos da função dos neutrófilos, monócitos e macrófagos circulantes e comprometer de maneira importante a imunidade mediada por célula T, resultando em aumento do risco de desenvolvimento de micoses profundas (NEOFYTOS et al., 2009; WALSH et al., 1996). As cirurgias intra-abdominais podem abrir rotas de infecção a partir de interrupções na integridade da mucosa gastrointestinal e permitir a entrada de *Candida* spp. no sistema vascular (KULLBERG & OUDE-LASHOF, 2002). Outras vias de infecção podem ser criadas pelo cateterismo, que além de determinar injúrias no tegumento, fornece um substrato composto por elementos do plasma que produzem um suporte para colonização e proliferação de *Candida* spp., nutrição parenteral total, transfusões de sangue, diálises peritoneais e hemodiálises e ventilação assistida (FRIDKIN & JARVIS, 1996; SENET, 1997). A gravidade da doença de base e a gravidade do estado clínico devem ser também consideradas na predisposição à infecção por *Candida* spp. Desse modo, elevadas pontuações (≥ 20) na escala APACHE II (*Acute physiology and chronic health evaluation II*), que mede febre, hipotensão e outros parâmetros de infecção, têm emergido como um fator de risco importante naqueles pacientes em UTI (COLOMBO et al., 2007; NUCCI et al., 1998a).

Diversos eventos clínicos são distingüidos na patologia das infecções por *Candida* spp. Candidíases orofaríngeas podem ser facilitadas por regimes de quimioterapia e radioterapia que levam à ocorrência de mucosites (OLIVEIRA-LULA et al., 2007). O uso prolongado de antimicrobianos também contribui para o sobre-crescimento de *Candida* spp. (RICHET et al., 1991; SAMONIS et al., 1993). As

infecções de mucosa orofaríngea são mais frequentes em pacientes com disfunções de células T, como aquelas observadas nos linfomas e aids (PEDREIRA et al., 2008). *C. albicans* e *C. dubliniensis* são as espécies responsáveis pela maioria dos casos de candidíase oral cujo principal sintoma é o *thrush*, classicamente caracterizado pela presença de placas esbranquiçadas e superfície eritematosa e hemorrágica na mucosa. Podem estar presentes ainda dor, sensação de queimação e disfagia (EGUSA et al., 2008; WRIGHT & WENZEL, 1997). Depois da orofaringe, o esôfago é a região do trato gastrointestinal mais acometida por infecções por *Candida* spp. A prevalência de candidíases esofágicas tem aumentado devido à maior frequência em pacientes HIV + e, mais recentemente, em pacientes transplantados, pacientes com neoplasias e pacientes gravemente imunocomprometidos (HAGE et al., 2002; MULHALL & WONG, 2003; MULLAOGLU et al., 2007). *C. albicans* e *C. tropicalis* são as espécies mais isoladas de infecções no esôfago. Os fatores que determinam esta condição estão relacionados à capacidade patogênica das cepas fúngicas, alterações na barreira físico-química e imunológica da mucosa, neutropenia, esofagites prévias ou concomitantes por herpes vírus, citomegalovírus e bactérias (VASQUEZ & SOBEL, 2002). A infecção esofágica pode ser a primeira manifestação clínica em pacientes com aids. A alta incidência nesse grupo de pacientes indica o papel crítico da defesa celular na proteção da mucosa do esôfago contra a invasão de espécies de *Candida* (WRIGHT & WENZEL, 1997). Normalmente, a esofagite por *Candida* spp. cursa com disfagia, odinofagia e dor retroesternal. Em alguns casos, dor epigástrica é o sintoma dominante. Na grande maioria das vezes, a candidíase esofágica ocorre de maneira independente no terço distal do esôfago, sendo raramente uma extensão da infecção da orofaringe (VASQUEZ, 1999). A candidíase de laringe (epiglote), ao contrário das infecções orais e esofágicas, são pouco frequentes e os sintomas associados a essa condição são estridor, odinofagia e disfagia (HIRSHOREN et al., 2008).

A candidíase do trato urinário é um achado relativamente raro em indivíduos normais. Todavia, a incidência de candidúria tem aumentado dramaticamente entre os pacientes hospitalizados. As estratégias para o manejo de pacientes com candidúria devem levar em conta a presença de outros fatores como anormalidades anatômico-clínicas do trato genito-urinário (obstrução do fluxo urinário, tuberculose), diabetes, transplante renal e febre (KAUFFMAN, 2005; NUCCI, 2000; SAFDAR et al., 2005). Também devem ser considerados antibioticoterapia, imunossupressores, radioterapia, sondas urinárias, cateteres endovenosos, sexo e senilidade (GULER et al., 2006; LUNDSTROM & SOBEL, 2001). *C. albicans* é o patógeno mais frequentemente

identificado de culturas de urina (>50%), seguido por *C. glabrata* (15,6%) e outras *Candidas* não-*albicans* (KAUFFMAN et al., 2000). Em pacientes hospitalizados que apresentam cateteres, a candidúria assintomática é uma condição frequente. Esses pacientes normalmente não exibem nenhum sintoma associado à infecção (BUKHARY, 2008; LUNDSTROM & SOBEL, 2001). Processos sintomáticos do trato urinário inferior (cistites), apesar de pouco frequentes, podem cursar clinicamente com irritação vesical, disúria, hematúria e sensibilidade suprapúbica (VASQUEZ & SOBEL, 2002). Pacientes com infecção do trato urinário superior podem apresentar pielonefrites ascendentes e urosepsis. Febre, dor costovertebral e leucocitose estão normalmente presentes. A infecção ascendente quase sempre ocorre devido à obstrução urinária e estase, especialmente em pacientes com diabetes ou nefrolitíase. A pielonefrite por *Candida* spp. pode complicar em decorrência de doença supurativa local, levando à pionefrose e formação de abscessos. A principal complicação, contudo, é a bola fúngica produzida pela obstrução de ureter ou pelve (COLOMBO et al., 2008; LUNDSTROM & SOBEL, 2001; TRABOULSI et al., 2004). A infecção primária dos rins ou aquela secundária à candidíase hematogênica apresenta febre elevada, instabilidade hemodinâmica e variado quadro de insuficiência renal. Hemoculturas positivas e envolvimento ocular e cutâneo podem sugerir candidíase disseminada com manifestação renal (COLOMBO & GUIMARÃES, 2007; LUNDSTROM & SOBEL, 2001; VASQUEZ & SOBEL, 2002).

As candidíases disseminadas, usualmente classificadas como infecções por *Candida* spp. em dois ou mais órgãos não contíguos, podem ocorrer em função do aumento da colonização fúngica, ruptura da barreira cutâneo-mucosa e perda dos mecanismos de controle imunológico que previnem a disseminação e proliferação dos patógenos a órgãos e tecidos profundos (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2002). O grupo de risco compreende recém-nascidos, pacientes cirúrgicos, pacientes com queimaduras de segundo e terceiro grau, pacientes diabéticos, pacientes com câncer, pacientes submetidos a transplantes, pacientes com neutropenia grave e pacientes com acesso vascular (NUCCI et al., 1998a; SAFDAR et al., 2004). *C. albicans* (58%), *C. tropicalis* (25%), *C. parapsilosis* (15%) e *C. glabrata* (6,0%) são os agentes etiológicos mais prevalentes (BANERJEE et al., 1991; BECK-SAGÉ & JARVIS, 1993). A infecção disseminada pode acometer virtualmente qualquer sítio anatômico, produzindo, por isso, diferentes quadros mórbidos (BODEY et al., 1993). O espectro desses processos inclui tanto uma apresentação aguda quanto crônica (WALSH et al., 1996). A candidíase aguda é de ocorrência súbita e progressiva e caracterizada por fungemia, febre persistente ou recorrente, a despeito de antibioticoterapia, lesões

tegumentares, endoftalmites, infecção de múltiplos órgãos, particularmente, em rins, cérebro e coração, além de choque séptico. Pacientes neutropênicos com leucemia ou linfomas compõem um importante grupo de risco. Normalmente, essa condição surge como uma complicação da terapia antineoplásica (FRANCIS & WALSH, 1992). Altas taxas de mortalidade têm sido relatadas pelo fato das hemoculturas serem usualmente negativas para *Candida* spp., o que dificulta o estabelecimento do diagnóstico e produz atrasos no tratamento. Assim, a ocorrência de infecções oculares e lesões nodulares cutâneas, por estarem bem caracterizadas na candidíase disseminada aguda, são importantes parâmetros clínicos (COLOMBO et al., 2008; MAYS et al., 2006; MEHTA et al., 2007).

A candidíase disseminada crônica ou hepatoesplênica, por sua vez, é de curso lento, estendendo-se por muitos meses (ANAISSIE et al., 1991). Tipicamente, o paciente apresenta uma enfermidade hematológica de base e adquire a infecção após a quimioterapia mielossupressora. Abscessos profundos no fígado, baço, rins e pulmões têm sido descritos. Diferentemente da candidíase aguda, a associação com fungemias, falências múltiplas de órgãos e hipotensão são menos frequentes na doença crônica (PAGANO et al., 2002; WALSH et al., 1996). A candidíase crônica é estabelecida durante o período em que o paciente está neutropênico e torna-se clinicamente percebida na fase de reconstituição imunológica. O paciente continua apresentando febre persistente não responsiva a antibioticoterapia e desconforto abdominal, mesmo com contagens aumentadas de neutrófilos (MASOOD & SALLAH, 2005). As lesões em órgãos internos estão radiologicamente ocultas na fase neutropênica, mas passam a ser evidentes nos métodos de investigação por imagem, após a correção da neutropenia. O isolamento de *Candida* spp. de material de biópsia ou sítios estéreis confirma o processo infeccioso (KONTNY et al., 2007; OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2002). A candidíase disseminada crônica tem sido referida como candidíase hepatoesplênica pelo fato das lesões primárias serem encontradas no baço e no fígado, todavia, os aspectos clínico-patológicos desse processo claramente indicam que a infecção envolve diversos órgãos (ANAISSIE et al., 1991; HÜBEL et al., 2004).

As candidemias têm sido definidas como o isolamento de *Candida* spp. de pelo menos uma hemocultura cujos os espécimens de sangue foram obtidos de pacientes com sinais clínicos de sepsis (febre, calafrio) e sem evidências de comprometimento de órgãos internos (BODEY et al., 2002). Dentre as infecções fúngicas nosocomiais, as

candidemias são preponderantes. Altas taxas de mortalidade bruta (>60%) e atribuída (38%) têm sido descritas para essas infecções (COLOMBO et al., 2007; GUDLAUGSSON et al., 2003). Contudo, candidemias persistente, que se desenvolvem durante a terapia antifúngica sistêmica, podem apresentar percentuais de mortalidade de quase 80% (UZUN et al., 2001). Os pacientes de risco são aqueles submetidos à antibioticoterapia, terapia com imunossupressores, quimioterapia e radioterapia, dispositivos de acesso, cirurgias extensas e transplantes e longos períodos de internação (LUNEL et al., 1999; NUCCI & COLOMBO, 2002). O papel do trato gastrointestinal e dos cateteres vasculares como fonte de infecção da corrente sangüínea por *Candida* spp. está bem estabelecido nesses pacientes (HOLZHEIMER & DRALLE, 2002).

1.2.2.2. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Os sinais e sintomas de infecção fúngica invasiva, frequentemente, são inespecíficos e protocolos micológicos simples podem não ser suficientes para o estabelecimento do diagnóstico, o que faz com que a caracterização dos processos micóticos em pacientes graves seja dificultada (DONNELLY, 2002). Em decorrência disso, um conjunto de definições para o reconhecimento e diagnóstico de micoses oportunistas foi proposto por um Comitê Internacional de Consenso e graus de certeza ou probabilidade foram estabelecidos para estas infecções (ASCIOGLU et al., 2002)

Fatores relacionados ao hospedeiro, fatores clínicos e fatores microbiológicos (evidência micológica) foram os elementos empregados na padronização dessas definições. Para os fatores do hospedeiro são descritos neutropenia, febre persistente, antibioticoterapia, corticoterapia, imunossupressão e DECH. Associados aos fatores clínicos estão as infecções do trato respiratório inferior, infecções do sistema nervoso central e seios paranasais e infecções disseminadas. Com relação aos fatores microbiológicos, são requeridos exame microscópico direto e cultura positivos e/ou resultados positivos para antígenos fúngicos (DONNELLY, 2002; HOLZHEIMER & DRALLE, 2002).

Com base nesses fatores, os seguintes níveis de probabilidade de infecção fúngica foram estabelecidos: *infecção provada*, *infecção provável* e *infecção possível*. Na infecção provada, os três elementos (fatores do hospedeiro, fatores clínicos e

fatores microbiológicos) estão presentes e o mais alto grau de certeza é dado pela demonstração tecidual do agente fúngico. Nessa categoria, o diagnóstico de fungemias e outras micoses invasivas pode ser obtido de forma definitiva. Todavia, nas infecções provável e possível apenas é sugerida a ocorrência de processos sistêmicos. Para a determinação de uma infecção provável, estão também presentes os três fatores, porém, o nível de consideração é menos profundo. No grupo das infecções possíveis, estão presentes os fatores do hospedeiro, entretanto, um dos outros dois fatores (fatores clínicos ou fatores microbiológicos) pode estar ausente (ASCIOGLU et al., 2002; DONNELLY, 2002).

A despeito do esforço para o reconhecimento dos processos oportunistas, o diagnóstico micológico em pacientes hospitalizados continua sendo crítico. As manifestações clínicas de infecção são, frequentemente, variáveis e a distinção entre doença e colonização fúngicas, normalmente, apresenta certa dificuldade. Além disso, a coleta de espécimens clínicos pode não ser possível, especialmente quando o foco infeccioso é desconhecido. Em considerável número de casos, inclusive, procedimentos invasivos de diagnóstico não podem ser realizados em pacientes imunocomprometidos devido à debilidade orgânica que muitos apresentam. Com frequência, culturas de sangue e escarro negativas e testes sorológicos inconclusivos são os achados laboratoriais. Assim, a febre persistente ou desenvolvida durante a antibioticoterapia de amplo espectro é, comumente, o único indicador de doença fúngica (KOCH et al., 2006; STEVENS, 2002).

Classicamente, no entanto, a base do diagnóstico definitivo das infecções por *Candida* spp. é a detecção do patógeno na amostra clínica e sua recuperação em cultura (PERLROTH et al., 2007). A candidíase orofaríngea pode ser diagnosticada através da visualização microscópica dos elementos da *Candida* spp. (células de levedura, pseudohifas e hifas verdadeiras) nas lesões pseudomembranosas. No caso da candidíase esofágica, o procedimento de escolha é a endoscopia com biópsia (VINCENT et al., 1998; WILCOX & SCHWARTZ, 1996). O tipo de meio de cultura utilizado depende do sítio de infecção. Uma combinação de meios com e sem antimicrobianos é empregada para assegurar o crescimento do agente fúngico e diminuir a contaminação (O'SHAUGHNESSY et al., 2003). Como *Candida* spp. é um organismo da microbiota do trato gastrointestinal, a observação tecidual e o isolamento em cultura, frequentemente, são insuficientes para a determinação da etiologia, pois essas provas laboratoriais não distinguem entre o fungo patogênico e o comensal.

Assim, o aspecto da lesão e a resposta ao tratamento são necessários para a confirmação do diagnóstico (EPSTEIN & POLSKY, 1998; GUERY et al., 2009a).

De maneira geral, também o diagnóstico de candidíase sistêmica apresenta certo nível de complexidade. A documentação de uma infecção invasiva por *Candida* spp. é obtida por meio de cultura positiva de sangue, cultura positiva de órgãos, cavidades e fluidos corporais estéreis e evidência clínico-radiológica de doença disseminada (KOSMIN & FEKETE, 2008; MARIE, 2000). A impossibilidade de obtenção destes dados pode levar ao fracasso diagnóstico e erros de tratamento (YEO & WONG, 2002). Em populações de risco, no entanto, infecções por *Candida* spp. podem ser clinicamente reconhecidas pelo fato de determinados sinais e sintomas (lesões oculares e cutâneas) ocorrerem com frequência durante a candidemia (STEVENS, 2002). No caso das hemoculturas, mesmo apresentando baixa sensibilidade (<50%), elas ainda são importantes fontes para o isolamento de *Candida* spp. de processos sistêmicos e resultados positivos devem ser, criteriosamente, considerados (PEMÁN & ALMIRANTE, 2008; RODRÍGUEZ et al., 1997).

Com o problema das falhas no diagnóstico das candidíases invasivas pelas técnicas micológicas convencionais, a contribuição de técnicas não-culturais tem sido avaliada. Muitas delas, entretanto, apresentam resultados discrepantes e de difícil interpretação (MCLINTOCK & JONES, 2004; STEVENS, 2002). A baixa sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos com anticorpos para *Candida* spp. tem restringido a utilização dessas provas no imunodiagnóstico das infecções profundas. A detecção de uma resposta humoral em pacientes com candidíase invasiva é de emprego limitado, principalmente, porque a colonização por *Candida* spp. do trato digestivo ou de outros sítios anatômicos determina a produção de anticorpos em indivíduos sem infecção. Além disso, pacientes imunocomprometidos podem não apresentar quantidades detectáveis de anticorpos, apesar de demonstrarem a ocorrência de infecção por espécies de *Candida* (YEO & WONG, 2002).

Diferentemente das provas com anticorpos, a detecção de antígenos circulantes de *Candida* spp. tem mostrado potencial para o diagnóstico precoce. A enolase (proteína citoplasmática 48-kDa) tem sido empregada como um marcador para o diagnóstico de candidíase invasiva, pois está presente em pacientes com candidemia e não tem sido detectada em colonização por *Candida* spp. ou em indivíduos sem evidência de infecção (GROHSKOPF & ANDRIOLE, 1997; PONTÓN & PALACIOS, 2007). A β -(1-3)-D-glucana circulante também tem sido demonstrada em pacientes com

candidíase, todavia, resultados positivos não indicam, claramente, qual o agente fúngico envolvido (KEDZIERSKA et al., 2007). As mananas séricas são igualmente marcadores antigênicos que podem ser utilizados para o diagnóstico de infecção sistêmica. Correlações positivas entre mananas de *Candida* spp. circulantes e invasão tecidual têm sido observadas. O fato destes marcadores estarem pouco relacionados à candidemias transientes ou àquelas dependentes de cateter venoso central são argumentos favoráveis a sua utilização em provas imunológicas (GUERY et al., 2009a; RUHNKE & MASCHMEYER, 2002). O uso do D-arabinol como um outro marcador diagnóstico para as candidíases sistêmicas tem sido também proposto. *Candida albicans* produz grandes quantidades desse álcool em cultura e em tecido animal e humano com infecção invasiva. Altas concentrações de arabinol no soro são detectadas em pacientes com infecção, mas não naqueles com colonização (ELLEPOLA & MORRISON, 2005). Contudo, a determinação das espécies de *Candida* produtoras de arabinol *in vivo* e a padronização das metodologias de detecção condicionam a efetiva utilização desse marcador (RODRÍGUEZ et al., 1997; STEVENS, 2002; YEO et al., 2006).

Tendo em vista as altas taxas de detecção e a acurada capacidade de indentificação de espécies de *Candida* nas amostras clínicas, as técnicas de biologia molecular têm se convertido em promissores instrumentos de diagnóstico laboratorial das candidíases invasivas (ATKINS & CLARK, 2004; BADIEE et al., 2009; ODDS, 2003). Uma variedade de métodos baseados em ácidos nucléicos têm sido utilizados. A maioria dessas metodologias envolve a comparação de padrões que refletem um relacionamento molecular e são gerados a partir de alguma forma de eletroforese e interpretados através de colorações para DNA (GIL-LAMAIGNERE, 2003). A capacidade de identificar a mesma cepa em diferentes amostras, distingüir cepas não relacionadas geneticamente e demonstrar a distância filogenética entre cepas e espécies são características pontuais (LINTON et al., 2007; PFALLER, 1995b, PFALLER, 2000b). A escolha da técnica mais adequada, ou a sua utilização de maneira combinada, deve levar em conta o poder de tipagem, reprodutibilidade e discriminação, bem como o tipo de microrganismo e investigação molecular, facilidade de interpretação dos resultados, complexidade de execução da metodologia e tempo e custo das análises (ALEXANDER, 2002). Os métodos correntemente utilizados na identificação de *Candida* spp. incluem o polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) com hibridização (Southern Blot) ou amplificação (AFLP), cariotipagem em gel de eletroforese em campo pulsátil (PFGE) e técnicas baseadas na

reação em cadeia da polimerase (PCR) (BALAJEE et al., 2007; DASSANAYAKE & SAMARANAYAKE, 2003; GIL-LAMAIGNERE, 2003; TROST et al., 2004). Outras provas moleculares aplicadas à identificação de leveduras são os microarranjos de DNA, tipagem por sequenciamento de *multilocus* (MLST), ensaio de mobilidade de heteroduplex (HMA), polimorfismo de conformação de fita simples (SSCP-PCR) e reação em cadeia da polimerase *multiplex* (*Multiplex-PCR*) (GIL-LAMAIGNERE, 2003; MARKOULATOS et al., 2002; ODDS & JACOBSEN, 2008; RAMOS et al., 2006; WANG et al., 2008; YAN et al., 2008). Além da elevada sensibilidade e especificidade comparativamente às provas fenotípicas, essas metodologias têm demonstrado boa correlação com a evolução clínica e valores preditivos negativos em torno de 98% para candidíases disseminadas em pacientes neutropênicos (ALEXANDER, 2002; STEVENS, 2002).

Dentre as metodologias disponíveis, a técnica da *multiplex-PCR*, por sua simplicidade e rapidez, tem se mostrado uma ferramenta útil na detecção e diagnóstico de microrganismos em amostras clínicas e/ou cultura (MÉNDEZ-ÁLVAREZ & PÉREZ-ROTH, 2004). A *multiplex-PCR* é uma técnica derivada da PCR clássica onde dois ou mais *loci* são simultaneamente amplificados em uma mesma reação, o que possibilita a detecção e identificação, ao mesmo tempo, de distintos genes de interesse (HENEGARIU et al., 1997; MARKOULATOS et al., 2002). Esta técnica é baseada na separação dos amplicons de diferentes pesos moleculares por eletroforese em gel de agarose que, então, são visualizados por coloração com brometo de etídio. Para garantir a especificidade do sistema (uma única seqüência alvo por iniciador) é fundamental que os iniciadores sejam maiores do que aqueles usados em *monoplex-PCR* e que a temperatura de anelamento seja mais elevada. O auto anelamento de iniciadores não deve ocorrer, pois isto reduz a disponibilidade de iniciadores para a reação. A concentração de magnésio, além de afetar a especificidade, é um dos fatores mais críticos em uma PCR, determinando a eficiência da reação. Por isso, em geral, para um ensaio com *multiplex-PCR*, a concentração de magnésio é maior do que aquela usada na *monoplex-PCR*. Dependendo do número de espécies a ser detectado, o sistema é comumente representado por uma simples reação de amplificação (4-5 espécies), mas duas etapas de amplificação (5-6 espécies) podem ser procedidas. O equipamento para *multiplex-PCR* é representado por um termociclador básico (EDWARDS & GIBBS, 1994; SETTANI & CORSETTI, 2007).

Como muitas das técnicas moleculares para a detecção, identificação e classificação de fungos, o *multiplex* PCR pode ter como alvo sequências de DNA (DNAr) que codificam para a formação de RNA ribossomal (LI et al., 2003; MIRHENDI et al., 2007). O DNAr é formado por unidades de repetição dispostas em *tandem*. Cada unidade de repetição é constituída por duas regiões distintas: o espaçador intergênico e a região gênica. Esta região gênica inclui, na direção 5'-3', uma região espaçadora externa (ETS), o gene 18S, uma região espaçadora interna 1 (ITS1), o gene 5.8S, uma região espaçadora interna 2 (ITS2) e o gene 28S (REEDER, 1989). Uma seqüência muito estudada do DNAr é aquela formada pelas regiões ITS, principalmente, quando os organismos a serem investigados apresentam uma grande proximidade filogenética, pois são altamente variáveis tanto em seqüência de nucleotídeos quanto em tamanho (HILLIS & DIXON, 1991). As outras regiões gênicas, como são mais conservadas, podem ser empregadas para análises de grupos evolutivamente bastante distantes (HILLIS & DIXON, 1991; RIJK et al., 1995). Assim, espécies fúngicas muito relacionadas e variedades de uma mesma espécie podem ser analisadas pelas regiões ITS do DNAr (CHEN et al., 2000, 2001). A amplificação por PCR dessas regiões tem se mostrado eficiente na identificação de espécies e cepas do gênero *Candida* (CARVALHO et al., 2007a; LIGOURI et al., 2009; MILDE et al., 2000).

A técnica de *multiplex*-PCR é largamente empregada na identificação e diferenciação também devido a sua capacidade de produzir um retrato molecular de comunidades de microrganismos, inclusive em complexas matrizes (amostras clínicas e alimentos), antes mesmo do isolamento em cultura (LAU et al., 2008; SETTANI & CORSETTI, 2007). Resumidamente, os perfis padronizados que são utilizados nas comparações diagnósticas devem ser fornecidos por cepas de referência ou cepas-tipo. As seqüências de DNA que são empregadas como moldes na amplificação por esta PCR são aquelas dos microrganismos sob investigação. A mistura de iniciadores que é usada na reação deve incluir pares de iniciadores específicos de maneira a gerar produtos de PCR para todas as espécies estudadas (FUJITA et al., 2001; LUO et al. 2002). O resultado final em gel de agarose deve conter uma série de bandas de tamanhos diferentes relativas às espécies microbianas consideradas nos ensaios. A coincidência de posição entre as bandas das cepas em teste e aquelas das cepas-padrão permite a identificação dos microrganismos (MÉNDEZ-ÁLVAREZ & PÉREZ-ROTH, 2004).

1.2.2.3. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

Nos últimos anos, a ocorrência de casos de candidíase invasiva em hospitais terciários aumentou substancialmente em diferentes partes do mundo (PETTERSON, 2005). Nos Estados Unidos, um aumento de cerca de 400% na incidência dessas infecções foi relatado (FRIDKIN & JARVIS, 1996). Espécies de *Candida* passaram da sétima para a terceira principal causa de infecção nosocomial da corrente sangüínea em unidades de terapia intensiva, sendo responsável por 8% de todos os episódios registrados (PERLROTH et al., 2007; WISPLINGHOFF et al., 2004). No Brasil, a documentação dos casos de candidíase invasiva tem sido pouco sistemática e a literatura é omissa com relação à real incidência desses processos em nosso país. Entretanto, a partir dos estudos de Colombo (2003), sabe-se que 4,3% de todas as septicemias relatadas nos hospitais terciários do estado de São Paulo são causadas por espécies do gênero *Candida* e que muitas delas têm mostrado valores de concentração inibitória mínima (CIM) elevados para os antifúngicos de uso mais corrente. Recentemente, no único estudo nacional conduzido por Colombo et al. (2006), foi verificado que a incidência de candidemia nos hospitais brasileiros é de 2,9 casos por 1000 admissões, o que representa valores de 2 a 15 vezes mais elevados do que aqueles observados em outras regiões do mundo como América do Norte e Europa, e que a taxa de mortalidade bruta é 54%. Dentre os principais fatores de risco para candidíases invasivas, a neutropenia parece ser o mais relacionado à mortalidade de pacientes críticos no Brasil (VELASCO & BIGNI, 2008).

De acordo com o Programa de Vigilância Internacional *SENTRY*, a frequência de isolamento das diversas espécies de *Candida* varia segundo o país ou região geográfica, instituição hospitalar, unidades de internação e período de realização dos estudos epidemiológicos (PFALLER et al., 1998a). Na América do Norte, *C. albicans* é responsável pela maioria das candidemias, sendo seguida por *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. (PFALLER et al., 2001). Com relação à América Latina e Brasil, a distribuição das espécies de *Candida* apresenta algumas diferenças. *C. albicans* é também a principal levedura isolada dos casos de candidemia (COLOMBO et al., 2006). No entanto, ao contrário do que se observa na região norte do continente americano, as espécies não-*albicans* mais comumente encontradas são *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (AVILA-AGUERO et al., 2005; GIRÃO et al., 2008). Não obstante este modelo de distribuição, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. pelliculosa* e *C.*

rugosa, bem como *Pichia anomala* e *P. ohmeri* têm sido relatadas com frequência crescente no Brasil (COLOMBO et al., 2006; MATTA et al., 2007; VELASCO & BIGNI, 2008). As variações no padrão de susceptibilidade aos antifúngicos entre as regiões têm sido explicadas, exatamente, pelas diferenças na distribuição das espécies de *Candida* (ARENDRUP et al., 2005). Altos índices de resistência aos derivados azólicos têm sido mais observados em *C. glabrata* e *C. krusei* (GOLAN, 2005; PFALLER et al., 1998a), agentes de infecção fúngica hospitalar, claramente, menos importantes no cenário brasileiro. Com incidência igualmente baixa, mas com carácter emergente, cepas de *C. rugosa* resistentes ou com CIM elevadas para alguns derivados azólicos têm sido relatadas (COLOMBO et al., 2007). O aumento do consumo de antifúngicos utilizados no tratamento de candidíases invasivas tem influenciado diretamente na emergência de cepas com menor resposta clínica. A vigilância das infecções por *Candida* spp. no ambiente hospitalar passa, fundamentalmente, pela detecção *in vitro* da resistência (PFALLER & DIEKEMA, 2007).

1.2.3. DROGAS ANTIFÚNGICAS

As infecções fúngicas hospitalares são, normalmente, progressivas e refratárias à terapêutica (PLAYFORD et al., 2008). Esse quadro clínico-epidemiológico é função de uma variedade de fatores iatrogênicos que, além de levar os pacientes hospitalizados a um profundo estado consumptivo, tem produzido uma população crescente de patógenos resistentes à terapia convencional (RÜPING et al., 2008; VANDEN BOSSCHE, 1997). Entre outras razões, o tratamento das micoses oportunistas tem sido dificultado também em virtude do escasso número de agentes antifúngicos sistêmicos, falta de padronização dos protocolos terapêuticos, interações farmacológicas entre drogas, execução laboriosa dos testes de susceptibilidade e baixa correlação entre as provas de susceptibilidade *in vitro* e a evolução clínica dos pacientes (GUERY et al., 2009b; VIUDES et al., 2001). Somado a isso, existe o problema da toxicidade dos antifúngicos para o hospedeiro. Por serem eucariontes, tanto a célula fúngica quanto a célula humana são alvos da ação desses compostos, o que determina a ocorrência de importantes efeitos colaterais nos pacientes submetidos a regimes terapêuticos (CHIOU et al., 2000). Apesar de todas essas limitações, progressos têm sido obtidos no que se refere a um melhor entendimento dos mecanismos de ação e resistência, ao desenvolvimento de novas drogas e

formulações antifúngicas, bem como às estratégias de tratamento (GROLL & WALSH, 2002a; MISHRA et al., 2007; ODDS et al., 2003).

1.2.3.1. MECANISMOS DE AÇÃO E RESISTÊNCIA ÀS DROGAS ANTIFÚNGICAS

As drogas antifúngicas podem interferir com a síntese de ácidos nucleicos (pirimidinas), microtúbulos (griseofulvina), síntese de ergosterol (azoles, alilaminas, tiocarbamatos, morfolininas), integridade da membrana celular (poliênicos), síntese da parede celular (equinocandinas, nicomicinas) e síntese protéica (sodarinas) entre outros sítios celulares (GEORGOPAPADAKOU, 1998; LOO, 2006; VANDEN BOSSCHE, 1997). Os antifúngicos sistêmicos de uso clínico mais frequentes são a anfotericina B e suas preparações lipídicas, itraconazol, fluconazol, derivados triazólicos (voriconazol, posaconazol e ravuconazol) e derivados das equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina) (ANAISSE, 2008, CORNELLY et al, 2009; MENSA et al., 2008). No entanto, disponíveis nos hospitais públicos brasileiros, estão apenas os derivados poliênicos (anfotericina B) e azólicos (itraconazol e fluconazol) (BRASIL, 2007e).

Os poliênicos pertencem a uma classe de antifúngicos naturais produzidos por espécies de *Streptomyces* (SANGLARD, 2002). O principal representante desse grupo é a anfotericina B. Devido ao seu amplo perfil de atividade (fungos leveduriformes, filamentosos e dimórficos), seu efeito fungicida e administração parenteral, a anfotericina B é considerada a droga de primeira linha para o tratamento de infecções fúngicas invasivas em pacientes hospitalizados (MELLADO et al., 2002). Diferentemente de outros compostos antifúngicos, que em geral agem sobre enzimas, a anfotericina B se liga de maneira irreversível ao ergosterol da membrana celular dos organismos susceptíveis, determinando alterações em sua permeabilidade (BAGINSKI et al., 2006; ODDS et al., 2003). Essa interação resulta na formação de poros ou canais pelos quais ocorrem perdas de íons e substâncias carbonadas que levam à morte celular (MELLADO et al., 2002). Outro mecanismo de ação parece ser a oxidação da membrana fúngica (LOEFFLER & STEVENS, 2003). A anfotericina B pode também se unir aos esteróis da membrana das células humanas, produzindo importantes efeitos adversos. A nefrotoxicidade é o principal efeito colateral ocasionado pela ação deste fármaco sobre o colesterol do hospedeiro. Os sintomas mais significativos são a

diminuição do filtrado glomerular e fluxo renal, hipocalcemia, hipomagnesemia, acidose tubular e nefrocalcinose (GIRMENIA et al., 2005; VIUDES et al., 1999). Com o objetivo de reduzir a toxicidade da anfotericina B em sua apresentação tradicional (desoxicolato), novas formulações lipídicas (anfotericina B lipossomal, anfotericina B em complexo lipídico, anfotericina B em dispersão coloidal, anfotericina B intralipídica e conjugado de anfotericina B) têm sido introduzidas (BADIA et al., 2005; CARRILLO-MUÑOZ et al., 1999). A taxa de liberação mais lenta desses compostos lipídicos para os rins parece contribuir efetivamente para a diminuição da toxicidade (MARTINEZ, 2006).

Os azólicos constituem uma família de antifúngicos sintéticos com o maior número de derivados e grande diversidade de espectros de ação, potência e toxicidade (LIPP, 2008). Os derivados azólicos agem sobre a biossíntese do ergosterol da membrana fúngica, através da inibição da enzima lanosterol-demetilase dependente de citocromo P450, o que impede a conversão de lanosterol em ergosterol e causa aumento da permeabilidade e progressiva instabilidade (SANGLARD, 2002). O acúmulo de esteróis metilados determina rupturas na ligação dos fosfolipídios, afetando a função das enzimas de membrana e a replicação celular (SHEEHAN et al., 1999). Ao contrário da anfotericina B, a atividade dessas drogas é fungistática e seus efeitos adversos são mais limitados, estando primariamente relacionados a processos hepáticos e renais, endócrinos e aparelho reprodutor (MELLADO et al., 2002; VIUDES et al., 1999). De acordo com a sua composição química, esses fármacos são divididos em imidazólicos e triazólicos. Os derivados triazólicos (itraconazol, fluconazol e voriconazol) são classicamente empregados na terapia das infecções fúngicas oportunistas (LEWIS & GRAYBILL, 2008; SANGLARD, 2002). O itraconazol é efetivo contra infecções por fungos miceliais e leveduriformes, estando disponível para administração oral e endovenosa (LOEFFLER & STEVENS, 2003). O fluconazol pode ser aplicado tanto oral quanto parenteralmente, mas seu espectro de ação é restrito às leveduras, principalmente, do gênero *Candida* (CARRILLO-MUÑOZ, 2006). O voriconazol é um novo triazólico obtido por modificações da molécula de fluconazol que apresenta amplo espectro de atividade sobre fungos filamentosos e leveduriformes e, igualmente, possibilidade de administração oral e parenteral (ODDS et al., 2003). Outros derivados triazólicos de segunda geração são o posaconazol e o ravuconazol (LOEFFLER & STEVENS, 2003).

A resistência pode ser definida em termos microbiológicos e clínicos (ESPINEL-INGROFF, 2008; MELLADO et al., 2002). O conceito microbiológico de resistência engloba a resistência primária (ou intrínseca) que é aquela presente em um organismo sem prévia exposição aos fármacos antifúngicos e a resistência secundária (ou adquirida) que é aquela desenvolvida como resposta à exposição a essas substâncias (LOEFFLER & STEVENS, 2003). Normalmente, a resistência secundária é decorrente de alterações fenotípicas e/ou genotípicas de caráter estável ou transitório (BARKER & ROGERS, 2006; KONTOYIANNIS & LEWIS, 2002). Por sua vez, a resistência clínica tem sido definida como a progressão ou a persistência de uma infecção, a despeito do estabelecimento de apropriada terapia antimicrobiana (PEREA & PATTERSON, 2002). A ocorrência de resistência clínica está associada a fatores do hospedeiro, fatores farmacológicos, fatores iatrogênicos e fatores fúngicos (ESPINEL-INGROFF, 2000). Dentro das infecções fúngicas invasivas, a resistência clínica se manifesta tipicamente em pacientes com neutropenia profunda e prolongada, pacientes submetidos a múltiplas terapias e portadores de próteses e cateteres (PLAYFORD et al., 2008; WHITE et al., 1998).

A resistência primária à anfotericina B é de ocorrência limitada. Alguns patógenos emergentes como *Aspergillus* spp., *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitanae*, *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., *Scopulariopsis* spp. e *Trichosporon beigelii*, todavia, têm demonstrado certo grau de resistência primária *in vitro* (CANUTO & RODERO, 2002; CUENA-ESTRELLA et al., 2006). Da mesma forma, a resistência secundária a fármacos poliênicos é pouco prevalente entre as espécies fúngicas. No entanto, alguns casos de infecção disseminada por cepas de *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. albicans* que desenvolveram resistência à anfotericina B durante o tratamento antifúngico têm sido descritos (PEREA & PATTERSON, 2002; ROGERS, 2006). A resistência aos poliênicos está primariamente relacionada a alterações qualitativas e quantitativas dos lipídios da membrana celular fúngica (CANUTO & RODERO, 2002). Os mecanismos bioquímicos de resistência incluem a diminuição do conteúdo de ergosterol sem concomitante mudança em sua composição, a substituição dos esteróis com maior afinidade pelos poliênicos e a reorientação dos esteróis existentes, tornando a ligação com os poliênicos menos favorável termodinâmica e estericamente (BAKER & ROGERS, 2006; GHANNOUM & RICE, 1999). Essas alterações da membrana fúngica parecem estar associadas a mutações nos genes *erg2* ou *erg3* (KLEPSEK, 2001). Outras fontes de resistência são o aumento da atividade da catalase celular que age minimizando a destruição oxidativa produzida pelos fármacos poliênicos e a

diminuição do conteúdo de β -1, 3-glucana que estabiliza a parede celular fúngica, influenciando o acesso de macromoléculas como a anfotericina B à membrana plasmática (LOEFFLER & STEVENS, 2002; SANGLARD, 2002). Apesar de quimioterapia citotóxica e severo imunocomprometimento serem, comumente, observados em pacientes infectados com cepas que apresentam resistência secundária, os fatores de risco para o desenvolvimento de resistência aos derivados poliênicos não estão bem definidos (KANAFANI & PERFECT, 2008; KONTOYIANNIS & LEWIS, 2002).

Diferentes mecanismos moleculares de resistência aos azoles são possíveis (ESPINEL-INGROFF, 2008; LOEFFLER & STEVENS, 2003). A resistência secundária a esses fármacos está melhor descrita em fungos leveduriformes (SANGLARD, 2002). Em *Candida* spp., a resistência pode ser resultado do aumento da expressão de bombas de eliminação ativa que regulam o transporte e/ou o acúmulo intracelular de derivados azólicos. Os transportadores ABC e os transportadores MSF são as duas principais bombas de efluxo encontradas nesses fungos. A super-expressão em *C. albicans* dos genes *cdr1* e *cdr2* codificadores dos transportadores ABC e do gene *mdr1* codificador dos transportadores MSF determinam a diminuição da susceptibilidade à maioria dos azólicos de uso clínico e ao fluconazol, respectivamente (MELLADO et al., 2002; MISHRA et al., 2007). Genes funcionalmente semelhantes àqueles observados em *C. albicans* são também descritos em espécies não-*albicans* como *cgcdr1* e *pdh1* em *C. glabrata* e *cdcdr1* e *cdcdr2* em *C. dubliniensis* (SANGLARD, 2002). Um mecanismo diretamente relacionado com resistência é a alteração estrutural da enzima 14- α lanosterol demetilase (ERG11p) que é o sítio celular dos derivados azólicos e a enzima chave na síntese do ergosterol. Essa enzima é produto do gene *cyp51/erg11* e mutações em sua seqüência levam a mudanças conformacionais da enzima, afetando a afinidade com os azólicos (PRASAD & KAPOOR, 2005; SANGLARD, 2002). Em *C. krusei*, esse mecanismo de resistência é de natureza primária (SANGLARD & ODDS, 2002). O aumento da expressão do gene *erg11* parece também contribuir para resistência aos derivados azólicos (KLEPSEK, 2001). A alteração na via biossintética do ergosterol é outro mecanismo associado à resistência. A enzima C-5,6 esterol desaturase codificada pelo gene *erg3* cataliza a conversão de 14- α metilfecosterol em 14- α metil-ergosta-8,24(28)-dien-3 β ,6 α -diol. Esse esterol metilado tóxico é formado com o bloqueio de ERG11p, sendo consequência da atividade dos fármacos azólicos sobre a célula fúngica. A mutação do gene *erg3* suprime o efeito tóxico e é considerado um mecanismo de resistência (MISHRA et al., 2007; WHITE et al., 1998). Devido a não

produção de ergosterol, esse mecanismo também está associado à resistência aos derivados poliênicos (MELLADO et al., 2002). Com a alteração da composição dos esteróis da membrana citoplasmática, o influxo celular de azólicos é afetado pela perda de fluidez e assimetria dessa organela. Este mecanismo tem sido demonstrado em isolados de *C. albicans* resistentes ao miconazol e fluconazol e *C. krusei* resistente ao itraconazol (LOEFFLER & STEVENS, 2003).

1.2.3.2. TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE ÀS DROGAS ANTIFÚNGICAS

O surgimento de cepas resistentes, a disponibilidade de novas drogas e a ocorrência de falhas na quimioterapia das infecções fúngicas invasivas levaram ao desenvolvimento de métodos para a investigação da susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos (ARIKAN, 2007; SANGLARD & ODDS, 2002). A maioria desses métodos emprega técnicas de caldo-diluição e está baseada no cálculo da concentração inibitória mínima (CIM) estimado pela determinação do percentual de inibição em relação a um controle de crescimento (CUENCA-ESTRELLA & RODRÍGUEZ-TUDELA, 2002). Correlações entre a CIM obtida em laboratório e a evolução clínica do paciente podem ser estabelecidas através dessas provas de susceptibilidade (ESPINEL-INGROFF et al., 1998). No entanto, pelo fato de uma infecção fúngica ser um processo biológico dinâmico e complexo e os testes *in vitro* serem realizados sob uma matriz bem definida e relativamente simples, deve ser esperada baixa correlação entre a CIM (pontos de corte) e a resposta terapêutica. Por isso, a relevância clínica dos valores das CIM deve ser interpretada considerando criteriosamente diversos fatores (ESPINEL-INGROFF, 2000; FOTHERGILL et al., 2006). Os parâmetros laboratoriais (tamanho do inóculo, formulação do meio, tempo de incubação, temperatura de incubação e critérios de determinação dos pontos de corte) quando alterados podem introduzir importantes variações na CIM e os fatores do hospedeiro podem ter mais impacto sobre o comportamento da infecção do que o resultado da avaliação da sensibilidade (ARIKAN, 2007; ESPINEL-INGROFF, 2000; ESPINEL-INGROFF et al., 1998). O conceito de CIM tem provado ser extremamente útil na condução da terapia antibacteriana mais adequada, contudo, no contexto da terapia antifúngica, a CIM parece ter um maior valor como preditor de fracasso do que de sucesso (NEELY & GHANNOUN, 2000).

Como existem múltiplos fatores interferentes, a standardização laboratorial dos testes de susceptibilidade é uma condição básica para assegurar a compatibilidade das informações (JOHNSON, 2008). Dentre os métodos de referência, distinguem-se aqueles recomendados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (anteriormente *National Committee for Clinical Laboratory Standards* - NCCLS). Em 1992, esse comitê propôs um método de referência (documento M27-P) para a avaliação da susceptibilidade aos antifúngicos em *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans* variedade *neoformans* (CLSI, 1992). O método aprovado (documento M27-A) foi publicado em 1997 (CLSI, 1997) e versões atualizadas (documentos M27-A2, -A3, M27-S2, -S3) foram apresentadas entre os anos de 2002 a 2008 (CLSI, 2002b; 2005; 2008b; 2008c). Para os fungos miceliais produtores de conídios, uma proposta de padronização (documento M38-P) foi apresentado em 1998 (CLSI, 1998), aprovada (documento M38-A) em 2002 (CLSI, 2002a) e atualizada (documento M38-A2) em 2008 (CLSI, 2008a). Esses métodos descrevem técnicas de macro e microdiluição para a determinação da CIM cujas principais características são a preparação do inóculo por espectrofotometria, RPMI a pH 7.0 como meio de cultivo, utilização de antifúngicos na forma de pó, leitura visual dos tubos ou placas, valores por percentual de inibição e recomendações para o controle de qualidade dos resultados (CUENCA-ESTRELLA & RODRÍGUEZ-TUDELA, 2002). Apesar desses métodos serem considerados padrão, importantes limitações têm sido descritas (ESPINEL-INGROFF, 2000). Com o objetivo de superar os problemas metodológicos, algumas modificações foram introduzidas nos documentos publicados pelo CLSI. Baseado no documento M27-A, o *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (EUCAST) propôs modificações na determinação da CIM em leveduras fermentadoras de glicose, primariamente, *Candida* spp. (EUCAST, 2002; 2008a). Entre essas modificações, destacam-se a suplementação do RPMI com 2% de glicose, o aumento do tamanho do inóculo e a leitura espectrofotométrica (CUENCA-ESTRELLA & RODRÍGUEZ-TUDELA, 2002). Um método para a determinação da susceptibilidade às drogas antifúngicas de fungos formadores de conídios foi também proposto pelo EUCAST (EUCAST, 2008b; LARS-FLÖRL et al., 2006, 2008) com base em modificações do documento M38-A. Recentemente, o CLSI publicou o documento M44-A que propõe a padronização do método de disco-difusão para *Candida* spp. frente ao fluconazol e voriconazol. A utilização de discos de papel contendo 25 µg de droga, Mueller-Hinton com 2% de glicose e 0,5µg/mL de azul de metileno como meio de cultivo e leitura por halo de inibição em 20 a 24 horas fazem parte do escopo desse documento (CLSI, 2004). Em

2007, foi apresentado um documento suplementar (M-44-S2) (CLSI, 2007). Outros métodos de aferição da susceptibilidade e métodos comerciais baseados em parâmetros do CLSI têm sido também intensamente investigados. Dentre estes, ETEST, microdiluição colorimétrica, diluição em ágar, determinação da atividade fungicida, citometria de fluxo e quantificação de ergosterol são os que têm apresentado as melhores correlações clínicas (ARIKAN, 2007).

Mesmo com a publicação pelo CLSI dos protocolos de referência para o método de diluição em caldo, a determinação dos pontos de corte tem sido estabelecida apenas para algumas combinações *organismo-droga* (CLSI, 2002b). Para a anfotericina B, os pontos de corte são tipicamente bem marcados e a CIM pode ser lida como a menor concentração da droga que inibe um crescimento visível. A metodologia do CLSI parece não permitir a detecção de resistência de maneira consistente, no entanto, se tem assumido que cepas de *Candida* com CIM maiores do que 1µg/mL provavelmente são resistentes à anfotericina B. Em *Candida* spp. as CIM de anfotericina B estão entre 0,25µg/mL e 1µg/mL. A resistência a essa droga não é usual e 94% dos isolados de *Candida* spp. são inibidos por concentrações de anfotericina B menores do que 1µg/mL (NEELY & GHANNOUM, 2000; PFALLER, 2000a; REX et al., 2001). Para os derivados azólicos (fluconazol e itraconazol) e a flucitosina, os pontos de corte são menos definidos, ocorrendo igual turbidez para todas as concentrações da droga acima da CIM. Esse proeminente crescimento (*trailing*), a despeito da susceptibilidade, é decorrente do mecanismo de ação intracelular destes antifúngicos que permite o crescimento do microrganismo antes que inibição ocorra. A CIM para estas drogas pode ser estimada através da comparação visual com um controle *droga-livre* diluído a 50% (CLSI, 2002b). Os pontos de corte para o fluconazol foram determinados com base em correlações com a candidíase orofaríngea e doença invasiva (Candidemia) e o itraconazol com base apenas no processo de mucosa (candidíase orofaríngea). Isolados inibidos por concentrações $\geq 64\mu\text{g/mL}$ de fluconazol e $\geq 1\mu\text{g/mL}$ de itraconazol são considerados resistentes (R) e aqueles inibidos por concentrações $\leq 8\mu\text{g/mL}$ de fluconazol e $\leq 0,12\mu\text{g/mL}$ de itraconazol são considerados sensíveis (S). CIM de fluconazol entre 16µg/mL e 32µg/mL e itraconazol entre 0,25µg/mL e 0,5µg/mL indicam isolados considerados susceptíveis dependente de dose (SDD). Nessa categoria, para que ocorra uma resposta clínica favorável, é necessário um nível sérico de fluconazol de 40µg/mL a 60µg/mL em doses de 800mg/dia e de itraconazol de pelo menos 0,5µg/mL (CLSI, 2002b). Com relação ao

fluconazol, os pontos de corte do EUCAST diferem daqueles propostos pelo CLSI: S: $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ e R: $> 4 \mu\text{g/mL}$ (EUCAST, 2007). Baseado na distribuição das CIM em uma extensa população de organismos e na farmacocinética da droga, o CLSI sugeriu pontos de corte para a flucitosina. Isolados com CIM de $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ são considerados sensíveis; aqueles com CIM $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ são definidos como resistentes e os isolados com valores de concentração entre $8 \mu\text{g/mL}$ e $16 \mu\text{g/mL}$ são classificados como intermediários, não sendo claramente sensíveis ou resistentes à droga (CLSI, 2002b). No caso do teste de susceptibilidade por difusão em disco para fluconazol, a interpretação dos resultados está associada ao diâmetro da zona de inibição. De acordo com a proposta do CLSI, isolados de *Candida* spp. com diâmetro $\geq 19 \text{ mm}$ são classificados como sensíveis, isolados com diâmetros $\leq 14 \text{ mm}$ são considerados resistentes e isolados com diâmetro entre 15 mm e 18 mm são designados dose-dependente. Uma correlação com as CIM encontradas para o fluconazol pelo método de diluição em caldo foi estabelecida (CLSI, 2004).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

A tese tem como objetivo contribuir para o conhecimento sanitário-epidemiológico das infecções fúngicas hospitalares através do estudo retro-prospectivo e analítico-descritivo de isolados clínicos de *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Trichosporon* provenientes de culturas de sangue e outros sítios anatômicos de pacientes hospitalizados na região do estado do Rio de Janeiro.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar em nível de espécie os isolados de *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Trichosporon* recuperados de amostras clínicas através de métodos morfológicos, cromogênicos e bioquímicos;
- Confirmar molecularmente a identificação dos isolados clínicos, utilizando a técnica de *multiplex-PCR*;
- Traçar e comparar o perfil de susceptibilidade dos isolados clínicos frente a fluconazol, itraconazol e anfotericina B, empregando a metodologia de microdiluição em caldo e a metodologia de difusão em ágar, segundo protocolos de referência.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MICRORGANISMOS

Foram estudadas 113 cepas fúngicas (108 *Candida* spp., 02 *Cryptococcus humicolus*, 02 *Rhodotorula glutinis* e 01 *Trichosporon* sp.) provenientes de 100 pacientes adultos e pediátricos hospitalizados em serviços de saúde no estado do Rio de Janeiro e isoladas no período de 2002 a 2007. Os isolamentos fúngicos foram feitos no Setor de Micologia do Laboratório Central de Saúde Pública Noel Nutels (LCNN), responsável pelo serviço de diagnóstico laboratorial para 16 hospitais do Sistema Público de Saúde do Estado do Rio de Janeiro, no Setor de Patologia Clínica do Instituto Estadual de Hematologia Artur da Siqueira Cavalcanti (HEMORIO), no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Universitário Gaffré e Guinle da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), no Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Pediatria e Puericultura da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), no Laboratório de Bacteriologia e Micologia do Instituto Biológico do Exército (IBEx) e Hospital Central do Exército (HCE) e no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Adventista Silvestre do Rio de Janeiro. A reavaliação da identificação dos isolados clínicos do gênero *Candida* foi realizada no Laboratório de Micologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFRJ.

3.2. IDENTIFICAÇÃO E PRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

3.2.1. IDENTIFICAÇÃO CROMOGÊNICA

A determinação da pureza e identificação preliminar dos isolados de *Candida* spp. enviados ao Laboratório de Micologia Clínica em tubos de ensaio com ágar de Sabouraud dextrosado foi procedida em meio CHROMagar-*Candida* (Probac, Brasil). A partir de subcultivos neste meio foi possível identificar *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*. Fragmentos destas culturas foram suspensos em tubos de ensaio (13mmX100mm) com 5,0mL de água destilada estéril e, em seguida, foram inoculadas por esgotamento em placas de Petri (90mmX15mm) contendo o ágar cromogênico. Estas placas foram, então, incubadas por 24-48 horas à temperatura de 37° C. Através

da visualização da produção de substâncias cromogênicas no meio (verde: *C. albicans*, azul-cobalto: *C. tropicalis*, rosa: *C. krusei*) foi feita a identificação (ODDS & BERNAERTS, 1994). Colônias isoladas de cada espécie foram, posteriormente, subcultivadas para ágar batata dextrosado (Oxoid, Hampshire, England) em tubos de ensaio e incubadas à temperatura de 37° C por um período de 24 horas para posterior identificação morfológica, bioquímica e molecular. As culturas que apresentaram contaminação foram purificadas por subcultivo de colônias compatíveis com a identificação informada pelo laboratório de origem.

3.2.2. IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA

3.2.2.1 PROVA DO TUBO GERMINATIVO

A produção de tubo germinativo foi verificada pela técnica descrita por Taschadjian et al. (1960). Isolados purificados de *Candida* spp. foram inoculados em 5,0mL de soro humano contido em tubos de ensaio e incubados à 37°C por até 3h. A observação em microscópio óptico [marca Olympus (Tokyo, Japão), modelo BX-41], com objetiva de 40X, de projeções alongadas que surgem como hifas nas células de leveduras, foi considerado positivo para tubo germinativo e, por isso, sugestivo de *C. albicans*.

3.2.2.2. MICROCULTIVO EM LÂMINA

A formação de micélio verdadeiro, pseudo-micélio e estruturas de resistência foi observada pela técnica de Dalmau (1929). Cada isolado purificado de *Candida* spp. foi semeado de maneira a formar 3 estrias paralelas sobre a superfície do ágar milho (Oxoid, Hampshire, England) com 1% de tween 80 (Isofar, RJ, Brasil) contido em placas de Petri. Estas estrias foram cobertas com lamínulas (24mmX24mm) estéreis e, em seguida, as placas de Petri foram incubadas à temperatura de 37° C por 48-96 horas. A leitura por microscopia óptica com aumento de 40X foi procedida para a verificação da produção de clamidósporos. Havendo a produção destas estruturas de resistência, os isolados foram considerados como *C. albicans*.

3.2.3. IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA

As provas bioquímicas foram realizadas utilizando o equipamento automatizado VITEK (BioMérieux, França) que emprega cartões para a identificação de leveduras. Estes cartões contêm 30 poços, sendo que destes, 26 contêm caldos bioquímicos e quatro contêm caldos de controle negativo. Disponíveis neste sistema estão a galactose, lactose, sacarose, maltose, celobiose, metil-D-glicosídeo, xilose, arabinose, trealose, melezitose, rafinose, xilitol, dulcitol, adonitol, palatinose, glicerol, sorbitol, eritritol, melibiose, glicose, inositol, 2-ceto-D-gluconato e N-acetil-D-glicosamina. Além disto, há meios contendo ainda cicloheximida, nitrato e uréia. A metodologia de identificação baseia-se nos métodos bioquímicos estabelecidos por Wickerham (1975) e Wickerham & Burton (1948). O inóculo, incubação e leitura dos cartões foram procedidos de acordo com as especificações do fabricante. Culturas puras semeadas por esgotamento em placas de Petri contendo ágar batata dextrosado e incubadas à 37° C por 24 horas foram utilizadas. Subsequentemente, colônias isoladas foram suspensas em tubos de ensaio (12X75mm) contendo 1,8mL de água estéril a 0,5% (pH 7,0) para produzir um inóculo visualmente equivalente ao padrão no. 2 da Escala de McFarland. Os cartões de identificação foram preenchidos com este inóculo, selados e incubados em incubadora *offline* à 30° C por 24 horas. Após o período de incubação, foi feita a leitura dos resultados por automação em leitora/incubadora, empregando o *software* VITEK, (BioMerieux, França). Este *software* determina se um poço é positivo com base na diferença de quantidade de luz transmitida através do poço com substrato e do poço-controle negativo correspondente. A diferença na transmissão de luz indica o crescimento. Ao término da análise dos perfis bioquímicos, o equipamento imprimiu um relatório de identificação para cada cartão. O grau de certeza de identificação foi dado por percentuais de probabilidade. Em alguns casos, foi sugerido pelo *software* VITEK uma outra incubação à 30° C, por mais 24 horas, para uma nova leitura em 48° C, bem como testes bioquímicos e morfológicos suplementares. A identificação foi considerada correta e completa quando os percentuais de probabilidade foram $\geq 85\%$ e não havia a solicitação de testes suplementares. De outro modo, a identificação foi considerada incompleta. Esta foi também considerada incompleta, se testes suplementares foram solicitados, mesmo com percentuais de probabilidade $\geq 85\%$.

3.2.4. PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS

Com pureza e identidade confirmadas, os isolados clínicos foram semeados em ágar batata dextrosado (Oxoid, Hampshire, England) em tubos de ensaios e incubados à temperatura de 37° C por um período de 24-48 horas. Em seguida, essas amostras foram preservadas em *skim milk* a 10% em tubos de microcentrifugação de 2,0mL (Eppendorf, Alemanha) à temperatura de -20°C (CODY et al., 2008), para posterior uso em provas moleculares e teste de susceptibilidade aos antifúngicos.

3.2.5. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Os isolados fúngicos preservadas em *skim milk* a 10% foram reativadas por subcultivos em ágar batata dextrosado (BDA) (Oxoid, Hampshire, England) contido em placas de Petri que foram incubadas por um período de 24-48 horas à temperatura de 37° C.

Para a identificação molecular dos isolados clínicos de *Candida* spp. pela técnica de *multiplex*-PCR foi empregado o protocolo definido por Carvalho et al. (2007a) que teve como base a amplificação de dois fragmentos das regiões *Internal Transcribed Spacer 1* (ITS 1) e *2* (ITS 2) do DNA ribossômico (DNAr) através da combinação de dois iniciadores fungo-específicos e 8 espécie-específicos, descritos por Trost et al. (2004), em uma simples reação de PCR.

3.2.5.1. CEPAS DE REFERÊNCIA

Como no caso dos isolados clínicos, as cepas de referência empregadas na avaliação molecular foram igualmente preservadas em *skim milk* a 10% à temperatura de -20° C (CODY et al., 2008) até seu uso. Para os ensaios com DNA, foram utilizadas as seguintes cepas de referência:

- *Candida albicans* - INCQS 40071 (ATCC 18804)
- *Candida dubliniensis* – INCQS 40172 (ATCC MY A646)
- *Candida glabrata* - INCQS 40136 (ATCC 2001)
- *Candida guilliermondii* – INCQS 40037 (ATCC 6260)
- *Candida lusitanae* - INCQS 40137 (ATCC 34449)

- *Candida krusei* – INCQS 40095 (ATCC 34135)
- *Candida parapsilosis* – INCQS 40038 (ATCC 22019)
- *Candida tropicalis* – INCQS 40042 (ATCC 13803)

3.2.5.2. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O DNA genômico das cepas de referência e das cepas clínicas foi extraído com o emprego do reagente comercial DNAzol (Invitrogen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Com uma alça bacteriológica estéril foram retiradas 05 colônias da placa de Petri (BDA, 37° C, 24-48h.) utilizada para reativação das culturas preservadas em *skim milk* e transferidas para tubos de microcentrifugação estéreis de 1,5mL. Em seguida, 1,0mL de DNazol foi adicionado ao tubo contendo a massa fúngica. Para a lise das células de levedura em suspensão, esta foi aspirada suavemente para dentro e fora de uma pipeta estéril repetidas vezes. Este material foi centrifugado por 10 minutos a 10.000 x g à temperatura de 4° C para remoção do RNA e polissacarídeos do lisado. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrifugação estéril e 0,5mL de etanol 100% foi adicionado para a precipitação do DNA. Por inversão do tubo, o DNA foi misturado ao etanol e esta mistura foi mantida em repouso por 3 minutos à temperatura ambiente. O DNA em suspensão foi retirado com o auxílio de uma ponteira plástica estéril e transferido para outro tubo de microcentrifugação estéril. Este tubo foi deixado invertido durante 01 minuto para a decantação da amostra. Uma dupla lavagem do DNA foi realizada com a adição de 1,0mL de etanol 75%. Em cada uma das lavagens, o DNA foi suspenso em etanol por inversão do tubo e, ao final, este foi deixado na posição vertical durante 01 minuto para a deposição do material genômico em sua base e remoção do sobrenadante com pipeta. Após a retirada do etanol pela segunda vez, os tubos foram deixados abertos por 15 segundos para a secagem do DNA e adição de 0,3mL de NaOH 8mM. Este DNA solubilizado em NaOH foi estocado sob refrigeração à temperatura de – 20° C para posterior amplificação.

3.2.5.3. INICIADORES

Os iniciadores universais fungo-específicos (RW Genes, Brasil) utilizados para amplificar as regiões ITS1 e ITS2 do DNAr de todas as amostras de leveduras ensaiadas foram:

- **UNI1** - 5'-GTCAAACCTTGGTCATTTA-3'
- **UNI2** - 5'-TTCTTTTCCTCCGCTTATTGA-3'

Os iniciadores espécie-específicos (RW Genes, Brasil) desenhados com base na seqüência de nucleotídeos das regiões ITS1 e ITS2 de cada uma das 8 cepas de referência e utilizados para amplificar especificamente o DNA destas cepas e dos isolados clínicos de *Candida* taxonomicamente relacionados foram:

- **Calb** (*Candida albicans*) – 5'-AGCTGCCGCCAGAGGTCTAA-3'
- **Cdub** (*Candida dubliniensis*) – 5'-CTCAAACCCCTAGGGTTTGG-3'
- **Cgla** (*Candida glabrata*) - 5'-TTGTCTGAGCTCGGAGAGAG-3'
- **Cgui** (*Candida guilliermondii*) – 5'-TTGGCCTAGAGATAGGTTGG-3'
- **Ckru** (*Candida krusei*) – 5'-CTGGCCGAGCGAACTAGACT-3'
- **Clus** (*Candida lusitanae*) – 5'-TTCGGAGCAACGCCTAACCG-3'
- **Cpar** (*Candida parapsilosis*) – 5'-GTCAACCGATTATTTAATAG-3'
- **Ctrop** (*Candida tropicalis*) – 5'-GATTTGCTTAATTGCCCCAC-3'

3.2.5.4. AMPLIFICAÇÃO POR MULTIPLEX-PCR

O DNA extraído foi utilizado na reação de PCR, visando à amplificação de segmentos de DNAr contendo as regiões ITS1 e ITS2 e o gene 5.8S (**figura 1**). Para cada reação de PCR foram utilizados tampão de amplificação 0,8X [160mM (NH₄)₂SO₄, 670mM Tris-HCl (pH 8,8)] (Gibco BRL, EUA), 3,5mM MgCl₂, mistura de dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP: 200μL cada), mistura de iniciadores (UNI1 e UNI2: 0,55μM cada, Cgui: 0,05μM, Calb e Ckru: 0,15μM, Cgla, Ctro e Clus: 0,2μM cada, Cpar: 0,3μM, Cdub: 0,4μM), 1U *taq* DNA polimerase (Gibco BRL, EUA), DNA alvo (2μl/50ng) e água milli-Q para completar 20μl da mistura. Todos os reagentes foram mantidos sob refrigeração em gelo e dispensados em tubos de microcentrifugação de 500 μL na seqüência descrita acima. Os tubos de microcentrifugação foram posicionados no

aparelho termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer Corporation, Norwalk, CT, USA) que foi programado para um ciclo de 95° C por 3 minutos, 40 ciclos de 94° C por 15 segundos, 55° C por 30 segundos, 65° C por 45 segundos e um ciclo final de 94° C por 10 minutos. Os microtubos contendo DNA amplificado foram mantidos em *freezer* à temperatura de -20° C até o momento da eletroforese em gel de agarose.

3.2.5.5. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Alíquotas de 10µl de cada produto amplificado foram separadas por eletroforese em gel de agarose 2%. O tempo de corrida foi de 2h30 sob uma tensão de 250 V. Após a eletroforese, o gel foi banhado em solução de brometo de etídio na concentração de 0,5µg/mL para coloração das bandas geradas e exposto à luz ultra-violeta no comprimento de onda de 310nm em transiluminador, sendo as imagens documentadas através de sistema fotográfico digital.

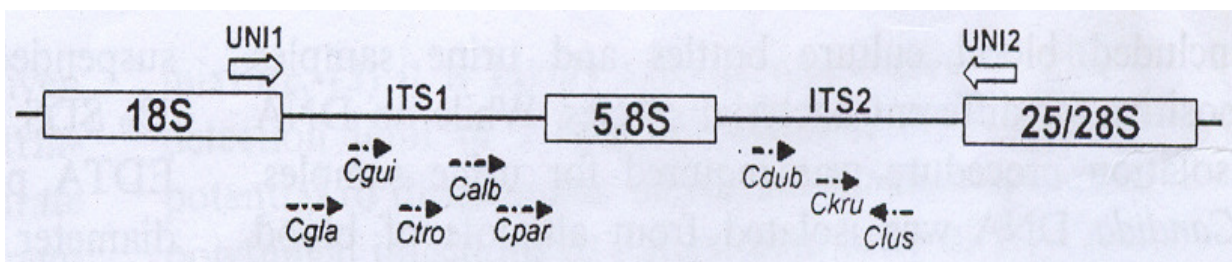


Figura 1. Estratégia de ação da *multiplex-PCR*. Organização dos genes ribossomais fúngicos com a indicação dos alvos dos iniciadores universais e espécie-específicos (CARVALHO et al, 2007a).

3.2.5.6. INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

A identificação dos isolados clínicos de *Candida* spp. foi procedida pela comparação da disposição de bandas no gel de agarose destes isolados com as bandas das cepas de referência. A coincidência de posição entre as bandas indica que o isolado clínico é igual ao padrão, cuja identidade é conhecida, o que permite sua determinação.

3.3. TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

Na avaliação das susceptibilidades foram utilizados dois antifúngicos azólicos: fluconazol (Pfizer Incorporated, N.Y., USA) e itraconazol (Janssen Pharmaceutica, Titusville, N.J., USA) e um derivado poliênico: anfotericina B (Sigma Chemical Corporation, St. Louis, MO, USA). Apenas drogas sob a forma de referência em pó fornecidas pelos fabricantes foram empregadas. O armazenamento dos fármacos antifúngicos foi feito em dessecador a temperatura de 4-8° C por um período de até 24 meses.

A susceptibilidade dos isolados de *Candida* spp. ao fluconazol, itraconazol e anfotericina B foi estabelecida pelo método de microdiluição em caldo de acordo com os documentos M27-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI dos Estados Unidos da América (CLSI, 2002b) e E.Dis-7.1 do *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing* da União Européia (EUCAST, 2002). A susceptibilidade para fluconazol pelo método de difusão em ágar foi estabelecida conforme o documento M44-A do CLSI (CLSI, 2004). Para itraconazol e anfotericina B, a susceptibilidade pelo método de difusão em ágar foi estabelecida segundo a bula do *kit* comercial CECON. Como controle de qualidade da atividade antifúngica dos fármacos testados, foram incluídas em cada ensaio *Candida albicans* ATCC 90028 e *Candida parapsilosis* ATCC 22018 como organismo-controle, uma vez que as CIM para esses microrganismos são previamente conhecidas (CLSI, 1997).

3.3.1. MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO

3.3.1.1. PROTOCOLO CLSI/M27-A2 (CLSI, 2002b)

➤ *PREPARO DAS SOLUÇÕES-ESTOQUE*

Soluções estoques de itraconazol e anfotericina foram preparadas separadamente por solubilização do pó de cada uma dessas drogas em dimetilsulfóxido (DMSO) (Isifar, RJ, Brasil) para obter uma concentração de 1600µg/mL. Para a preparação da solução estoque de fluconazol à concentração de 1280µg/mL, o pó da droga foi solubilizado em água destilada estéril. Para o preparo das diluições seriadas, alíquotas de 1,1mL foram feitas a partir das soluções estoques e armazenadas a -20° C em frascos de polipropileno estéreis por um período de até 3 meses.

➤ *PREPARO DO MEIO DE CULTIVO*

Para a avaliação da susceptibilidade foi empregado o meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute* 1640) com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio e tamponado com ácido morfolinopropanosulfônico-MOPS (Angus Buffers & Biochemicals, Niágara Falls, NY, USA) e pH 7,0. Esse meio foi diluído em água destilada estéril na concentração de 46,5g/L e esterilizado por filtração em filtro biológico (Nalgene Company, Rochester, N.Y., USA). O armazenamento do meio foi feito em frascos de 1 litro sob refrigeração a 4° C por no máximo 3 semanas.

➤ *PREPARO DAS DILUIÇÕES*

Para os antifúngicos não solúveis em água (itraconazol e anfotericina B) foi utilizado DMSO (Isifar, RJ, Brasil) como diluente. A partir da solução estoque dessas drogas (1600µg/mL), preparou-se inicialmente as 10 diluições seriadas em DMSO a uma concentração 100 vezes superior a concentração final de ensaio (1600µg/mL-3,12µg/mL) (**figura 2**). Em seguida, realizou-se uma diluição a 1:50 em RPMI-1640, produzindo uma concentração de antifúngico duas vezes a concentração final de ensaio (32µg/mL-0,06µg/mL) (**figura 3**). Para as drogas solúveis em água (fluconazol),

o diluente empregado foi o RPMI-1640. Do mesmo modo, a partir da solução estoque (1280µg/mL), preparou-se a série de 10 diluições a uma concentração 10 vezes superior à concentração final de ensaio (640µg/mL-1,25µg/mL) (**figura 4**). Consecutivamente, uma diluição a 1:5 foi realizada acrescentando RPMI-1640 às 10 diluições seriadas, o que produziu uma concentração 2 vezes superior à concentração de ensaio (128µg/mL-0,25µg/mL) (**figura 5**).

Placas de microtitulação plásticas de fundo chato esterilizadas (Falcon 3072, Becton Dickinson, Lincoln Park, N.J.) contendo 8 linhas (identificadas de A à H) com 12 poços cada uma (96 poços no total) e 12 colunas (numeradas 01 à 12) foram utilizadas nos testes de susceptibilidade. Anteriormente à realização dos testes, as placas foram preenchidas com as 10 séries de diluições de antifúngicos com concentrações 2 vezes mais elevadas do que a concentração de ensaio. Aliquotas de 100µl dessas diluições foram dispensadas dentro dos poços entre as colunas 02 e 11 das placas de microtitulação. Os poços da coluna 01 foram preenchidos com 200µl de RPMI-1640 para controle de esterilidade (CE) e os poços da coluna 12 foram preenchidos com 100µl de RPMI-1640 ou 100µl de RPMI-1640 com DMSO 2% para controle de crescimento (CC). Após o envase, as placas foram fechadas e embaladas em papel de acetato ou *parafilm* (American Paper Inc., USA) e refrigeradas a -20° C até o momento de uso.

➤ *PREPARO DO INÓCULO*

A partir de cultivos em ágar de Sabouraud dextrosado (Oxoid, Hampshire, England) a 35° C por 24 horas, foram suspensas 5 colônias com diâmetro de 1mm em solução salina estéril a 0,85% (**figura 6**). A transmitância dessa suspensão foi ajustada para 70% em comprimento de onda de 530nm em espectrofotômetro (CELM, SP, Brasil), o que corresponde aproximadamente a $1-5 \times 10^6$ UFC/mL. Para produzir uma concentração celular entre $1-5 \times 10^3$ UFC, essa suspensão foi ainda diluída a 1:1000 em RPMI-1640. A inoculação das placas com antifúngicos foi procedida utilizando essa última diluição (solução balanceada inóculo-RPMI-1640) (**figura 7**)

➤ EXECUÇÃO DO TESTE DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO

Para a realização das provas, as placas de microtitulação foram retiradas da refrigeração e mantidas por 30 minutos em estufa a 35° C. Em seguida, alíquotas de 100µl da solução balanceada inóculo-RPMI-1640 foram dispensadas nos poços entre as colunas 02 e 12, levando a concentração dos antifúngicos para a concentração final de ensaio, ou seja, 16µg/mL-0,03µg/mL para drogas não solúveis em água e 64µg/mL-0,12µg/mL para drogas solúveis. Após a inoculação, as placas fechadas foram incubadas em estufa a 35° C por até 48 horas.

➤ LEITURA DOS RESULTADOS

No momento da leitura, o crescimento de microrganismos do poço-controle (número 12) foi comparado visualmente ao crescimento dos outros poços com as diferentes concentrações testadas (poços 02 a 11). Para tanto, as placas foram colocadas em suporte contendo um espelho para que fosse possível a observação do reverso das mesmas. A menor concentração capaz de induzir proeminente inibição do crescimento da levedura testada em relação ao poço-controle foi considerada, então, como a concentração inibitória mínima (CIM) do antifúngico. Para os azólicos, a CIM correspondeu ao primeiro tubo que apresentou uma inibição de crescimento $\geq 50\%$, comparativamente ao poço-controle (CLSI, 2002b; 2008b). Relativamente à anfotericina B, a CIM correspondeu ao primeiro poço que apresentou uma inibição completa do crescimento (100%). O significado dos valores de CIM obtidos para as drogas azólicas testadas frente às diferentes cepas de leveduras (**anexo 3**) foi definido conforme o documento M27-A2 (CLSI, 2002b; 2005). Todavia, para a anfotrecina B, a análise dos resultados obtidos pela técnica de microdiluição em caldo foi feita com base em trabalhos de Pfaller et al. (1994), Rex et al. (1995) e Wanger et al. (1995) que relataram que valores elevados de CIM ($>1\mu\text{g/mL}$ ou $\geq 2\mu\text{g/mL}$), possivelmente, indicariam cepas resistentes aos poliênicos entre os representantes de *Candida* spp.

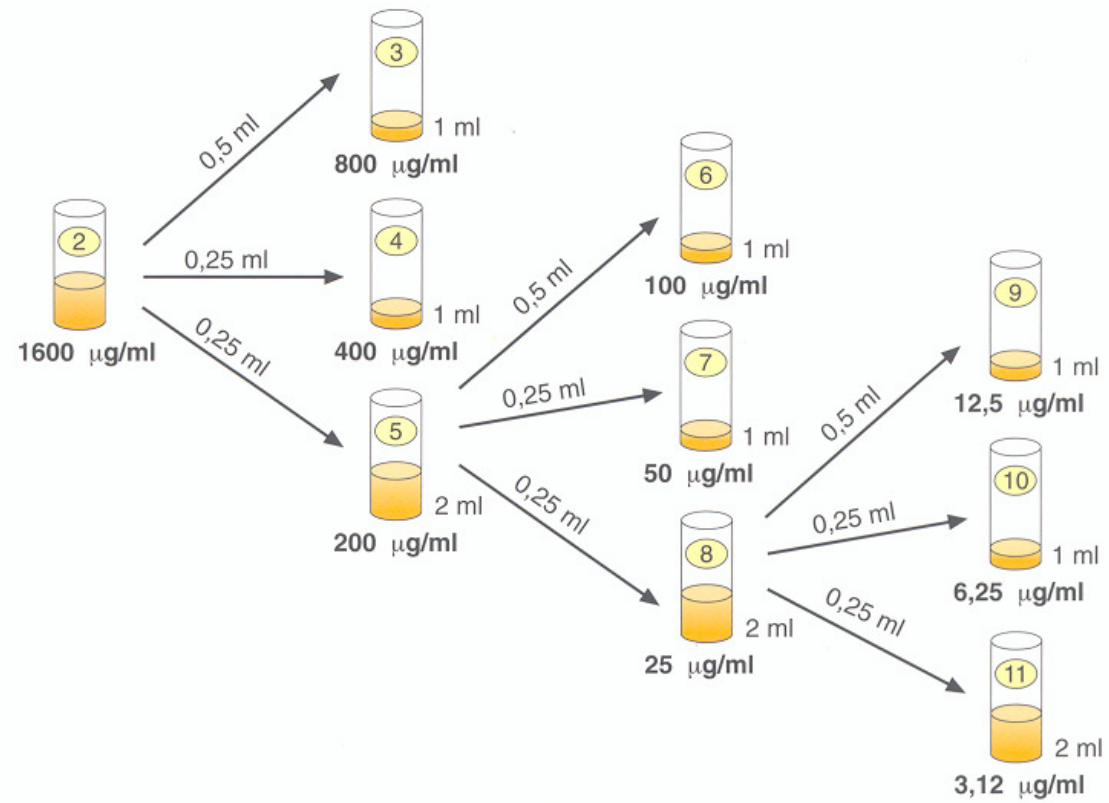


Figura 2. Esquema para as diluições de antifúngicos insolúveis em água. Diluente DMSO (PEMÁN et al., 2001).

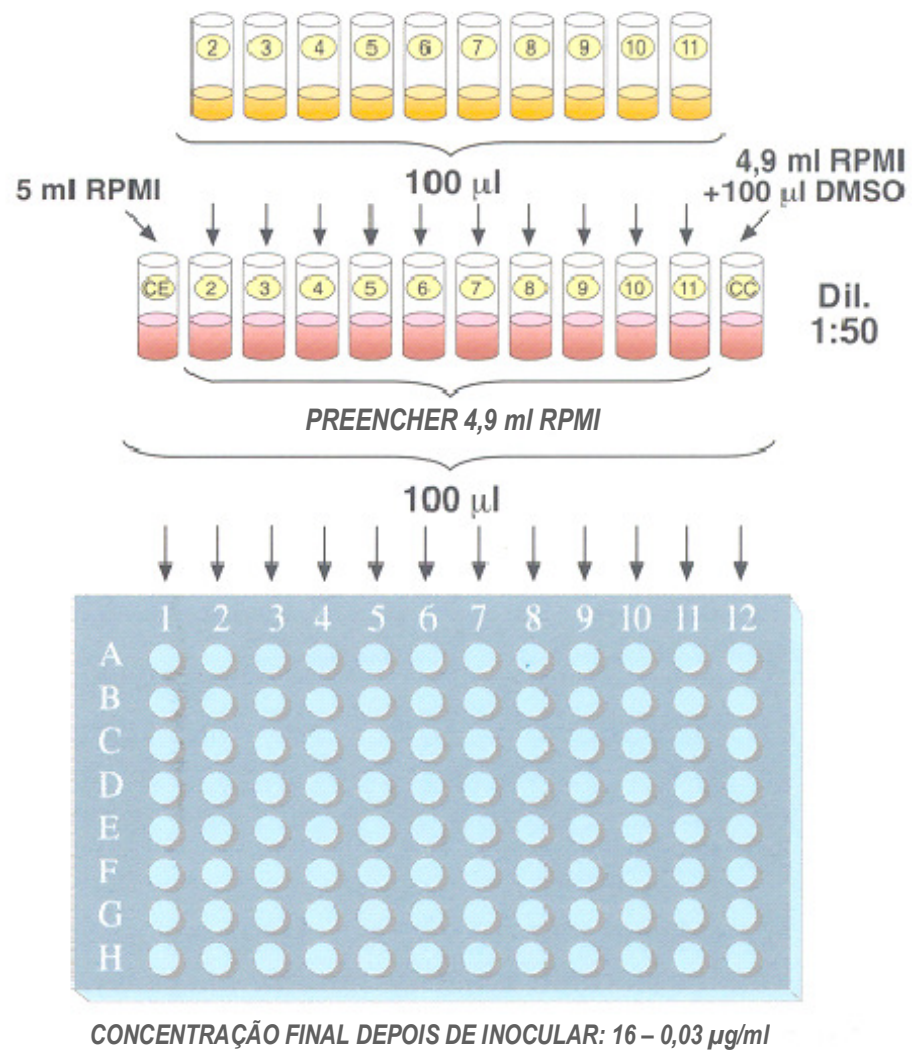


Figura 3. Preenchimento das placas de microdiluição com a solução de antifúngicos insolúveis em água (PEMÁN et al., 2001).

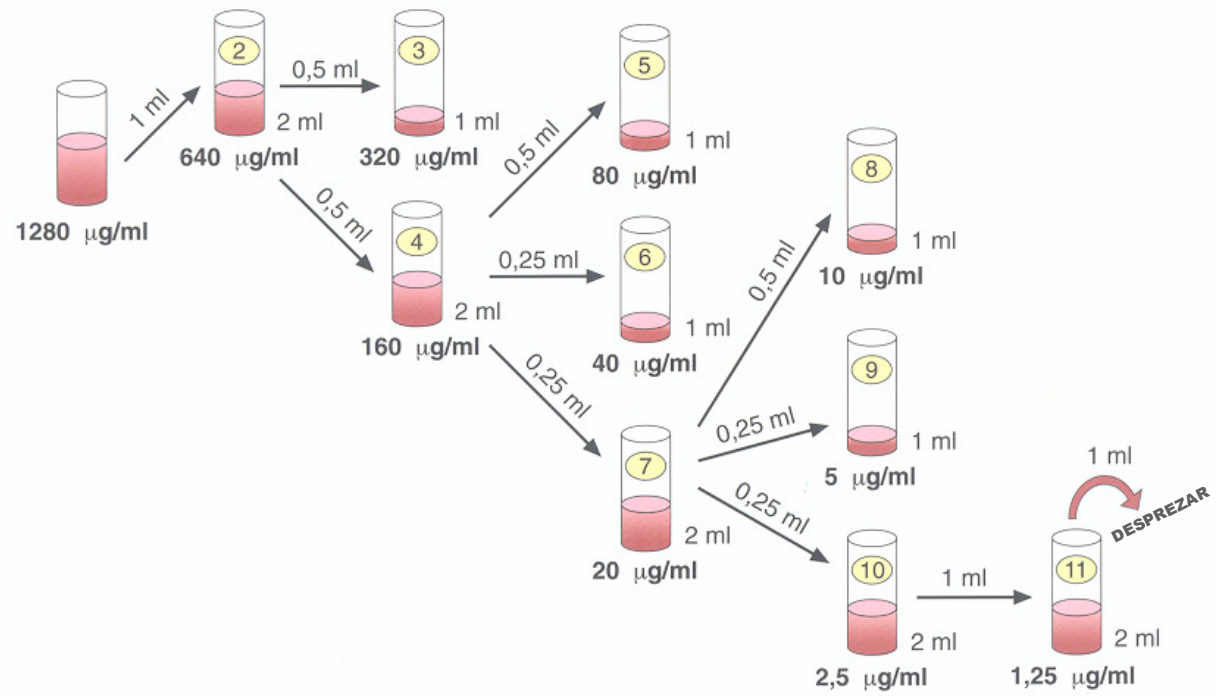


Figura 4. Esquema para as diluições de antifúngicos solúveis em água. Diluente RPMI (PEMÁN et al., 2001).

ADICIONAR EM TODOS OS TUBOS 4 ml RPMI

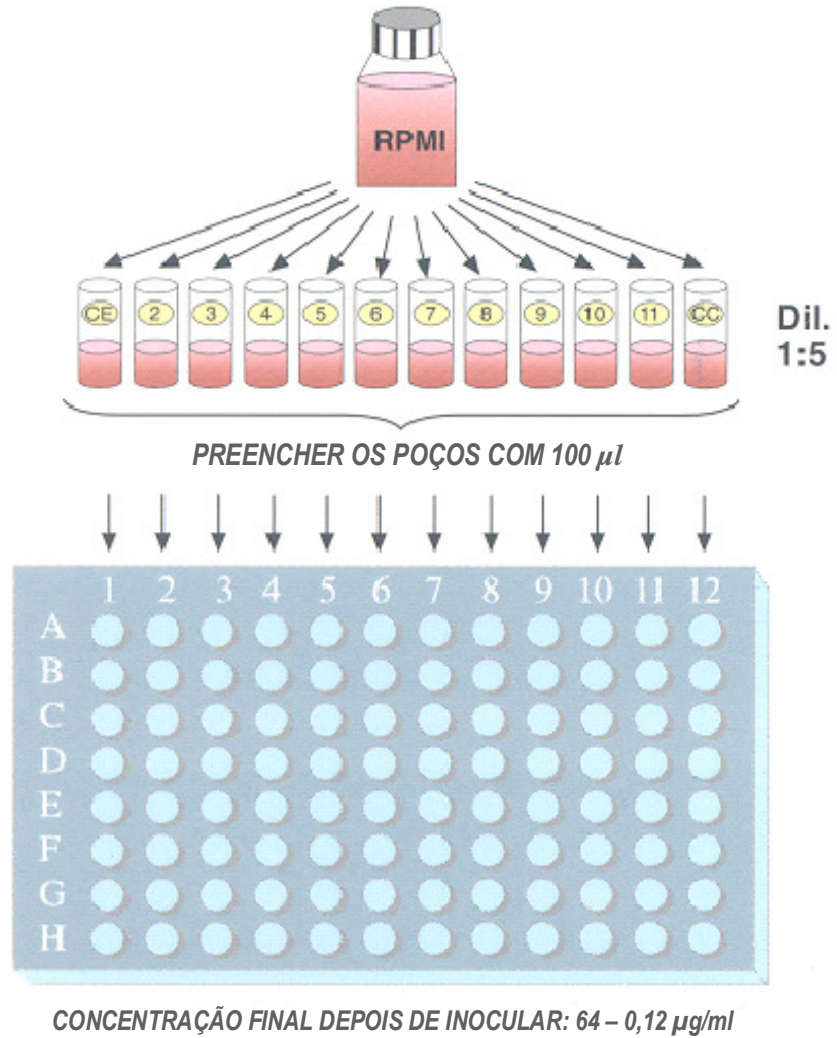


Figura 5. Preenchimento das placas de microdiluição com a solução de antifúngicos solúveis em água (PEMÁN et al., 2001).

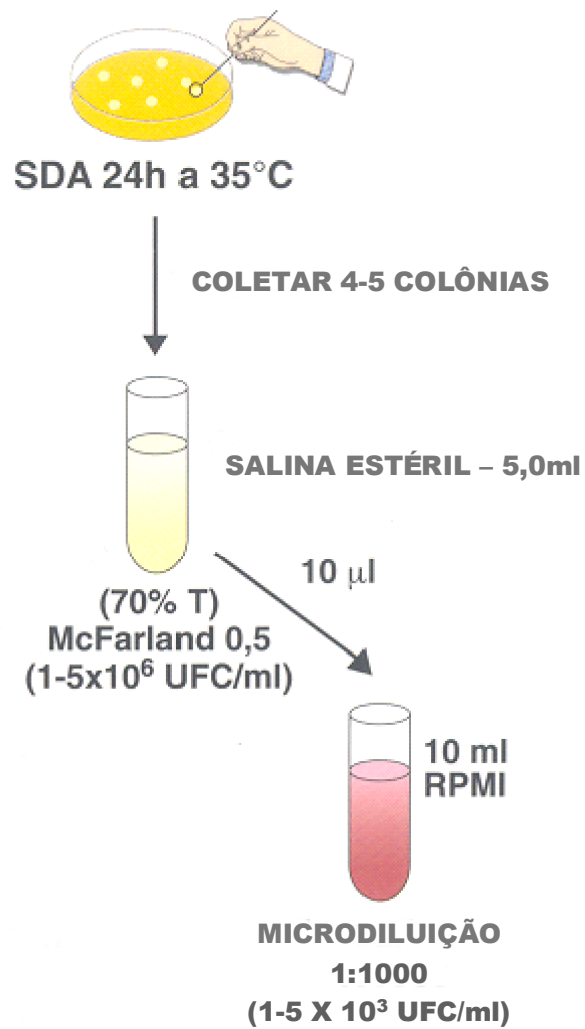


Figura 6. Preparação do inóculo de leveduras pela metodologia do CLSI (PEMÁN et al., 2001).

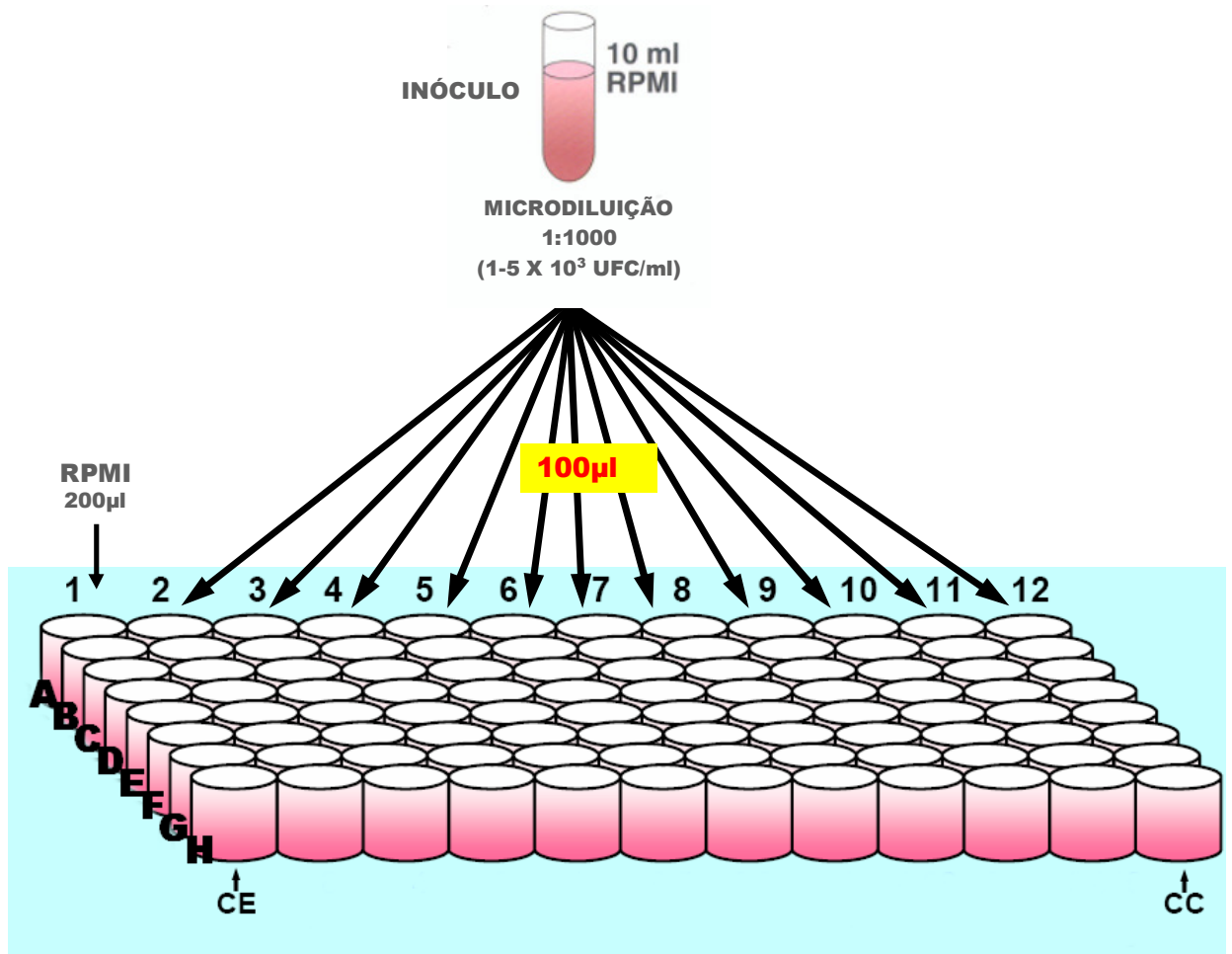


Figura 7. Inoculação das placas de microdiluição pela metodologia do CLSI (PEMÁN et al., 2001). CE controle de esterilidade, CC controle de crescimento.

3.3.1.2. PROTOCOLO EUCAST /E.Dis.7.1 (EUCAST, 2002)

A metodologia do *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) para a avaliação da susceptibilidade de isolados clínicos de *Candida* frente aos antifúngicos de uso sistêmico segue o protocolo recomendado pelo documento CLSI 27-A2, fundamentalmente, no que tange ao preparo das diluições (**figuras. 2 a 7**). As diferenças que caracterizam a metodologia do EUCAST podem ser sumarizadas:

- **PREPARO DO MEIO DE CULTIVO:** meio RPMI-1640 suplementado com 2% de glicose.
- **PREPARO DO INÓCULO:** inóculo ajustado em $1-5 \times 10^5$ (**figura 8**). A inoculação das placas com antifúngicos foi procedida utilizando esta maior densidade celular (**figura 9**).
- **TEMPO DE INCUBAÇÃO:** placas seladas incubadas em estufa à temperatura de 35° C por 24 horas.
- **LEITURA DOS RESULTADOS:** Leitura espectrofotométrica em leitor de microplacas (Termoplate, Brasil) ajustado para um comprimento de onda de 530nm. O aparelho foi programado para a coluna 1 (CE) ser o branco dos reagentes. O valor da densidade óptica (DO) do poço 12 (CC) com 100% de crescimento foi utilizado para calcular a inibição. Para os derivados azólicos, a CIM foi a concentração de antifúngico com valor de DO $\geq 50\%$ do valor de DO lido no poço 12. Para anfotericina B, a metodologia do EUCAST determina 90% de inibição em relação ao controle. Desta forma, o valor da CIM para anfotericina B foi a concentração de antifúngico com valor de DO igual a 90% do valor de DO lido no poço 12. O significado dos valores de CIM obtidos foram definidos (**anexo 4**) apenas para o fluconazol em relação à *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (EUCAST, 2007). No entanto, o significado dos valores de CIM obtidos para fluconazol em relação às outras espécies de *Candida* e itraconazol ainda não foram definidos pelo Comitê Europeu. Neste caso, para a avaliação das susceptibilidades, foram empregadas as diretrizes interpretativas (**anexo 3**) estabelecidas no documento M27-A2 do CLSI (CLSI, 2002). Objetivando estabelecer comparações com EUCAST, foram também utilizadas para *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* as diretrizes interpretativas para fluconazol (**anexo 3**) definidas no

documento M27-A2 do CLSI (CLSI, 2002). Com respeito à anfotericina B, a avaliação dos resultados foi também realizada a partir dos estudos de Pfaller et al. (1994), Rex et al. (1995) e Wanger et al. (1995), onde valores elevados de CIM ($>1\mu\text{g/mL}$ ou $\geq 2\mu\text{g/mL}$) indicariam cepas resistentes.

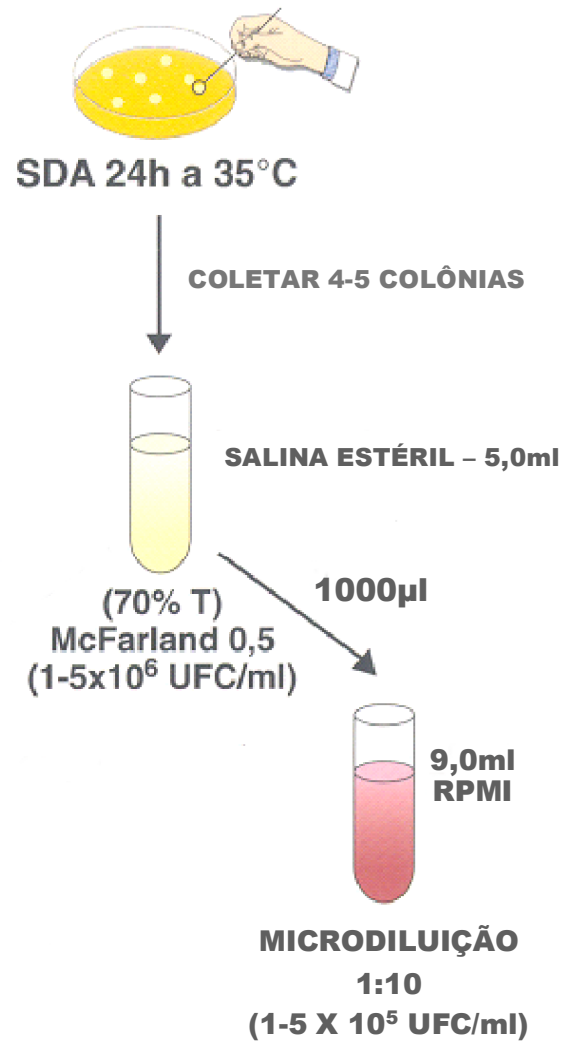


Figura 8. Preparação do inóculo de leveduras pela metodologia do EUCAST (Adaptado de PEMÁN et al., 2001).

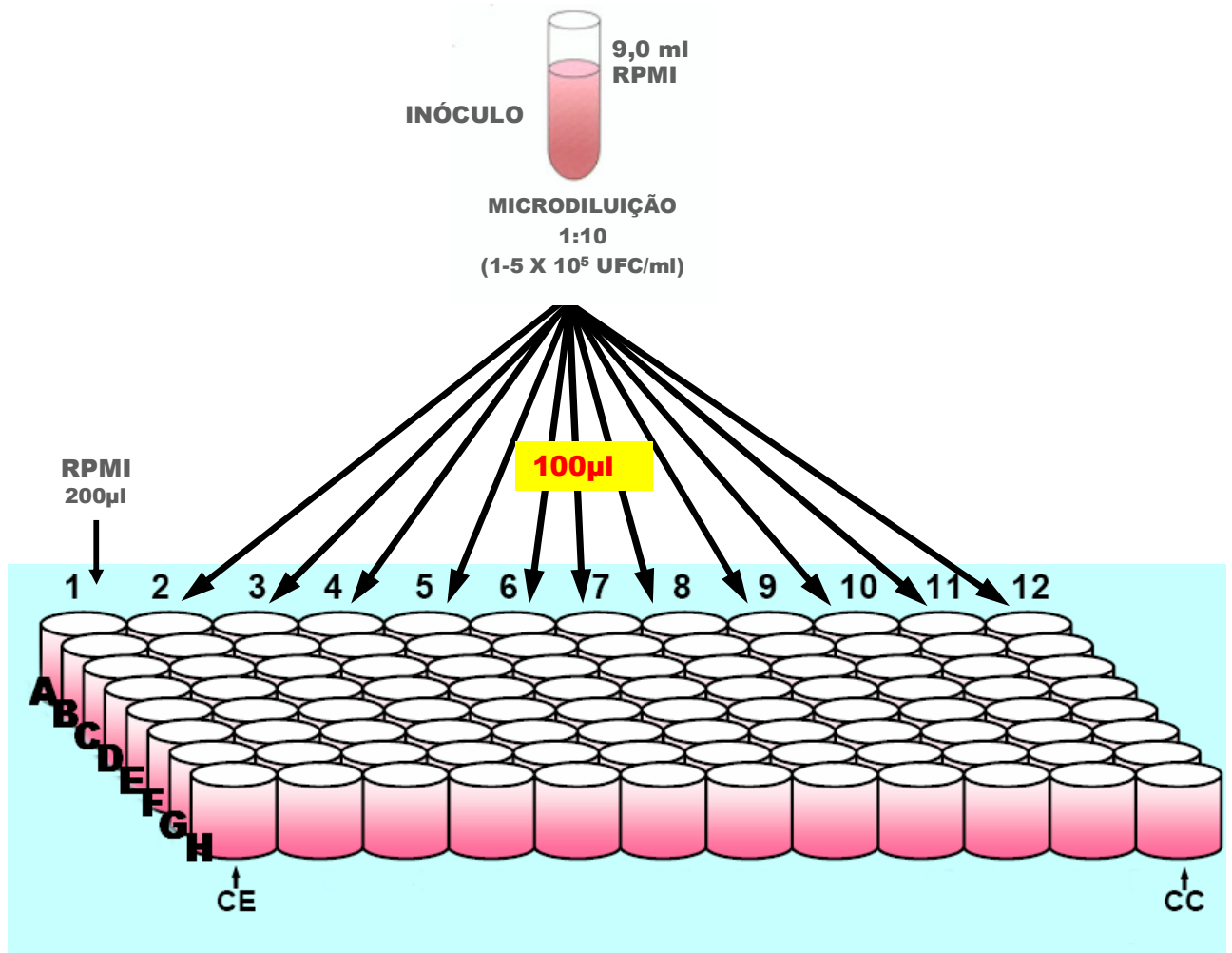


Figura 9. Inoculação das placas de microdiluição pela metodologia do EUCAST (modificado de Pemán et al., 2001). CE controle de esterilidade, CC controle de crescimento.

3.3.2. MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR

3.3.2.1. PROTOCOLO CLSI/M44-A (CLSI, 2004)

➤ DROGA ANTIFÚNGICA

Para a avaliação das susceptibilidades foi utilizado o fluconazol em disco de papel de filtro (CECON, Brasil). O armazenamento dos discos contendo 25µg de droga a ser testada foi feito sob congelamento a -20° C por um período de até 6 meses.

➤ PREPARO DO MEIO DE CULTIVO

O meio de cultivo empregado para realização da prova de disco-difusão foi o ágar Mueller-Hinton (Oxoid, Hampshire, England) suplementado com 2% de glicose (Oxoid, Hampshire, England) e 0,5µg/mL de azul de metileno (Vetec, RJ, Brasil) e pH 7,2-7,4. O meio foi preparado segundo a recomendação do fabricante e dispensado em placas de Petri. Placas embaladas com papel de acetato foram acondicionadas sob refrigeração à temperatura de 4-8° C.

➤ PREPARO DO INÓCULO

A partir de cultivos em ágar de Sabouraud dextrosado (Oxoid, Hampshire, England) a 35° C por 24 horas, foram suspensas 5 colônias com diâmetro de 1mm em solução salina estéril a 0,85% (**figura 10**). A transmitância dessa suspensão foi ajustada para 90% em comprimento de onda de 530nm em espectrofotômetro (CELM, SP, Brasil), o que correspondeu aproximadamente a $1-5 \times 10^6$ UFC/mL.

➤ EXECUÇÃO DO TESTE DE DIFUSÃO EM DISCO

No momento da execução dos testes, os discos de papel de filtro contendo o antifúngico foram retirados do *freezer* e mantidos por 2 horas à temperatura ambiente para o descongelamento. Para a coleta de uma alíquota do inóculo, um *swab* estéril foi introduzido na suspensão de leveduras, embebendo pesadamente as fibras de algodão do *swab* e pressionado firmemente contra as paredes do tubo de ensaio, para a retirada do excesso. A inoculação das placas de Petri com ágar Mueller-Hinton foi feita

pela técnica do esgotamento em estria com rotação da placa em ângulos de 60° por três vezes (**figura 10**). Em seguida, os discos contendo o antifúngico a ser ensaiado foram aplicados manualmente com o auxílio de uma pinça de metal estéril por deposição sobre o ágar, fazendo-se uma suave compressão, em seguida. Após 15 minutos da deposição dos discos no meio, as placas foram incubadas de forma invertida à 35° C por 24-48 horas. Conforme recomendado no documento M44-A do CLSI (CLSI, 2004).

➤ *LEITURA DOS RESULTADOS*

Após o período de incubação de 24-48 horas, foi procedida a leitura dos resultados. A visualização dos halos de inibição produzidos foi feita sob iluminação contra um fundo escuro e mensurado com paquímetro digital (Mitotoyo, Japão). O significado dos valores de CIM obtidos para a droga azólica testada (**anexo 5**) foi definido conforme os documentos M 44-A e M44-S2 (CLSI, 2004, 2007).

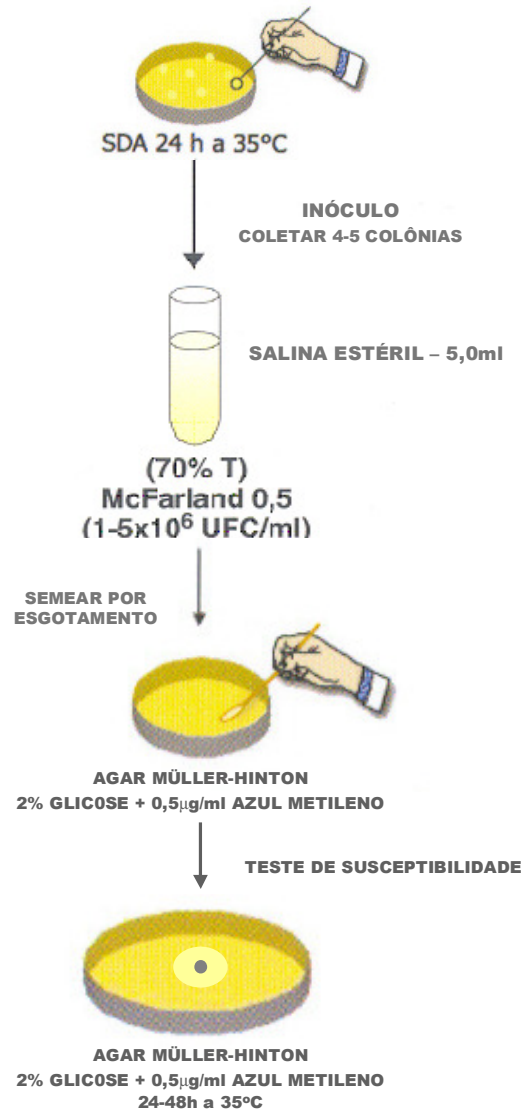


Figura 10. Protocolo M44-A para avaliação da susceptibilidade ao fluconazol (Adaptado de PEMÁN et al. 2008).

3.3.2.2. PROTOCOLO CECON

A avaliação da susceptibilidade dos isolados clínicos de *Candida* spp. frente ao itraconazol e à anfotericina B pelo método de difusão em ágar foi realizada de acordo com as recomendações do *kit* comercial utilizado (CECON, Brasil) que inclui a utilização de parte do protocolo descrito no documento M44-A do CLSI (CLSI, 2004). O preparo do inóculo e do meio de cultura, bem como a execução geral do teste foram procedidos como no documento M44-A (**figura 10**), contudo, diferentemente deste, foram empregados discos de papel de filtro contendo, separadamente, 10µg de itraconazol e 100µg de anfotericina B nos ensaios de susceptibilidade. Após um período de incubação de 24 horas, a leitura dos resultados foi realizada por mensuração dos halos de inibição com paquímetro digital. Para a interpretação desses resultados (**anexo 6**), foi utilizada as informações contidas na bula do *kit* comercial.

3.3.3. ANÁLISE COMBINADA DE RESULTADOS DAS CIM

O resultado das CIM obtidas pelos três métodos foi avaliado segundo 3 características de distribuição: (1) variação dos valores, representando os limites inferior e superior das CIM de cada antifúngico referente às diferentes espécies de leveduras testadas, (2) CIM₅₀ definida como a concentração inibitória mínima da droga capaz de inibir o crescimento de 50% das amostras testadas e (3) CIM₉₀ definida como a concentração inibitória mínima da droga capaz de inibir o crescimento de 90% das amostras testadas. A análise da correlação pareada entre as CIM obtidas para cada droga referente aos isolados clínicos testados foi procedida.

3.3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O coeficiente de correlação intraclassa (CCI) para as CIM obtidas pelas diferentes metodologias foi calculado pelo programa SPSS versão 11.0 (SPSS S.L., Madrid, España).

4. RESULTADOS

4.1. MICRORGANISMOS

Os 113 isolados fúngicos avaliados no presente trabalho foram recuperados de 100 pacientes provenientes de diferentes estabelecimentos de saúde do estado do Rio de Janeiro entre 2002 e 2007. Relativamente às características demográficas (**tabela 1**), 47 desses pacientes eram do sexo masculino e 37 do sexo feminino. Não foi possível, todavia, a determinação do sexo para 16 pacientes. A faixa etária variou de 0 a 104 anos e a maioria dos pacientes era jovem, apresentando idade entre 0 a 20 anos e 21 a 40 anos. A média geral de idade foi de 23,3 anos. Para 29 pacientes, não foi também possível a definição da idade. As principais patologias de base e fatores de risco identificadas foram, entre outras, a doença falciforme, leucemia linfóide aguda, leucemia mielóide aguda e síndrome da imunodeficiência adquirida.

4.1.1. PREVALÊNCIA DOS ISOLADOS FÚNGICOS

Os isolados fúngicos foram obtidos dos seguintes espécimens clínicos: abscesso subcutâneo, cateter venoso central, lesão de conduto auditivo externo, coprocultura, escarro, ferida cirúrgica, hemocultura, lavado brônquico, líquido pleural, lesão de membros superiores, secreção traqueal, úlceras tegumentares e urinocultura. Deste número de isolados, 108 eram do gênero *Candida* e 5 pertenciam a outros gêneros de leveduras. As espécies mais isoladas foram *C. albicans* (41,5%), *C. parapsilosis* (29,2%), *C. guilliermondii* (10,6%) e *C. tropicalis* (9,7%). *C. glabrata* (1,8%), *Cryptococcus humicolus* (1,8%), *Rhodotorula glutinis* (1,8%), *C. famata* (0,9%), *C. krusei* (0,9%), *C. lambica* (0,9%) e *Trichosporon* sp. (0,9%) foram as espécies que apresentaram os menores percentuais de isolamento. Em alguns casos, mais de um isolado foi obtido de um mesmo paciente.

4.1.2. DISTRIBUIÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS POR SEXO, IDADE E PATOLOGIA DE BASE

A **tabela 2** apresenta a distribuição dos isolados fúngicos estratificada por sexo, idade e doença de base dos pacientes. O maior número de isolamentos ocorreu em pacientes do sexo masculino. Nestes, foram recuperadas 56 (49,5%) cepas fúngicas. O número de isolamentos foi também preponderante na faixa etária entre 0-20 anos. Dentro desta faixa, foram recuperados 41 (36,2%) isolados clínicos. Com relação às patologias de base, as leucemias em suas diferentes formas clínicas foram os processos primários com a maior frequência de isolamento (26,5%).

4.1.3. DISTRIBUIÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS POR SÍTIO ANATÔMICO

A **tabela 3** ilustra a distribuição dos isolados estratificada por sítio anatômico. A maioria das cepas fúngicas foi recuperada de hemoculturas (46,0%), seguida por urinocultura (22,1%), lesões tegumentares (8%), trato respiratório (7,1%) e cateter (6,2%). Relativamente à hemocultura, as espécies isoladas foram *C. albicans* (38,4%), *C. parapsilosis* (34,6%), *C. guilliermondii* (11,5%), *C. tropicalis* (7,7%), *R. glutinis* (3,8%), *C. krusei* (2%) e *C. humicolus* (2%). De trato urinário foram recuperadas *C. albicans* (52%), *C. parapsilosis* (16%), *C. guilliermondii* (12%), *C. tropicalis* (8%), *C. famata* (4%), *C. humicolus* (4%) e *Trichosporon* sp. (4%). A partir de cultura de cateter, foram isoladas *C. albicans* (57,1%) e *C. parapsilosis* (42,9%).

TABELA 1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DOS 100 PACIENTES COM INFECÇÃO FÚNGICA.

CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS		NO.	%
SEXO	<i>FEMININO</i>	37	37,0
	<i>MASCULINO</i>	47	47,0
	<i>ND</i>	16	16,0
	<i>TOTAL</i>	100	100
IDADE	<i>0-20 ANOS</i>	33	33,0
	<i>21-40 ANOS</i>	15	15,0
	<i>41-60 ANOS</i>	05	5,0
	<i>61-80 ANOS</i>	11	11,0
	<i>>80 ANOS</i>	07	7,0
	<i>ND</i>	29	29,0
	<i>MÉDIA GERAL</i>	23,3	-
PATOLOGIA DE BASE	<i>DOENÇA FALCIFORME</i>	16	16,0
	<i>LLA</i>	10	10,0
	<i>LMA</i>	08	8,0
	<i>SIDA</i>	02	2,0
	<i>SÍNDROME MIELODISPLÁSICA</i>	02	2,0
	<i>SÍNDROME PULMONAR AGUDA</i>	02	2,0
	<i>ANEMIA APLÁSICA</i>	01	1,0
	<i>ESTENOSE DE JUP</i>	01	1,0
	<i>INSUFICIÊNCIA RENAL AGUDA</i>	01	1,0
	<i>LEUCEMIA</i>	01	1,0
	<i>LMC</i>	01	1,0
	<i>LNH</i>	01	1,0
	<i>MIELOMA MÚLTIPLO</i>	01	1,0
	<i>NEUROBLASTOMA</i>	01	1,0
	<i>SEPSIS</i>	01	1,0
	<i>ND</i>	51	51,0
	<i>TOTAL</i>	100	100

JUP, junção ureteropielica; *LLA*, leucemia LINFÓIDE aguda; *LMA*, leucemia mielóide aguda; *LMC*, leucemia mielóide crônica; *LNH*, linfoma não-hodgkin; *SIDA*, síndrome da imunodeficiência adquirida; *ND*, não determinado.

TABELA 2. DISTRIBUIÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS POR SEXO, IDADE E PATOLOGIA DE BASE.

PACIENTE	NO. DE ESPÉCIES FÚNGICAS ISOLADAS										
	<i>Calb</i>	<i>Cpara</i>	<i>C.gui</i>	<i>Ctrop</i>	<i>Cglab</i>	<i>Chum</i>	<i>Rglut</i>	<i>Cfam</i>	<i>Ckrus</i>	<i>Clamb</i>	<i>Trich</i>
SEXO											
<i>Masculino</i>	19	22	03	07	01	01	02		01		
<i>Feminino</i>	21	08	07	01		01		01			01
<i>ND</i>	07	03	02	03	01					01	
IDADE											
<i>0-20 Anos</i>	12	16	06	06			01				
<i>21-40 Anos</i>	04	09	01	01							
<i>41-60 Anos</i>	04					01					01
<i>61-80 Anos</i>	07	01	02	01		01		01			
<i>>80 Anos</i>	04	01					01		01		
<i>ND</i>	16	06	03	03	02					01	
PATOLOGIA											
<i>Anemia Aplásica</i>				01							
<i>Doença Falciforme</i>	04	06	02	02		01					
<i>Estenose JUP</i>				01							
<i>Insuficiência Renal Aguda</i>	01										
<i>Leucemia</i>									01		

TABELA 2. CONTINUAÇÃO.

PACIENTE	NO. DE ESPÉCIES FÚNGICAS ISOLADAS										
	<i>Calb</i>	<i>Cpara</i>	<i>C.gui</i>	<i>Ctrop</i>	<i>Cglab</i>	<i>Chum</i>	<i>Rglut</i>	<i>Cfam</i>	<i>Ckrus</i>	<i>Clamb</i>	<i>Trich</i>
PATOLOGIA											
<i>LLA</i>	03	09	03	01		01	01				
<i>LMA</i>	02	06	02								
<i>LMC</i>	01										
<i>LNH</i>	01										
<i>Mieloma Múltiplo</i>								01			
<i>Neuroblastoma</i>		01		01							
<i>Sepsis</i>	01										
<i>AIDS</i>	03										
<i>Síndrome Mielodisplásica</i>		01		01							
<i>Síndrome Pulmonar Aguda</i>	02										
<i>ND</i>	29	10	05	04	02		01			01	01
TOTAL	47	33	12	11	02	02	02	01	01	01	01

Calb, *Candida albicans*; *Cpara*, *Candida parapsilosis*; *Cgui*, *Candida guilliermondii*; *Ctrop*, *Candida tropicalis*; *Cglab*, *Candida glabrata*; *Chum*, *Cryptococcus humicolus*; *Rglut*, *Rhodotorula glutinis*; *Cfam*, *Candida famata*; *Ckrus*, *Candida krusei*; *Clamb*, *Candida lambica*; *Trich*, *Trichosporon sp.*; *JUP*, junção ureteropielica; *LLA*, leucemia LINFÓIDE aguda; *LMA*, leucemia mielóide aguda; *LMC*, leucemia mielóide crônica; *LNH*, linfoma não-hodgkin; *SIDA*, síndrome da imunodeficiência adquirida; *ND*, não determinado.

TABELA 3. DISTRIBUIÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS POR SÍTIO ANATÔMICO.

ESPÉCIMENS CLÍNICOS	NO. DE ESPÉCIES FÚNGICAS ISOLADAS										
	<i>Calb</i>	<i>Cpara</i>	<i>C.gui</i>	<i>Ctrop</i>	<i>Cglab</i>	<i>Chum</i>	<i>Fglut</i>	<i>Cfam</i>	<i>Ckrus</i>	<i>Clamb</i>	<i>Trich</i>
Abscesso Subcutâneo				01							
Cateter	04	03									
LCAE	01										
Coprocultura	02		01								
Escarro	03										
Ferida Cirúrgica					01						
Hemocultura	20	18	06	04		01	02		01		
Lavado Brônquico	02										
Líquido Pleural		02									
Secreção Traqueal										01	
Úlceras Tegumentares	02	04									
Urinocultura	13	04	03	02		01		01			01
ND		02	02	04	01						
Total	47	33	12	11	02	02	02	01	01	01	01

Calb, *Candida albicans*; *Cpara*, *Candida parapsilosis*; *Cgui*, *Candida guilliermondii*; *Ctrop*, *Candida tropicalis*; *Cglab*, *Candida glabrata*; *Chum*, *Cryptococcus humicolus*; *Fglut*, *Rhodotorula glutinis*; *Cfam*, *Candida famata*; *Ckrus*, *Candida krusei*; *Clamb*, *Candida lambica*; *Trich*, *Trichosporon* sp.; LCAE, lesão de conduto auditivo externo; ND, não determinado.

4.2. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS

4.2.1. IDENTIFICAÇÃO CROMOGÊNICA E MORFOLÓGICA

O resultado do estudo cromogênico e morfológico é apresentado no **anexo 1**. Os 113 agentes fúngicos foram avaliados cromogenicamente por subcultivos em CHROMagar-*Candida* (Probac, Brasil) para a identificação de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Todos os 59 isolados destas três espécies foram corretamente identificados neste meio, demonstrando a sensibilidade e especificidade da técnica. No entanto, para outras espécies, estas medidas foram variáveis. A sensibilidade e a especificidade em *C. guilliermondii* foi 100% e 69,3% e em *C. parasilosis*, 75,7% e 77,5%, respectivamente. A identificação morfológica de *C. albicans* pelas técnicas do tubo germinativo e do clamidósporo permitiram identificar adequadamente 42 isolados. Cinco isolados, contudo, não foram identificados por nenhuma das duas técnicas. Para ambos os métodos morfológicos, a sensibilidade foi de 89,4% e especificidade de 100%.

4.2.2. IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA

A identificação bioquímica foi realizada por automação em equipamento VITEK (BioMerieux, França) que é capaz de detectar 33 espécies de levedura de importância clínica. Todos os isolados investigados foram identificados neste equipamento (**anexo 1**). Todavia, dentre estes, 90 (79,6%) apresentaram taxa de probabilidade $\geq 85\%$ para a primeira opção de identificação oferecida pelo *software* do aparelho. O restante dos isolados apresentou taxas de probabilidade que variaram de 50-83% ($< 85\%$). Um número de 89 (78,8%) isolados foram identificados de forma correta e completa pelo VITEK, pois demonstraram taxas de probabilidade $\geq 85\%$ e não foram solicitados testes suplementares. Em decorrência da solicitação de provas auxiliares pelo equipamento e percentuais de probabilidade $< 85\%$, no entanto, a identificação de 23 isolados clínicos foi considerada incompleta. Apesar da cepa de *Trichosporon* sp. (LMC-288T) ter apresentado percentual de probabilidade de 99% ($\geq 85\%$), como a automação não foi capaz de indicar a espécie, solicitando, por isto, outras provas, esta identificação foi também considerada incompleta. Deste modo, um total de 24 isolados foram identificados de maneira incompleta na bioquímica do equipamento VITEK. Oito

(33,3%) isolados, todavia, puderam ter suas identidades confirmadas nas provas complementares propostas no presente estudo.

4.2.3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

A identificação molecular foi procedida empregando a técnica de *multiplex*-PCR. Uma combinação de 10 *primers* foi utilizada para a detecção específica das espécies de *Candida* mais prevalentes e/ou com tendência à resistência a antifúngicos de uso sistêmico segundo a literatura (PFALLER & DIEKEMA, 2007), sendo estas: *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Dos 113 isolados fúngicos, 106 foram corretamente identificados com os *primers* empregados (**anexo 1**). Entretanto, para os outros sete isolados, *C. famata* (LMC-307T), *C. lambica* (LMC-325T), *C. humicolus* (LMC-255T, LMC-290T), *R. glutinis* (LMC-276T, LMC-317T) e *Trichosporon* sp. (LMC-288T), os *primers* não foram capazes, como esperado, de detectá-los, mostrando a especificidade da técnica (100%), pois não houve amplificação de DNA de microorganismos para os quais os *primers* não tinham sido desenhados. Nenhuma cepa de *C. dubliniensis* e *C. lusitaniae* foi identificada nas amostras testadas. A **figura 11** apresenta os perfis eletroforéticos das 6 espécies detectadas pela técnica da *multiplex*-PCR.

4.2.4. COMPARAÇÃO DE RESULTADOS

A comparação entre os resultados obtidos para as 47 cepas de *C. albicans* no CHROMagar-*Candida* com aqueles obtidos nas provas morfológicas demonstrou haver discrepância entre 5 (10,6%) cepas (**anexo 1**). Estas apresentaram-se negativas tanto no teste do tubo germinativo quanto no teste do clamidósporo, mesmo exibindo uma coloração verde no meio cromogênico. Uma sensibilidade de 89,4% e uma especificidade de 100% foram encontradas para *C. albicans*. Relativamente aos isolados de *C. tropicalis* e *C. krusei*, houve concordância de resultados (100%), pois estas espécies mostraram em CHROMagar suas colorações características (azul-cobalto e rosa-fosco, respectivamente) e foram negativas nas provas morfológicas.

Uma outra comparação entre os resultados obtidos para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* no CHROMagar com aqueles obtidos na bioquímica revelou que os 59 isolados destas três espécies apresentaram concordância (100%) com a

automação (**anexo 1**). Deste número, 8 isolados (*C. albicans* LMC-272T, LMC-273T, LMC-274T, LMC-322T, LMC-348T e *C. tropicalis* LMC-279T, LMC-293T, LMC-356T) estavam distribuídos pelo grupo cujas taxas de probabilidade ficaram entre 50-83% (identificação incompleta) no VITEK, o que permitiu a confirmação dos resultados encontrados neste equipamento.

A análise comparativa entre os resultados obtidos nos testes do tubo germinativo e do clamidósporo para *C. albicans* com aqueles obtidos na bioquímica mostrou que, como na avaliação cromogênica, 42 (89,4%) isolados apresentaram concordância de resultados com o VITEK (**anexo 1**). No entanto, esta concordância foi verificada apenas na bioquímica com percentual de probabilidade $\geq 85\%$. Os outros 5 isolados de *C. albicans* que exibiram resultados negativos nos testes morfológicos apresentaram também bioquímica com probabilidade $< 85\%$. Neste caso, não foi possível confirmar, pela morfologia, as identificações informadas na automação.

A comparação entre os resultados obtidos na avaliação molecular com aqueles encontrados no CHROMagar para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, revelou uma correlação de 100% (**anexo 1**). A sensibilidade e especificidade da *multiplex*-PCR em relação ao CHROMagar para *C. guilliermondii* foi, respectivamente, 100% e 69,3%. Para *C. parapsilosis*, estes valores foram 75,7% e 77,5%. Comparando com as provas morfológicas, a *multiplex*-PCR apresentou uma sensibilidade de 89,4%. Com relação à comparação com testes bioquímicos, esta PCR foi capaz de detectar 95,6% dos isolados informados na automação. No presente estudo, a *multiplex*-PCR demonstrou valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) médios de 71,5% e 95,4%, respectivamente, quando confrontada com as outras metodologias avaliadas.



Figura 11. Padrão de bandas dos produtos de *multiplex-PCR* em gel de agarose a 2% de cepas de referência e isolados clínicos de *Candida* spp. M, marcador de peso molecular (100 pb); linha 1, *C. albicans* INCQS-40071; linha 2, *C. krusei* INCQS-40095; linha 3, *C. tropicalis* INCQS-40042; linha 4, *C. parapsilosis* INCQS-40038; linha 5, *C. guilliermondii* INCQS-40037; linha 6, *C. glabrata* INCQS-40136; linha 7, *C. tropicalis* INCQS-40042; linha 8, *C. lusitanae* INCQS-40137; linha 9, *C. famata* LMC-307T; linha 10, *C. krusei* LMC-287T; linha 11, *C. albicans* LMC-348T; linha 12, *C. guilliermondii* LMC-263T; linha 13, *C. parapsilosis* LMC-303T; linha 14, *C. tropicalis* LMC-338T; linha 15, *C. glabrata* LMC-360T.

4.3. ANTIFÚNGICOS

4.3.1. VALORES DE CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS MÍNIMAS (CIM) DOS ANTIFÚNGICOS ESTUDADOS

Foram avaliados 1017 resultados de concentrações inibitórias mínimas (CIM) referentes aos 3 antifúngicos (fluconazol, itraconazol e anfotericina B) testados frente 113 isolados clínicos, segundo as metodologias de microdiluição em caldo e difusão em ágar (**anexo 2**). Em todos os ensaios foram incluídas as cepas-controle do *American Type Culture Collection* (ATCC) para validação dos testes. A variação dos valores de CIM para estas cepas foi concordante com aqueles estabelecidos pelas metodologias do CLSI e EUCAST. As **figuras 12 e 13** ilustram os resultados obtidos com a metodologia de microdiluição em caldo e difusão em ágar.

4.3.1.1. PROTOCOLO CLSI/M27-A2

A variação dos valores de CIM foi de 0,12 a 64 µg/mL para fluconazol, 0,015 a 0,25µg/mL para itraconazol e 0,06 a 1µg/mL para anfotericina B. Com relação aos valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ para os 113 isolados, estes foram, respectivamente, 0,5 e 1,0µg/mL para fluconazol, 0,06 e 0,12µg/mL para itraconazol e 0,25 e 0,5µg/mL para anfotericina B, o que demonstrou a boa atividade destes antifúngicos frente às leveduras testadas. Estes dados estão apresentados na **tabela 4**. Por espécie, *C. krusei*, *C. lambica* e *R. glutinis* foram aquelas que apresentaram as CIM mais elevadas (16-64µg/mL) para fluconazol (**tabela 5**). CIM de 0,25µg/mL para itraconazol foram observadas em *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. lambica* e *Trichosporon* sp. (**tabela 6**). No caso da anfotericina B, as espécies que apresentaram valores de CIM de 1µg/mL foram *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (**tabela 7**). A maior variação de valores de CIM foi observada para fluconazol onde os valores de CIM foram distribuídos entre 9 diluições e a menor foi verificada para anfotericina B cuja variação se estendeu entre 5 diluições. As **tabelas 8, 9 e 10** mostram estes resultados.

4.3.1.2. PROTOCOLO EUCAST/E.Dis.7.1

Relativamente à variação dos valores de CIM, esta foi para fluconazol de 0,12 a 64µg/mL, para itraconazol de 0,015 a 0,5µg/mL e para anfotericina B de 0,06 a 1,0µg/mL. Os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ foram, respectivamente, 0,5 e 2,0µg/mL para fluconazol, 0,03 e 0,12µg/mL para itraconazol e 0,25 e 0,5µg/mL para anfotericina B. Também aqui foi possível verificar a efetividade antifúngica das drogas estudadas. A **tabela 4** exibe estes resultados. Separadamente, por espécie, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lambica* e *R. glutinis* foram aquelas que demonstraram CIM entre 16 e 64µg/mL para fluconazol (**tabela 5**). Para itraconazol, CIM entre 0,25 e 0,5µg/mL foram verificadas em *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *Trichosporon* sp. (**tabela 6**). As espécies que apresentaram valores de CIM para anfotericina B de 1µg/mL foram *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, e *C. tropicalis* (**tabela 7**). Para EUCAST, também a maior variação de valores de CIM foi encontrada em fluconazol (nove diluições) e a menor em anfotericina B (cinco diluições). Estes dados são, igualmente, apresentados nas **tabelas 8, 9 e 10**.

4.3.1.3. PROTOCOLOS CLSI/M44-A E CECON

A variação do diâmetro da zona de inibição para cada um dos antifúngicos foi de 01 a 50mm para fluconazol, 14 a 41mm para itraconazol e 16 a 32mm para anfotericina B. Como o resultado de CIM é dado por faixas na metodologia de difusão em ágar, estas ficaram entre 8 e 64 µg/mL para fluconazol e <1µg/mL para anfotericina B. Para itraconazol, no entanto, não há faixas de CIM estabelecidas. Os resultados da variação dos diâmetros de inibição e das faixas de CIM para os três antifúngicos analisados, segundo CLSI e CECON, são apresentados, comparativamente, na **tabela 11**. A análise por espécie permitiu verificar que, para fluconazol, *C. krusei* e *R. glutinis* foram as espécies que apresentaram diâmetros de inibição com os mais baixos valores (1-8mm). *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. lambica*, *C. tropicalis* e *R. glutinis* foram os isolados onde os menores diâmetros foram encontrados (1-19mm) para itraconazol. Para anfotericina B, o menor diâmetro (16mm) foi observado em *C. albicans*. A **tabela 12** exibe estes dados.

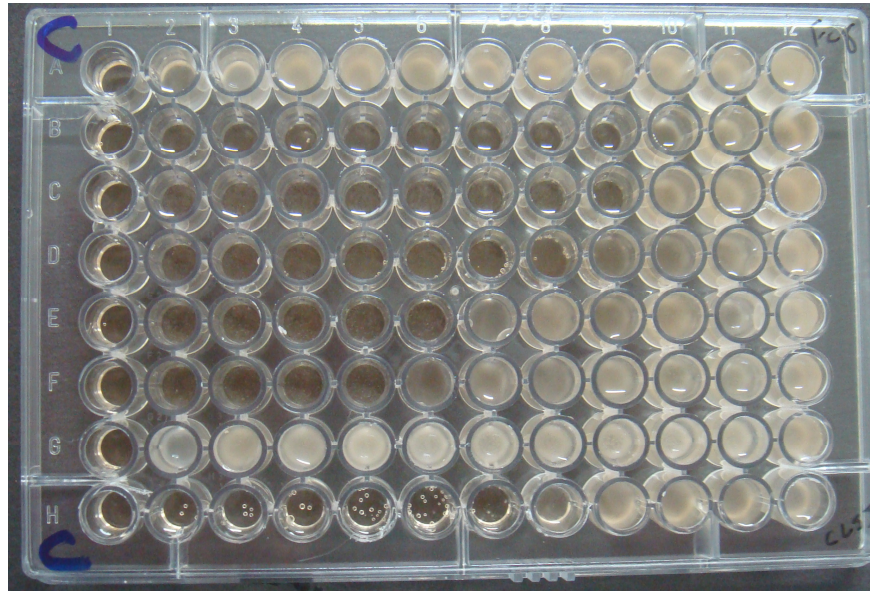


Figura 12. Leitura do teste de microdiluição em caldo para fluconazol segundo o documento CLSI/M27-A2: colunas 1 e 12 representam os controles de esterilidade e de crescimento, respectivamente, colunas 02 a 11 representam as concentrações de 64 a 0,125 μ g/mL, linhas A a F mostram os resultados para os isolados clínicos testados e linhas G e H exibem os resultados para as cepas-controle. O crescimento é visualizado pela turbidez.

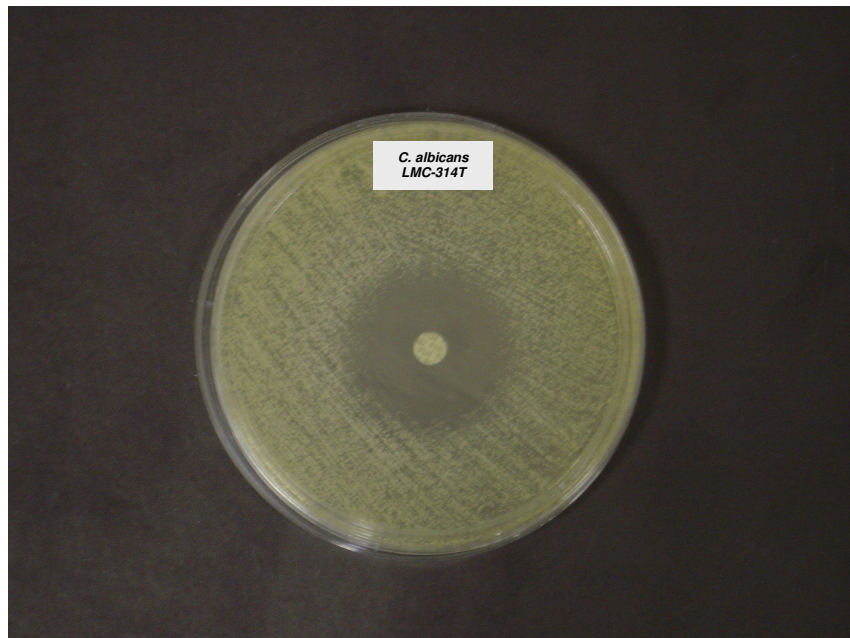


Figura 13. Leitura do teste de difusão em ágar para fluconazol segundo o documento CLS/M44-A. O diâmetro (mm) da zona de inibição indica a susceptibilidade do fungo à droga testada.

TABELA 4. VARIAÇÃO DE CIM, VALORES DE CIM₅₀ E CIM₉₀ E PERCENTUAL DE SUSCEPTIBILIDADE AO FLUCONAZOL, ITRACONAZOL E ANFOTERICINA B PARA OS 113 ISOLADOS CLÍNICOS TESTADOS SEGUNDO A METODOLOGIA DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO DO CLSI E EUCAST.

Antifúngicos	Metodologia	Variação ($\mu\text{g/mL}$)	CIM 50 ($\mu\text{g/mL}$)	CIM 90 ($\mu\text{g/mL}$)	Susceptibilidade (No./%)		
					S	SDD	R
Fluconazol	CLSI	0,12-64	0,5	1	110/97,3	02/1,8	01/0,9
	EUCAST*	0,12-64	0,5	2	107/94,7	05/4,4	01/0,9
	EUCAST**	0,12-64	0,5	2	105/93,0	05/4,4	03/2,6
Itraconazol	CLSI	0,015-0,5	0,06	0,12	109/96,5	04/3,5	00/00
	EUCAST*	0,015-0,5	0,03	0,12	107/94,6	6/5,4	00/00
Anfotericina B	CLSI	0,06-1	0,25	0,5	113/100	00/00	00/00
	EUCAST*	0,06-1	0,25	0,5	113/100	00/00	00/00

(*) ponto de corte segundo CLSI; (**) ponto de corte segundo EUCAST; S, susceptibilidade; SDD, susceptibilidade dependente de dose; R, resistência.

TABELA 5. INTERVALO DE CIM, VALORES DE CIM₅₀ E CIM₉₀ E PERCENTUAL DE SUSCEPTIBILIDADE PARA FLUCONAZOL ESTRATIFICADOS POR ESPÉCIES FÚNGICAS SEGUNDO A METODOLOGIA DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO DO CLSI E EUCAST.

Espécies Fúngicas (No.)	Metodologia	Fluconazol					
		Intervalo/Valor (µg/mL)	CIM 50 (µg/mL)	CIM 90 (µg/mL)	Susceptibilidade		
					%S	%SDD	%R
<i>C. albicans</i> (47)	CLSI	0,12-8	0,5	1	100	0	0
	EUCAST*	0,12-16	0,25	1	97,9	2,1	0
	EUCAST**	0,12-16	0,25	1	95,7	0	4,3
<i>C. parapsilosis</i> (33)	CLSI	0,12-1	0,5	1	100	0	0
	EUCAST*	0,12-2	05	1	100	0	0
	EUCAST**	0,12-2	05	1	100	0	0
<i>C. guilliermondii</i> (12)	CLSI	0,25-2	1	2	100	0	0
	EUCAST*	0,25-4	0,5	4	100	0	0
<i>C. tropicalis</i> (11)	CLSI	0,25-4	0,5	1	100	0	0
	EUCAST*	0,12-4	0,5	1	100	0	0
	EUCAST**	0,12-4	0,5	1	91,0	9,0	0
<i>C. glabrata</i> (2)	CLSI	8	-	-	100	0	0
	EUCAST*	16	-	-	0	100	0
<i>C. humicolus</i> (2)	CLSI	0,5-1	0,5	1	100	0	0
	EUCAST*	0,5-1	0,5	1	100	0	0
<i>R. glutinis</i> (2)	CLSI	0,25-16	0,25	16	50	50	0
	EUCAST*	0,25-16	0,25	16	50	50	0
<i>C. famata</i> (1)	CLSI	01	-	-	100	0	0
	EUCAST*	01	-	-	100	0	0
<i>C. krusei</i> (1)	CLSI	64	-	-	0	0	100
	EUCAST*	64	-	-	0	0	100

TABELA 5. CONTINUAÇÃO.

Espécies Fúngicas (No.)	Metodologia	Fluconazol					
		Intervalo/Valor (µg/mL)	CIM 50 (µg/mL)	CIM 90 (µg/mL)	Susceptibilidade		
					%S	%SDD	%R
<i>C. lambica</i> (1)	CLSI	16	-	-	0	100	0
	EUCAST*	16	-	-	0	100	0
<i>Trichosporon</i> sp. (1)	CLSI	1	-	-	100	0	0
	EUCAST*	2	-	-	100	0	0

(*) ponto de corte segundo CLSI; (**) ponto de corte segundo EUCAST; S, susceptibilidade; SDD, susceptibilidade dependente de dose; R, resistência.

4.3.2. PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AO FLUCONAZOL

4.3.2.1. PROTOCOLO CLSI/M27-A2

Entre os 113 isolados fúngicos incluídos neste estudo, 110 (97,3%) foram considerados susceptíveis (S) (CIM $\leq 8\mu\text{g/mL}$), 02 (1,8%) susceptíveis dependente de dose (SDD) (CIM 16-32 $\mu\text{g/mL}$) e 01 (0,9%) resistente (R) (CIM $\geq 64\mu\text{g/mL}$). Os isolados que apresentaram susceptibilidade dependente de dose foram *C. lambica* (100%) e *R. glutinis* (50%). Apenas *C. krusei* (100%) apresentou resistência frente a este antifúngico. Os demais isolados foram classificados como susceptíveis. As **tabelas 4 e 5** ilustram os referidos resultados. De acordo com a **tabela 8**, o fluconazol foi mais efetivo na faixa de CIM entre 0,25-1,0 $\mu\text{g/mL}$.

4.3.2.2. PROTOCOLO EUCAST/E.Dis.7.1

Dentre os isolados investigados, 107 (94,7%) foram categorizados como susceptíveis, 5 (4,4%) como susceptíveis dependente de dose e 1 (0,9%) como resistente, quando levados em conta os pontos de corte definidos pelo CLSI (S, $\leq 8\mu\text{g/mL}$; SDD, 16-32 $\mu\text{g/mL}$; R, $\geq 64\mu\text{g/mL}$) (**anexo 3**). Contudo, quando considerados os pontos de corte definidos pelo CLSI juntamente com aqueles estabelecidos especificamente para *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* pelo EUCAST (S, $\leq 2\mu\text{g/mL}$; SDD, 4 $\mu\text{g/mL}$; R, $\geq 8\mu\text{g/mL}$) (**anexo 4**), 105 (93,%) isolados foram classificados como susceptíveis, 05 (4,4%) como susceptíveis dependente de dose e 03 (2,6%) como resistentes. Empregando os pontos de corte do CLSI, as espécies susceptíveis dependente de dose foram *C. albicans* (2,1%), *C. lambica* (100%) e *R. glutinis* (50%) e o isolado resistente foi *C. krusei* [LMC-287T] (100%). Submetendo os isolados clínicos aos pontos de corte do EUCAST, 9,0% dos isolados de *C. tropicalis* foram susceptível dependente de dose e 4,3% dos isolados de *C. albicans* foram resistentes. Em ambos os pontos de corte, *C. parapsilosis* foi 100% susceptível. Os resultados em tela são apresentados nas **tabelas 4 e 5**. A maior efetividade do fluconazol foi verificada entre as CIM 0,125-1,0 $\mu\text{g/mL}$ (**tabela 8**).

4.3.2.3. PROTOCOLO CLSI/M44-A

Do total de isolados avaliados frente ao fluconazol, 108 (95,6%) foram identificados como susceptíveis (CIM $\leq 8\mu\text{g/mL}$), 2 (1,8%) como susceptíveis dependente de dose (CIM 16-32 $\mu\text{g/mL}$) e 3 (2,6%) como resistentes (CIM $\geq 64\mu\text{g/mL}$). As espécies classificadas como susceptíveis dependente de dose foram *C. albicans* (2,1%) e *C. tropicalis* (9,1%) e resistentes foram *C. krusei* (100%) e *R. glutinis* (100%). Todos os outros isolados fúngicos foram susceptíveis. As **tabelas 11 e 12** apresentam as variações e valores dos diâmetros das zonas de inibição e as faixas de CIM correspondentes, bem como os percentuais de susceptibilidade.

4.3.3. PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AO ITRACONAZOL

4.3.3.1. PROTOCOLO CLSI/M27-A2

Dentre os 113 isolados fúngicos, 109 (96,5%) foram considerados susceptíveis (CIM $\leq 0,125\mu\text{g/mL}$) e 4 (3,4%) susceptíveis dependente de dose (CIM 0,25-0,5 $\mu\text{g/mL}$). Não foram detectadas cepas resistentes ao itraconazol ($\geq 1\mu\text{g/mL}$). Na categoria susceptível dependente de dose, foram identificadas *C. glabrata* (50%), *C. guilliermondii* (8,3%), *C. lambica* (100%) e *Trichosporon* sp. (100%). Estes resultados são exibidos nas **tabelas 4 e 6**. O itraconazol foi mais efetivo entre as CIM 0,015-0,125 $\mu\text{g/mL}$ (**tabela 9**).

4.3.3.2. PROTOCOLO EUCAST/E.Dis.7.1

Entre os fungos isolados, 107 (94,5%) foram classificados como susceptíveis e 06 (5,4%) como susceptíveis dependente de dose. Neste último grupo, foram encontrados *C. albicans* (2,1%), *C. glabrata* (50%), *C. guilliermondii* (8,3%), *C. krusei* (100%), *C. tropicalis* (9,1%) e *Trichosporon* sp. (100%). Não foram também detectadas cepas resistentes ao itraconazol ($\geq 1\mu\text{g/mL}$) por esta metodologia. As **tabelas 4 e 6** ilustram os resultados apresentados. As CIM entre 0,015-0,125 $\mu\text{g/mL}$ foram aquelas onde o itraconazol apresentou maior efetividade (**tabela 9**).

TABELA 6. INTERVALO DE CIM, VALORES DE CIM₅₀ E CIM₉₀ E PERCENTUAL DE SUSCEPTIBILIDADE PARA ITRACONAZOL ESTRATIFICADOS POR ESPÉCIES FÚNGICAS SEGUNDO A METODOLOGIA DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO DO CLSI E EUCAST.

Espécies Fúngicas (No.)	Metodologia	Itraconazol					
		Intervalo/Valor (µg/mL)	CIM 50 (µg/mL)	CIM 90 (µg/mL)	Susceptibilidade		
					%S	%SDD	%R
<i>C. albicans</i> (47)	CLSI	0,015-0,12	0,06	0,12	100	0	0
	EUCAST*	0,015-0,25	0,03	0,12	97,9	2,1	0
<i>C. parapsilosis</i> (33)	CLSI	0,015-0,12	0,03	0,12	100	0	0
	EUCAST*	0,015-0,12	0,03	0,12	100	0	0
<i>C. guilliermondii</i> (12)	CLSI	0,03-0,25	0,06	0,25	91,7	8,3	0
	EUCAST*	0,015-0,25	0,06	0,12	91,7	8,3	0
<i>C. tropicalis</i> (11)	CLSI	0,015-0,12	0,12	0,12	100	0	0
	EUCAST*	0,03-0,25	0,06	0,12	90,9	9,1	0
<i>C. glabrata</i> (2)	CLSI	0,12-0,25	0,12	0,25	50	50	0
	EUCAST*	0,12-0,5	0,12	0,5	50	50	0
<i>C. humicolus</i> (2)	CLSI	0,12	-	-	100	0	0
	EUCAST*	0,03-0,06	0,03	0,06	100	0	0
<i>R. glutinis</i> (2)	CLSI	0,06-0,12	0,06	0,12	100	0	0
	EUCAST*	0,015-0,12	0,015	0,12	100	0	0
<i>C. famata</i> (1)	CLSI	0,12	-	-	100	0	0
	EUCAST*	0,06	-	-	100	0	0
<i>C. krusei</i> (1)	CLSI	0,03	-	-	100	0	0
	EUCAST*	0,25	-	-	0	100	0

TABELA 6. CONTINUAÇÃO.

Espécies Fúngicas (No.)	Metodologia	Itraconazol					
		Intervalo/Valor ($\mu\text{g/mL}$)	CIM 50 ($\mu\text{g/mL}$)	CIM 90 ($\mu\text{g/mL}$)	Susceptibilidade		
					%S	%SDD	%R
<i>C. lambica</i> (1)	CLSI	0,25	-	-	0	100	0
	EUCAST*	0,12	-	-	100	0	0
<i>Trichosporon</i> sp. (1)	CLSI	0,25	-	-	0	100	0
	EUCAST*	0,25	-	-	0	100	0

(*) ponto de corte segundo CLSI; S, susceptibilidade; SDD, susceptibilidade dependente de dose; R, resistência.

TABELA 7. INTERVALO DE CIM, VALORES DE CIM₅₀ E CIM₉₀ E PERCENTUAL DE SUSCEPTIBILIDADE PARA ANFOTERICINA B ESTRATIFICADOS POR ESPÉCIES FÚNGICAS SEGUNDO A METODOLOGIA DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO DO CLSI E EUCAST.

Espécies Fúngicas (No.)	Metodologia	Anfotericina B					
		Intervalo/Valor (µg/mL)	CIM 50 (µg/mL)	CIM 90 (µg/mL)	Susceptibilidade		
					%S	%SDD	%R
<i>C. albicans</i> (47)	CLSI	0,06-0,5	0,5	0,5	100	0	0
	EUCAST	0,06-0,5	0,25	0,5	100	0	0
<i>C. parapsilosis</i> (33)	CLSI	0,06-1	0,25	0,5	100	0	0
	EUCAST	0,06-1	0,5	0,5	100	0	0
<i>C. guilliermondii</i> (12)	CLSI	0,06-1	0,25	0,5	100	0	0
	EUCAST	0,06-0,5	0,5	0,5	100	0	0
<i>C. tropicalis</i> (11)	CLSI	0,25-1	0,25	0,5	100	0	0
	EUCAST	0,25-1	0,25	1	100	0	0
<i>C. glabrata</i> (2)	CLSI	0,12	-	-	100	0	0
	EUCAST	0,12-0,25	0,12	0,25	100	0	0
<i>C. humicolus</i> (2)	CLSI	0,12-0,5	0,25	0,5	100	0	0
	EUCAST	0,06-0,25	0,06	0,25	100	0	0
<i>R. glutinis</i> (2)	CLSI	0,25	-	-	100	0	0
	EUCAST	0,25-0,5	0,25	0,5	100	0	0
<i>C. famata</i> (1)	CLSI	0,5	-	-	100	0	0
	EUCAST	0,5	-	-	100	0	0

TABELA 7. CONTINUAÇÃO.

Espécies Fúngicas (No.)	Metodologia	Anfotericina B					
		Intervalo/Valor (µg/mL)	CIM 50 (µg/mL)	CIM 90 (µg/mL)	Susceptibilidade		
					%S	%SDD	%R
<i>C. krusei</i> (1)	CLSI	0,25	-	-	100	0	0
	EUCAST	0,5	-	-	100	0	0
<i>C. lambica</i> (1)	CLSI	0,5	-	-	100	0	0
	EUCAST	1	-	-	100	0	0
<i>Trichosporon</i> sp. (1)	CLSI	0,5	-	-	100	0	0
	EUCAST	0,5	-	-	100	0	0

S, susceptibilidade; SDD, susceptibilidade dependente de dose; R, resistência.

4.3.3.3. PROTOCOLO CECON

Do número total de isolados testados frente ao itraconazol, 105 (92,9%) foram identificadas como susceptíveis e 08 (7,1%) como susceptíveis dependente de dose. As espécies classificadas como susceptíveis dependente de dose foram *C. albicans* (4,3%), *C. glabrata* (50%), *C. guilliermondii* (8,3%), *C. lambica* (100%), *C. tropicalis* (9,1%) e *R. glutinis* (100%). Todos os demais isolados foram categorizados como susceptíveis. As variações e valores dos diâmetros das zonas de inibição e os percentuais de susceptibilidade são mostrados nas **tabelas 11 e 12**.

4.3.4. PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANFOTERICINA B

4.3.4.1. PROTOCOLO CLSI/M27-A2

Todos os 113 isolados fúngicos foram considerados susceptíveis, apesar de não haver ainda pontos de corte estabelecidos para este antifúngico. CIM mais elevadas (1,0µg/mL) foram observadas em *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. *C. albicans* foi a espécie com o maior valor de CM₅₀ (0,5µg/mL). Com relação a CM₉₀, nenhum isolado apresentou valores >0,5µg/mL. Estes resultados são exibidos nas **tabelas 4 e 7**. Segundo a **tabela 10**, a anfotericina B foi mais efetiva nas CIM entre 0,25-0,5µg/mL.

4.3.4.2. PROTOCOLO EUCAST/E.Dis.7.1

A totalidade dos isolados avaliados foi, igualmente, categorizada como susceptível. Em EUCAST, no entanto, também não há pontos de corte estabelecidos para anfotericina B. *C. lambica*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foram as espécies cuja CIM alcançou sua concentração mais alta (1,0µg/mL). CM₅₀ mais elevadas (0,5µg/mL) foram observadas em *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis*. *C. tropicalis* foi a única espécie que exibiu CM₉₀ = 1,0µg/mL. As **tabelas 4 e 7** ilustram os resultados encontrados. A maior efetividade deste antifúngico foi também observada nas CIM entre 0,25-0,5µg/mL (**tabela 10**).

4.3.4.3. PROTOCOLO CECON

Todos os isolados fúngicos submetidos a testagem foram classificados como susceptíveis, apresentando faixas de CIM $<1\mu\text{g/mL}$. *C. albicans* e *C. lambica* foram as espécies com os menores diâmetros de zona de inibição ($\leq 18\text{mm}$). As **tabelas 11 e 12** exibem as variações dos diâmetros das zonas de inibição e as faixas de CIM correspondentes.

TABELA 8. ATIVIDADE *IN VITRO* DE FLUCONAZOL FRENTE AOS ISOLADOS FÚNGICOS SEGUNDO A METODOLOGIA DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO DO CLSI E EUCAST.

Espécies Fúngicas (No.)	Metodologia	Concentrações em µg/mL (No. acumulado de isolados inibidos)									
		64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
<i>C. albicans</i> (47)	CLSI				02			09	13	19	04
	EUCAST			01	01		01	05	12	19	08
<i>C. parapsilosis</i> (33)	CLSI							06	16	09	02
	EUCAST						01	03	18	09	02
<i>C. guilliermondii</i> (12)	CLSI						01	06	02	03	
	EUCAST					01	02	03	05	01	
<i>C. tropicalis</i> (11)	CLSI					01		03	04	03	
	EUCAST					01		01	05	03	01
<i>C. glabrata</i> (2)	CLSI				02						
	EUCAST			02							
<i>C. humicolus</i> (2)	CLSI							01	01		
	EUCAST							01	01		
<i>R. glutinis</i> (2)	CLSI			01						01	
	EUCAST			01					01		
<i>C. famata</i> (1)	CLSI							01			
	EUCAST							01			
<i>C. krusei</i> (1)	CLSI	01									
	EUCAST	01									

TABELA 8. CONTINUAÇÃO.

Espécies Fúngicas (No.)	Metodologia	Concentrações em µg/mL (No. acumulado de isolados inibidos)									
		64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
<i>C. lambica</i> (1)	CLSI			01							
	EUCAST			01							
<i>Trichosporon</i> sp. (1)	CLSI							01			
	EUCAST						01				
Total (113)	CLSI	01		02	04	01	01	27	36	35	06
	EUCAST	01		05	01	02	05	14	42	32	11

TABELA 9. ATIVIDADE *IN VITRO* DE ITRACONAZOL FRENTE AOS ISOLADOS FÚNGICOS SEGUNDO A METODOLOGIA DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO DO CLSI E EUCAST.

Espécies Fúngicas (No.)	Metodologia	Concentrações em µg/mL (No. acumulado de isolados inibidos)									
		8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015
<i>C. albicans</i> (47)	CLSI							14	11	9	13
	EUCAST						01	08	03	21	14
<i>C. parapsilosis</i> (33)	CLSI							05	11	08	09
	EUCAST							05	07	14	07
<i>C. guilliermondii</i> (12)	CLSI						01	04	05	02	
	EUCAST						01	04	04	02	01
<i>C. tropicalis</i> (11)	CLSI							06	02	02	01
	EUCAST						01	01	07	02	
<i>C. glabrata</i> (2)	CLSI							01	01		
	EUCAST					01		01			
<i>C. humicolus</i> (2)	CLSI							02			
	EUCAST									02	
<i>R. glutinis</i> (2)	CLSI							01	01		
	EUCAST							01			01
<i>C. famata</i> (1)	CLSI							01			
	EUCAST								01		
<i>C. krusei</i> (1)	CLSI									01	
	EUCAST						01				

TABELA 9. CONTINUAÇÃO.

Espécies Fúngicas (No.)	Metodologia	Concentrações em µg/mL (No. acumulado de isolados inibidos)										
		8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015	
<i>C. lambica</i> (1)	CLSI						01					
	EUCAST							01				
<i>Trichosporon</i> sp. (1)	CLSI						01					
	EUCAST						01					
Total (113)	CLSI						04	34	30	22	23	
	EUCAST					01	05	21	22	41	23	

TABELA 10. ATIVIDADE *IN VITRO* DE ANFOTERICINA B FRENTE AOS ISOLADOS FÚNGICOS SEGUNDO A METODOLOGIA DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO DO CLSI E EUCAST.

Espécies Fúngicas (No.)	Metodologia	Concentrações em µg/mL (No. acumulado de isolados inibidos)									
		8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015
<i>C. albicans</i> (47)	CLSI					25	18	03	01		
	EUCAST					18	22	05	02		
<i>C. parapsilosis</i> (33)	CLSI				02	14	15	01	01		
	EUCAST				02	15	14	01	01		
<i>C. guilliermondii</i> (12)	CLSI				01	05	04	01	01		
	EUCAST					08	03		01		
<i>C. tropicalis</i> (11)	CLSI				01	04	06				
	EUCAST				02	03	06				
<i>C. glabrata</i> (2)	CLSI							02			
	EUCAST						01	01			
<i>C. humicolus</i> (2)	CLSI					01		01			
	EUCAST						01		01		
<i>R. glutinis</i> (2)	CLSI						02				
	EUCAST					01	01				
<i>C. famata</i> (1)	CLSI						01				
	EUCAST					01					

TABELA 10. CONTINUAÇÃO.

Espécies Fúngicas (No.)	Metodologia	Concentrações em µg/mL (No. acumulado de isolados inibidos)										
		8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015	
<i>C. krusei</i> (1)	CLSI						01					
	EUCAST					01						
<i>C. lambica</i> (1)	CLSI					01						
	EUCAST				01							
<i>Trichosporon</i> sp. (1)	CLSI					01						
	EUCAST					01						
Total (113)	CLSI				04	51	47	08	03			
	EUCAST				05	48	48	07	05			

TABELA 11. VARIAÇÃO DO DIÂMETRO DA ZONA DE INIBIÇÃO, FAIXA DE CIM E PERCENTUAL DE SUSCEPTIBILIDADE A FLUCONAZOL, ITRACONAZOL E ANFOTERICINA B PARA OS 113 ISOLADOS CLÍNICOS TESTADOS SEGUNDO A METODOLOGIA DE DIFUSÃO EM ÁGAR DO CLSI E CECON.

Antifúngicos	Metodologia	Variação (mm)	Faixa de CIM (µg/mL)	Susceptibilidade (No./%)		
				S	SDD	R
Fluconazol	CLSI	01-50	≥ 64 - ≤ 8	108/95,6	02/1,8	03/2,6
Itraconazol	CECON	14-41	-	105/92,9	08/7,1	00/00
Anfotericina B	CECON	16-32	<1	113/100	00/00	00/00

S, susceptibilidade; SDD, susceptibilidade dependente de dose; R, resistência.

TABELA 12. DIÂMETRO DA ZONA DE INIBIÇÃO, FAIXA DE CIM E SUSCEPTIBILIDADE A FLUCONAZOL, ITRACONAZOL E ANFOTERICINA B ESTRATIFICADOS POR ISOLADOS FÚNGICOS.

Espécies Fúngicas (No.)	Antifúngicos														
	Fluconazol CLSI/M44-A					Itraconazol CECON					Anfotericina B CECON				
	Zona Inibição Intervalo/Valor (mm)	Faixa de CIM (µg/mL)	Susceptibilidade (%)			Zona Inibição Intervalo/Valor (mm)	Faixa de CIM (µg/mL)	Susceptibilidade (%)			Zona Inibição Intervalo/Valor (mm)	Faixa de CIM (µg/mL)	Susceptibilidade (%)		
			S	SDD	R			S	SDD	R			S	SDD	R
<i>C. albicans</i> (47)	16-50	16-32 / ≤ 8	97,9	2,1	0	18-35	-	95,7	4,3	0	16-32	<1	100	0	0
<i>C. parapsilosis</i> (33)	22-50	≤ 8	100	0	0	21-41	-	100	0	0	21-30	<1	100	0	0
<i>C. guilliermondii</i> (12)	20-38	≤ 8	100	0	0	18-28	-	91,7	8,3	0	21-29	<1	100	0	0
<i>C. tropicalis</i> (11)	15-38	16-32 / ≤ 8	90,9	9,1	0	16-29	-	90,9	9,1	0	24-27	<1	100	0	0
<i>C. glabrata</i> (02)	20-35	≤ 8	100	0	0	19-34	-	50	50	0	23-25	<1	100	0	0
<i>C. humicolus</i> (02)	20-32	≤ 8	100	0	0	25	-	100	0	0	25-30	<1	100	0	0
<i>R. glutinis</i> (02)	1	≥ 64	0	0	100	14-16	-	0	100	0	21-23	<1	100	0	0
<i>C. famata</i> (01)	32	≤ 8	100	0	0	27	-	100	0	0	29	<1	100	0	0
<i>C. krusei</i> (01)	8	≥ 64	0	0	100	24	-	100	0	0	26	<1	100	0	0
<i>C. lambica</i> (01)	24	≤ 8	100	0	0	16	-	0	100	0	18	<1	100	0	0
<i>Trichosporon</i> sp. (01)	25	≤ 8	100	0	0	25	-	100	0	0	25	<1	100	0	0

S, susceptibilidade; SDD, susceptibilidade dependente de dose; R, resistência.

4.3.5. COMPARAÇÃO DE RESULTADOS

A concordância entre as metodologias descritas nos documentos M27-A2 (CLSI) e E.Dis.7.1 (EUCAST) para o fluconazol, itraconazol e anfotericina B é mostrada, respectivamente, nas **tabelas 13, 14 e 15**. A concordância entre estas metodologias foi definida como a discrepância nos resultados de CIM não maior do que duas diluições.

Considerando-se a concordância exata entre as duas metodologias, os melhores resultados foram observados, separadamente por espécie, em *C. parapsilosis* frente ao fluconazol (42,4%) (**tabela 13**) e itraconazol (45,4%) (**tabela 14**) e em *C. tropicalis* frente a anfotericina B (54,5%) (**tabela 15**).

Levando-se em conta a diferença de até 1 diluição, os melhores percentuais de concordância foram encontrados em *C. tropicalis* frente ao fluconazol (100%) (**tabela 13**), itraconazol (100%) (**tabela 14**) e anfotericina B (100%) (**tabela 15**), bem como em *C. guilliermondii* frente a anfotericina B (100%) (**tabela 15**).

Tomando-se a diferença de até duas diluições, as melhores taxas de concordância foram verificadas em *C. albicans* (100%) e em *C. parapsilosis* (100%) frente ao fluconazol (**tabela 13**), em *C. guilliermondii* frente ao itraconazol (100%) (**tabela 14**) e em *C. albicans* frente a anfotericina B (100%) (**tabela 15**).

Considrando o critério de até 2 diluições de diferença, a concordância geral para fluconazol foi de 99,1% (**tabela 13**), incluindo todos os isolados. Para itraconazol, esta concordância foi de 96,5% (**tabela 14**). A concordância geral para a anfotericina B foi, como observado para fluconazol, de 99,1% (**tabela 15**).

Na **tabela 16**, está detalhada a distribuição da diferença em diluições entre as metodologias microdiluição para os 3 antifúngicos testados, sendo possível visualizar o número exato e a taxa de isolamento para os quais os valores de CIM do CLSI e EUCAST foram iguais, mais elevados ou menos elevados para uma ou outra metodologia.

A análise comparativa entre os diâmetros das zonas de inibição obtidos por difusão em ágar segundo documento M44-A e CIM obtidas por microdiluição em caldo segundo documentos 27-A2 e E.Dis.7.1 para fluconazol é demonstrada na **tabela 17**. Para diâmetros ≥ 19 mm [S], a maioria das CIM ficou entre 0,25-1,0 μ g/mL [S] tanto em CLSI (85,5%) quanto em EUCAST (74,0%). Em diâmetros de 15-18mm [SDD], 1,8% dos isolados estudados por CLSI apresentaram CIM entre 4,0-8,0 μ g/mL [S]. Em EUCAST, CIM de 16 μ g/mL [SDD] foi observada em 1 (0,9%) isolado cujo diâmetro de

inibição ficou entre 15-18mm [SDD]. No entanto, 2,6% dos isolados apresentaram CIM $\leq 8,0\mu\text{g/mL}$ [S]. Para diâmetros entre 0-14mm [R], CIM mais elevadas, entre 16-64 $\mu\text{g/mL}$ [SDD-R], foram observadas em 2 (1,8%) isolados avaliados por M27-A2, bem como em 2 (1,8%) isolados analisados por E.Dis.7.1. Neste mesmo grupo, CIM de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ [S] foi também verificada em 0,9% dos isolados. A concordância geral entre M44-A e M27-A2 foi 95,6% e entre M44-A e E.Dis.7.1 foi 94,7%. A maior discrepância (*erro major*) entre os resultados foi observada em *R. glutinis* (LMC-276T) que se mostrou resistente [R] na difusão em ágar e susceptível [S] em ambas as metodologias de microdiluição em caldo. Os outros isolados apresentaram discrepâncias menores (*erro minor*), isto é, foram resistentes [R] e susceptíveis dependente de dose [SDD] ou susceptíveis [S] e susceptíveis dependente de dose [SDD] ou ainda susceptíveis dependente de dose [SDD] e susceptíveis [S], respectivamente, na difusão em ágar e na microdiluição em caldo. No entanto, se forem considerados os pontos de corte do EUCAST (**anexo 4**), surge uma discrepância *very major* em *C. albicans* (LMC-361T) quando o resultado da difusão em ágar é confrontado com o documento E.Dis.7.1 (**anexo 2**). Esta discrepância representa um achado de susceptibilidade [S] na difusão em ágar e um achado de resistência [R] na microdiluição em caldo. Além disto, surge também uma discrepância *minor* em *C. albicans* (LMC-362T) por este isolado ser susceptível dependente de dose [SDD] na difusão em ágar e resistente [R] na microdiluição (**anexo 2**).

A comparação entre a metodologia de difusão em ágar descrita no *kit* comercial CECON e CIM obtidas por microdiluição em caldo segundo os protocolos do CLSI e EUCAST para itraconazol é apresentada na **tabela 18**. Em diâmetros $\geq 20\text{m}$ [S], a maioria dos isolados apresentou CIM entre 0,015-0,125 $\mu\text{g/mL}$ [S] para CLSI (90,3%) e EUCAST (88,5%). Para diâmetros entre 12-19mm [SDD], 4 (1,8%) isolados apresentaram CIM entre 0,25-0,5 $\mu\text{g/mL}$ [SDD]. No entanto, o maior percentual dos isolados (6,2%) apresentou CIM $\leq 0,125\mu\text{g/mL}$ [S] nos dois protocolos de microdiluição. A concordância M44-A e M27-A2 foi 92% e entre M44-A e E.Dis.7.1 foi 90,3%. Todos os isolados que apresentaram discrepâncias entre os resultados, exibiram uma discrepância do tipo *minor*, pois foram susceptíveis [S] e susceptíveis dependente de dose [SDD] ou susceptíveis dependente de dose [SDD] e susceptíveis [S] na difusão em ágar e na microdiluição em caldo, respectivamente.

A **tabela 19** mostra a comparação entre a metodologia de difusão em ágar do *kit* CECON e CIM obtidas pela metodologia de microdiluição em caldo do CLSI e

EUCAST para anfotericina B. Considerando os diâmetros obtidos (>10mm), todas as CIM foram $\leq 1 \mu\text{g/mL}$. A concordância geral foi 100%.

A proximidade das CIM geradas por cada metodologia foi indicada pelo cálculo do coeficiente de correlação intraclasse (CCI). O CCI avalia a correlação entre os resultados de CIM, oferecendo uma mensuração com significância estatística, pois considera o número de casos e o valor absoluto das CIM. O CCI é expresso com valor máximo de 1 e mínimo de -1 em intervalos de 95% de confiança (IC). Quando o valor encontrado for 1 uma correlação perfeita é estabelecida e se este for -1 existe uma completa ausência de correlação. No presente estudo, todavia, o sinal (-) observado nas correlações entre as metodologias de difusão em ágar e microdiluição em caldo não representam necessariamente ausência de correlação, mas sim uma correlação inversa. Isto é, quanto menor o halo de inibição maior a resistência e quanto menor a concentração maior a susceptibilidade. O CCI por grupo de antifúngicos e metodologia de susceptibilidade é ilustrado na **tabela 20**. Relativamente ao fluconazol, o CCI entre M44-A e M27-A2 foi -0,88, entre M44-A e E.DIS.7.1 foi (-)0,89 e entre M27-A2 e E.DIS.7.1 foi 0,97. Para itraconazol, o CCI entre M44-A e M27-A2 e entre M44-A e E.DIS.7.1 foi (-)0,92 e entre M27-A2 e E.DIS.7.1 foi 0,89. Para anfotericina B, o CCI entre M44-A e M27-A2 foi (-)0,97, entre M44-A e E.DIS.7.1 foi (-)0,97 e entre M44-A e E.DIS.7.1 foi (-)0,94.

A **tabela 21** apresenta os valores de CCI para *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. tropicalis* em relação aos três antifúngicos testados e as metodologias de difusão em ágar e microdiluição em caldo empregadas. Para todas as leveduras submetidas a esta análise, o valor de CCI entre M44-A e M27-A2 e entre M44-A e E.DIS.7.1 foi >(-)0,93 para fluconazol e entre CECON e M27-A2 e entre CECON e E.Dis.7.1 foi >(-)0,94 para itraconazol e >(-)0,96 para anfotericina B. O CCI entre M27-A2 e E.DIS.7.1 foi >0,96 para fluconazol, >0,82 para itraconazol e >0,88 para anfotericina B.

TABELA 13. ANÁLISE DESCRITIVA DA COMPARAÇÃO DOS VALORES DE CIM PARA FLUCONAZOL OBTIDOS PELAS METODOLOGIAS DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO DO CLSI E EUCAST.

Espécies Fúngicas (No.)	Concordância entre CLSI e EUCAST			
	Exata NO.(%)	Diferença 1 diluição NO.(%)	Diferença 2 diluições NO.(%)	Diferença >2 diluições NO.(%)
<i>C. albicans</i> (47)	15(31,9)	24(51,1) ^a	08(17,0)	0(0,00)
		39(83,0) ^b	47(100)	0(0,00)
<i>C. parapsilosis</i> (33)	14(42,4)	17(51,5)	2(6,1)	0(0,00)
		31(93,9)	33(100)	0(0,00)
<i>C. guilliermondii</i> (12)	02(16,7)	06(50,0)	03(25,0)	01(8,3)
		08(66,7)	11(91,7)	12(100)
<i>C. tropicalis</i> (11)	03(27,3)	08(72,7)	0(0,00)	0(0,00)
		11(100)	0(0,00)	0(0,00)
<i>Candida</i> spp. (5)*	3(60,0)	02(40,0)	0(0,00)	0(0,00)
		05(100)	0(0,00)	0(0,00)
Outras Espécies (5)**	02(40,0)	03(60,0)	0(0,00)	0(0,00)
		05(100)	0(0,00)	0(0,00)
Total (113)	39(34,5)	60(53,1)	13(11,5)	01(0,9)
		99(87,6)	112(99,1)	113(100)

(*) *C. glabrata*, *C. famata*, *C. krusei*, *C. lambica*; (**) *C. humicolus*, *R. glutinis*, *Trichosporon* sp.; (a) frequência isolada; (b) frequência acumulada.

TABELA 14. ANÁLISE DESCRITIVA DA COMPARAÇÃO DOS VALORES DE CIM PARA ITRACONAZOL OBTIDOS PELAS METODOLOGIAS DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO DO CLSI E EUCAST.

Concordância entre CLSI e EUCAST				
Espécies Fúngicas (No.)	Exata NO.(%)	Diferença 1 diluição NO.(%)	Diferença 2 diluições NO.(%)	Diferença >2 diluições NO.(%)
<i>C. albicans</i> (47)	18(38,3)	15(31,9) ^a	13(27,7)	1(2,1)
		33(70,2) ^b	46(97,9)	47(100)
<i>C. parapsilosis</i> (33)	15(45,4)	10(30,3)	06(18,2)	02(6,1)
		25(75,7)	31(93,9)	33(100)
<i>C. guilliermondii</i> (12)	05(41,7)	02(16,6)	05(41,7)	0(0,00)
		07(58,3)	12(100)	0(0,00)
<i>C. tropicalis</i> (11)	04(36,4)	07(63,6)	0(0,00)	0(0,00)
		11(100)	0(0,00)	0(0,00)
<i>Candida</i> spp. (5)*	01(20,0)	03(60,0)	0(0,00)	01(20,0)
		04(80,0)	0(0,00)	05(100)
Outras Espécies (5)**	02(40,0)	01(20,0)	02(40,0)	0(0,00)
		03(60,0)	05(100)	0(0,00)
Total (113)	45(39,9)	38(33,6) 83(73,4)	26(23,0) 109(96,5)	04(3,5) 113(100)

(*) *C. glabrata*, *C. famata*, *C. krusei*, *C. lambica*; (**) *C. humicolus*, *R. glutinis*, *Trichosporon* sp.; (a) frequência isolada; (b) frequência acumulada.

TABELA 15. ANÁLISE DESCRITIVA DA COMPARAÇÃO DOS VALORES DE CIM PARA ANFOTERICINA B OBTIDOS PELAS METODOLOGIAS DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO DO CLSI E EUCAST.

Espécies Fúngicas (No.)	Concordância entre CLSI e EUCAST			
	Exata NO.(%)	Diferença 1 diluição NO.(%)	Diferença 2 diluições NO.(%)	Diferença >2 diluições NO.(%)
<i>C. albicans</i> (47)	22(46,8)	23(48,9) ^a	02(4,3)	0(0,00)
		45(95,7) ^b	47(100)	0(0,00)
<i>C. parapsilosis</i> (33)	07(21,2)	24(72,8)	01(3,0)	01(3,0)
		31(93,3)	32(97,9)	33(100)
<i>C. guilliermondii</i> (12)	05(41,7)	07(58,3)	0(0,00)	0(0,00)
		12(100)	0(0,00)	0(0,00)
<i>C. tropicalis</i> (11)	06(54,5)	05(45,5)	0(0,00)	0(0,00)
		11(100)	0(0,00)	0(0,00)
<i>Candida</i> spp. (5)*	02(40,0)	03(60,0)	0(0,00)	0(0,00)
		05(100)	0(0,00)	0(0,00)
Outras Espécies (5)**	02(40,0)	02(40,0)	01(20,0)	0(0,00)
		04(80,0)	05(100)	0(0,00)
Total (113)	44(38,9)	64(56,7) 108(95,5)	04(3,5) 112(99,1)	01(0,9) 113(100)

(*) *C. glabrata*, *C. famata*, *C. krusei*, *C. lambica*; (**) *C. humicolus*, *R. glutinis*, *Trichosporon* sp.; (a) frequência isolada; (b) frequência acumulada.

TABELA 16. DISTRIBUIÇÃO DA DIFERENÇA EM DILUIÇÕES ENTRE AS METODOLOGIAS DO CLSI E EUCAST PARA OS ANTIFÚNGICOS TESTADOS.

Metodologia	≠ CIM	Antifúngicos		
		Fluconazol No.(%)	Itraconazol No.(%)	Anfotericina B No.(%)
	>2		01(0,9%)	01(0,9%)
CLSI>EUCAST	2	09(8,0%)	23(20,4%)	03(2,7%)
	1	29(25,7%)	17(15,0%)	31(27,4%)
CLSI=EUCAST	0	39(34,5%)	45(39,8%)	44(38,9%)
	1	30(26,5%)	21(18,6%)	33(29,2%)
CLSI<EUCAST	2	06(5,3%)	04(3,5%)	01(0,9%)
	>2		02(1,8%)	
Total		133(100%)	133(100%)	133(100%)

≠ CIM, diferença em diluições dos resultados de CIM; CLSI, *Clinical and Laboratory Standards Institute*; EUCAST, *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing*.

TABELA 17. COMPARAÇÃO ENTRE O DIÂMETRO DA ZONA DE INIBIÇÃO OBTIDO POR DIFUSÃO EM ÁGAR (CLSI/M44-A) E CIM OBTIDA POR MICRODILUIÇÃO EM CALDO (CLSI e EUCAST) PARA FLUCONAZOL.

DIFUSÃO EM ÁGAR ZONA DE INIBIÇÃO (mm)	DILUIÇÃO EM CALDO	Número (%) de isolados para cada CIM (µg/mL)									
		64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
0-14	CLSI	01(0,9)		01(0,9)							01(0,9)
	EUCAST	01(0,9)		01(0,9)							01(0,9)
15-18	CLSI				01(0,9)	01(0,9)					
	EUCAST			01(0,9)		01(0,9)					
≥19	CLSI			01(0,9)	03(2,6)		01(0,9)	27(23,9)	36(31,8)	34(30,1)	06(5,3)
	EUCAST			03(2,6)	01(0,9)	01(0,9)	05(4,4)	14(12,4)	40(35,4)	33(29,2)	11(9,7)

CLSI, *Clinical and Laboratory Standards Institute*; EUCAST, *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing*.

TABELA 18. COMPARAÇÃO ENTRE O DIÂMETRO DA ZONA DE INIBIÇÃO OBTIDO POR DIFUSÃO EM ÁGAR (CECON) E CIM OBTIDA POR MICRODILUIÇÃO EM CALDO (CLSI e EUCAST) PARA ITRACONAZOL.

DIFUSÃO EM ÁGAR ZONA DE INIBIÇÃO (mm)	DILUIÇÃO EM CALDO	Número (%) de isolados para cada CIM (µg/mL)									
		8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015
0-11	CLSI										
	EUCAST										
12-19	CLSI						02 (1,8)	04(3,5)	01(0,9)		02(1,8)
	EUCAST					01(0,9)	01(0,9)	04(3,5)		02(1,8)	01(0,9)
≥20	CLSI						02(1,8)	30(26,5)	28(24,7)	22(19,5)	22(19,5)
	EUCAST						04(3,5)	17(15,0)	23(20,4)	38(33,6)	22(19,5)

CLSI, *Clinical and Laboratory Standards Institute*; EUCAST, *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing*.

TABELA 19. COMPARAÇÃO ENTRE O DIÂMETRO DA ZONA DE INIBIÇÃO OBTIDO POR DIFUSÃO EM ÁGAR (CECON) E CIM OBTIDA POR MICRODILUIÇÃO EM CALDO (CLSI e EUCAST) PARA ANFOTERICINA B.

DIFUSÃO EM ÁGAR ZONA DE INIBIÇÃO (mm)	DILUIÇÃO EM CALDO	Número (%) de isolados para cada CIM (µg/mL)									
		8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015
>10	CLSI				04(3,5)	51(45,1)	47(41,6)	08(7,1)	03(2,7)		
	EUCAST				05(4,4)	48(42,5)	48(42,5)	07(6,2)	05(4,4)		
≤10	CLSI										
	EUCAST										

CLSI, *Clinical and Laboratory Standards Institute*; EUCAST, *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing*.

TABELA 20. COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO INTRACLASSE (CCI) POR GRUPO DE ANTIFÚNGICO.

Antifúngicos	Metodologia		CCI	Intervalo de Confiança (95%)	
				Limite Inferior	Limite Superior
Fluconazol	CLSI (M44-A)	CLSI (M27-A2)	-0,889	-0,922	-0,843
	CLSI (M44-A)	EUCAST (E.DIS-7.1)	-0,890	-0,923	-0,845
	CLSI (M27-A2)	EUCAST (E.DIS-7.1)	0,978	0,968	0,985
Itraconazol	CECON	CLSI (M27-A2)	-0,924	-0,947	-0,892
	CECON	EUCAST (E.DIS-7.1)	-0,925	-0,947	-0,892
	CLSI (M27-A2)	EUCAST (E.DIS-7.1)	0,893	0,926	0,848
Anfotericina B	CECON	CLSI (M27-A2)	-0,973	-0,982	-0,962
	CECON	EUCAST (E.DIS-7.1)	-0,974	-0,982	-0,962
	CLSI (M27-A2)	EUCAST (E.DIS-7.1)	0,948	0,915	0,903

TABELA 21. COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO INTRACLASSE (CCI) POR ESPÉCIE FÚNGICA.

Espécies Fúngicas (No.)	Antifúngicos	Metodologia	CCI	Intervalo de Confiança (95%)		
				Limite Inferior	Limite Superior	
<i>C. albicans</i> (47)	Fluconazol	CLSI (M44-A)	CLSI (M27-A2)	-0,942	-0,967	-0,898
		CLSI (M44-A)	EUCAST (E.DIS-7.1)	-0,945	-0,969	-0,904
		CLSI (M27-A2)	EUCAST (E.DIS-7.1)	0,993	0,986	0,997
	Itraconazol	CECON	CLSI (M27-A2)	-0,953	-0,973	-0,917
		CECON	EUCAST (E.DIS-7.1)	-0,953	-0,973	-0,917
		CLSI (M27-A2)	EUCAST (E.DIS-7.1)	0,827	0,719	0,860
	Anfotericina B	CECON	CLSI (M27-A2)	-0,966	-0,981	-0,940
		CECON	EUCAST (E.DIS-7.1)	-0,967	-0,981	-0,941
		CLSI (M27-A2)	EUCAST (E.DIS-7.1)	0,942	0,833	0,976
<i>C. parapsilosis</i> (33)	Fluconazol	CLSI (M44-A)	CLSI (M27-A2)	-0,939	-0,969	-0,880
		CLSI (M44-A)	EUCAST (E.DIS-7.1)	-0,940	-0,970	-0,883
		CLSI (M27-A2)	EUCAST (E.DIS-7.1)	0,972	0,938	0,996
	Itraconazol	CECON	CLSI (M27-A2)	-0,959	-0,979	-0,919
		CECON	EUCAST (E.DIS-7.1)	-0,959	-0,979	-0,919
		CLSI (M27-A2)	EUCAST (E.DIS-7.1)	0,924	0,813	0,960
	Anfotericina B	CECON	CLSI (M27-A2)	-0,983	-0,991	-0,966
		CECON	EUCAST (E.DIS-7.1)	-0,983	-0,992	-0,966
		CLSI (M27-A2)	EUCAST (E.DIS-7.1)	0,887	0,775	0,924

TABELA 21. CONTINUAÇÃO.

Espécies Fúngicas (No.)	Antifúngicos	Metodologia	CCI	Intervalo de Confiança (95%)		
				Limite Inferior	Limite Superior	
<i>C. guilliermondii</i> (12)	Fluconazol	CLSI (M44-A)	CLSI (M27-A2)	-0,941	-0,982	-0,812
		CLSI (M44-A)	EUCAST (E.DIS-7.1)	-0,951	-0,985	-0,842
		CLSI (M27-A2)	EUCAST (E.DIS-7.1)	0,969	0,957	0,985
	Itraconazol	CECON	CLSI (M27-A2)	-0,973	-0,992	-0,910
		CECON	EUCAST (E.DIS-7.1)	-0,974	-0,992	-0,912
		CLSI (M27-A2)	EUCAST (E.DIS-7.1)	0,915	0,799	0,952
	Anfotericina B	CECON	CLSI (M27-A2)	-0,977	-0,993	-0,923
		CECON	EUCAST (E.DIS-7.1)	-0,977	-0,993	-0,922
		CLSI (M27-A2)	EUCAST (E.DIS-7.1)	0,935	0,827	0,968
<i>C. tropicalis</i> (11)	Fluconazol	CLSI (M44-A)	CLSI (M27-A2)	-0,934	-0,981	-0,777
		CLSI (M44-A)	EUCAST (E.DIS-7.1)	-0,936	-0,981	-0,783
		CLSI (M27-A2)	EUCAST (E.DIS-7.1)	0,988	0,969	0,994
	Itraconazol	CECON	CLSI (M27-A2)	-0,949	-0,985	-0,826
		CECON	EUCAST (E.DIS-7.1)	-0,950	-0,986	-0,829
		CLSI (M27-A2)	EUCAST (E.DIS-7.1)	0,877	0,771	0,912
	Anfotericina B	CECON	CLSI (M27-A2)	-0,995	-0,999	-0,982
		CECON	EUCAST (E.DIS-7.1)	-0,995	-0,999	-0,983
		CLSI (M27-A2)	EUCAST (E.DIS-7.1)	0,969	0,866	0,984

5. DISCUSSÃO

A problemática das infecções fúngicas hospitalares tem ocupado posição de destaque na saúde pública mundial (WORNOCK, 2006). Isto tem redundado em estudos multicêntricos para o entendimento de seus mecanismos de ocorrência e para o desenvolvimento de práticas de atuação que possam controlar e prevenir os resultados adversos da disseminação da doença fúngica adquirida durante a hospitalização (PFALLER & DIEKEMA, 2002; PFALLER et al., 2001, 2007). No Brasil, contudo, os dados sobre infecção fúngica hospitalar são escassos e pouco abrangentes. Além disto, esses dados não são consolidados pela maioria dos hospitais, dificultando ainda mais o conhecimento da dimensão do problema no país (COLOMBO & GUMARÃES, 2003).

Concretamente, no entanto, sabe-se que a maior parte das infecções fúngicas hospitalares no Brasil são representadas pelas candidíases invasivas, sendo as infecções da corrente sanguínea sua apresentação mais comum. Estudos de Colombo (2003) estimam que as candidemias ocorram numa taxa de 4,3% do total das infecções da corrente sanguínea. Em estudo prospectivo multicêntrico de candidemias documentadas em 11 hospitais terciários de 09 cidades brasileiras conduzido por Colombo et al. (2006), a incidência total de candidemias foi 2,49 casos por 1000 admissões (1,49 a 5,30 casos/1000 admissões) e 0,37 casos por 1000 pacientes-dia (0,20 a 0,52 casos/1000 pacientes-dia). Segundos os autores, estes valores são até 15 vezes mais elevados do que aqueles reportados em estudos norte-americanos e europeus. De acordo com os mesmos autores, a taxa de mortalidade bruta em 30 dias foi de 54%.

Diversos fatores de riscos têm sido identificados e associados à ocorrência de candidíases invasivas em pacientes admitidos em hospitais brasileiros. Estudos prospectivos multicêntricos envolvendo 06 hospitais em 03 cidades do sudeste do Brasil demonstraram que a antibioticoterapia prolongada, emprego de cateter venoso central, uso de bloqueadores H₂, corticoterapia e quimioterapia, nutrição parenteral total, neutropenia, cirurgia e colonização são preponderantes. Como processos de base, foram relatados idade (prematuridade e senilidade), neoplasias, *diabetes mellitus*, infecção bacteriana, doença gastrointestinal, doença neurológica, aids, desnutrição, insuficiência renal, traumatismo e cirrose (COLOMBO, 2000; NUCCI et al., 1998a). Mais recentemente, tempo de permanência em UTI, ventilação mecânica,

hemodiálise, doença cardíaca, doença pulmonar e transplantes de órgãos e medula óssea foram também reportados (COLOMBO et al., 2006).

Com relação à literatura internacional, estudos com diferentes centros médicos conduzidos nos Estados Unidos da América têm informado que as infecções da corrente sanguínea por *Candida* spp. representam 8% a 10% do total das septicemias (WISPLINGHOFF et al., 2004). Entretanto, Dimopoulos et al. (2007) reportaram percentuais de até 15%. Investigações levadas a termo em hospitais terciários de diferentes regiões dos Estados Unidos têm demonstrado que a incidência de candidemia varia entre 0,28 a 0,96 casos por 1000 admissões. Neste país, a taxa de mortalidade bruta tem sido estimada entre 50%-60% e a mortalidade atribuída em cerca de 38% (FRIDKIN et al., 1996). Os fatores de risco associados às candidíases invasivas são todos aqueles que determinam déficits no *status* imunológico dos hospedeiros (PFALLER & DIEKEMA, 2007), não diferindo, portanto, dos fatores relatados em estudos brasileiros. Contudo, múltiplas transfusões de sangue, cateter urinário, pancreatite, queimaduras (>50%), má-formação, escala APGAR (baixo *score*) e escala APACHE II (>20) têm sido, igualmente, identificados como fatores críticos (CHOW et al., 2008; PAPPAS, 2006; OSTROSKY-ZEICHNER & PAPPAS, 2006; PERLROTH et al., 2007).

Na Europa, um estudo multinacional que contou com a participação de 106 hospitais terciários da França, Alemanha, Áustria, Itália, Espanha, Suécia e Reino Unido e documentou 2089 casos de candidemia revelou a magnitude e a gravidade do problema neste continente (TORTORANO et al., 2004). A taxa de incidência de infecções da corrente sanguínea por espécies de *Candida* foi de 0,20 a 0,38 por 1000 admissões e de 0,31 a 0,44 por 10.000 pacientes-dia e a mortalidade bruta total em 30 dias foi estimada em 37,9%, sendo que em pacientes com câncer (tumores sólidos e hematológicos) foi de 47% e em pacientes sob cuidados intensivos de 42,4% (TORTORANO et al., 2006). Com relação aos fatores de risco, as candidemias foram predominantes em cateterismo (79,6%), antibioticoterapia prévia (74,5%), leucemias (48,0%), cirurgia geral (44,7%) e UTI (40,2%) (TORTORANO et al., 2004).

No presente estudo, conduzido na região do estado do Rio de Janeiro, apesar da limitada informação demográfica, pois os dados dos pacientes foram apurados a partir das fichas enviadas juntamente com as amostras clínicas pelos laboratórios de origem e, muito frequentemente, estas vinham incompletas, foi possível observar (**tabela 1**) que a incidência de infecção fúngica foi maior no sexo masculino (47%) do que no feminino (37%). No entanto, para 16% dos pacientes não foi possível a

determinação do sexo. De forma geral, nos estudos realizados no Brasil, a prevalência tem sido do sexo masculino, inclusive em pacientes pediátricos (VELASCO & BIGNI, 2008; PASQUALOTTO et al., 2005b). Relatos de autores internacionais também confirmam a presente casuística (BASSETTI et al., 2006; BOUGNOUX et al., 2008; COSTA DE OLIVEIRA et al., 2008; VIUDES et al., 2002). Apesar de certa preponderância entre homens, de acordo com Pfaller & Diekema (2007), não há diferenças clínicas consideráveis entre os sexos, levando a crer que fatores reprodutivos não sejam condicionantes importantes para o desenvolvimento de infecção em pacientes imunocomprometidos ou que outros fatores (iatrogênicos) sejam mais críticos (BOKTOUR et al., 2004).

Dos 100 pacientes avaliados no presente estudo, 71% tinham suas idades determinadas (**tabela 1**). Claramente, a maioria era de jovens com faixa etária entre 0-20 anos (33%). Pacientes adultos jovens e maduros, com idade entre 21 e 60 anos, compunham 20% dos indivíduos e pacientes idosos com mais de 61 anos, 17%. A análise da literatura nacional permite verificar que, quanto à idade, a maior parte dos pacientes se encontra numa faixa de 30-50 anos (BRITO et al., 2006; COLOMBO et al., 2007; NUCCI & COLOMBO, 2007; NUCCI et al. 1998a; AQUINO et al., 2005). Características populacionais regionais podem ter condicionado as faixas etárias encontradas (COLOMBO et al., 2008). Mesmo considerando outros fatores importantes como a doença de base e o comprometimento do sistema imunológico, a idade dos pacientes parece ter também um papel relevante no prognóstico das candidemias (NGUYEN et al., 1995). Na realidade, presume-se que crianças e jovens respondam melhor ao *stress* de quimioterapias agressivas, mucosites e procedimentos cirúrgicos do que adultos e, naturalmente, idosos (NGUYEN et al., 1995; NUCCI et al., 1998c).

Relativamente aos processos primários (**tabela 1**), apenas 49% dos pacientes investigados tinham anotados em suas fichas a doença de base. Contudo, foi possível verificar que 41% destes processos eram de origem hematológica. Com taxas de incidência de 20%, as leucemias foram as doenças de base mais frequentes. No Brasil, de acordo com o documento *As Estimativas de Câncer para o Brasil* publicado bianualmente pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), na esfera onco-hematológica, as leucemias são preponderantes (BRASIL, 2007d). Taxas de infecção fúngica neste grupo de pacientes são da ordem de 20%-30%, com *Candida* spp. se apresentando como o patógeno mais comum (58%) (BODEY et al., 1992). As leucemias têm sido consideradas um importante fator de risco para o desenvolvimento de candidíases nosocomiais devido ao próprio estado consumptivo da doença (HAMERSCHLAK, 2008;

MARTINO & SUBIRÀ, 2002) e, também, em decorrência da abordagem terapêutica que pode levar os pacientes a importante leucopenia (<1.000 leucócitos/mm³), granulocitopenia (<500 granulócitos/mm³), trombocitopenia (<25.000 plaquetas/mm³), anemia (<6,5g/dl de hemoglobina) e linfocitopenia (<6,5g/dl de hemoglobina), bem como a febres (>40°C por mais de 24 horas ou com hipotensão), dermatite esfoliativa ou ulcerativa, náuseas, diarréias e vômitos, disritmias e sintomas neurológicos graves (BRASIL, 2001).

Dentre as patologias de base hematológica observadas nos pacientes avaliados, a doença falciforme foi inesperada. Em nossa casuística, 16% dos pacientes com infecção fúngica apresentavam anemia falciforme (**tabela 1**). Este achado não teve correspondente na literatura, pois os relatos de infecções invasivas que surgem como complicações nesta doença mencionam quase que exclusivamente bactérias encapsuladas como *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenza* tipo B e bactérias gram-negativas como *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* (DI NUZZO & FONSECA, 2004; MAGALHÃES, 2007; MAGNUS et al., 1999; MELLES & MARIE, 2004).

Pacientes com doença falciforme são considerados imunocomprometidos, apresentando, inclusive, alterações da função celular (COSTA et al., 2006). No entanto, é a diminuição da opsonização o fator mais crítico. Em indivíduos normais, a fração C3b, gerada na ativação da via clássica ou alternativa do complemento, e a fração C4b, liberada na via clássica, têm ação de opsonização, pois, ao se ligarem à superfície dos microrganismos e aos receptores específicos em neutrófilos e macrófagos, promovem a fagocitose e a depuração sanguínea (ITURRY-YAMAMOTO & PORTINHO, 2001). Em paciente com asplenia funcional ou esplenectomizados, a porção não-esplênica do sistema mononuclear fagocitário (SMF) compensa sua ausência, mas a formação de anticorpos é menos eficiente. Nesta situação, diminui a função de IgG e a quantidade de IgM (BJORNSON, 1994). O comprometimento da resposta humoral é, claramente, favorável às bactérias, mas não aos agentes fúngicos, que são mais sensíveis à resposta mediada por células (MACHADO et al., 2004).

Provavelmente, a compensação da fagocitose, principalmente pelo SMF hepático, ofereça suficiente proteção frente aos fungos. Além disto, neutrófilos e monócitos são capazes de fagocitar *Candida* spp. não-opsonizadas em níveis satisfatórios (DIAMOND & HAUDENSCHILD, 1981). Outro dado relevante é a maior capacidade patogênica das bactérias encapsuladas em relação aos agentes fúngicos oportunistas, o que também vai influenciar positivamente a taxa de incidência das

bacteremias (WU et al., 2008). Em decorrência disto, não era esperado o percentual de infecção por *Candida* spp. observado nos pacientes com anemia falciforme estudados. Assim, é provável que fatores de risco específicos para candidíases invasivas também estivessem presentes e condicionando fortemente essas taxas (CHOW et al., 2008; DIMOPOULOS et al., 2007; FILIOTI et al., 2007). Contudo, para a confirmação desta hipótese, seria necessária a realização de estudos prospectivos, o que não era o objetivo deste trabalho. De qualquer modo, é plausível especular que talvez alguns destes pacientes estivessem, por exemplo, fazendo uso de antibioticoterapia prolongada para controle/profilaxia de bacteremias (CHULAMOKHA et al., 2006), citostáticos como hidroxiuréia para estímulo da produção de hemoglobina fetal (BANDEIRA et al., 2004) ou corticoterapia para tratamento de complicações como doenças auto-imunes (COUILLARD et al., 2007), bem como tenham sido submetidos a transfusões de sangue para reposição dos níveis de hemoglobina e ferro (NAUFEL et al., 2002), cirurgias cardíacas para *bypasses* cardiopulmonares (FRIEDRISCH, 2007) e cirurgias abdominais para ressecção de baço comprometido por crise de seqüestro esplênico (AL-SALEM, 2006) e, ainda, estivessem cateterizados, sob nutrição parenteral total ou expostos a cuidados intensivos em UTI (ADAMS-GRAVES et al., 2008).

Corroborando com as suposições acerca da existência de fatores de risco para fungemias, há na literatura relatos recentes de infecções sistêmicas por *Rhodotorula glutinis* (NEOFYTOS et al., 2007) e por *C. albicans* (CHULAMOKHA et al., 2006) em paciente com anemia falciforme cateterizados e internados em UTI. No entanto, a despeito da ocorrência de bacteremias, naqueles indivíduos não-cateterizados, segundo o estudo de Chulamokha et al. (2006), não foram observados episódios de natureza fúngica.

Na presente casuística, foi possível observar que *C. albicans* foi a espécie mais prevalente dentro do gênero *Candida* (43,5%) (**tabela 2**). Além disto, *C. albicans* representou também 41% de todos os isolados de candidemia (**tabela 3**). Esse percentual é concordante com aquele informado recentemente para essa espécie pelo Programa Internacional de Vigilância Epidemiológica *SENTRY* que investigou a distribuição das espécies de *Candida* isoladas de candidemias e seus perfis de susceptibilidade aos antifúngicos na América do Norte, América Latina e Europa (MESSER et al., 2006). Estudos multicêntricos em outras partes do mundo como Ásia e Oceania também relataram a maior frequência de isolamento de *C. albicans* de candidemias (SHEN et al. 2007; SLAVIN, 2002). No Brasil, *C. albicans* tem sido

igualmente a levedura mais isolada de candidemias em todas as regiões do país (ANTUNES et al., 2004; AQUINO et al., 2005; BARBERINO et al., 2006; PASSOS et al., 2007; RESENDE et al., 2002; SUGIZAKI et al., 1998). A explicação para o fato de *C. albicans* apresentar os maiores percentuais de recuperação pode estar relacionada a sua grande adaptabilidade e versatilidade patogênica (KUMAMOTO & VINCES, 2005; ODDS, 1994) representada pela capacidade de aderência a diferentes mucosas e epitélios, o dimorfismo com produção de estruturas filamentosas que auxiliam a invasão tissular, a termotolerância significativa e a produção de enzimas como proteases e fosfolipases (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003). No entanto, ao contrário do que foi encontrado neste estudo, Nucci et al. (1998b), Matsumoto et al. (2002), Medrano et al. (2006) e Velasco & Bigni (2008) informaram a preponderância de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* sobre as demais espécies de *Candida* recuperadas de candidemias em alguns hospitais terciários brasileiros, incluindo o Rio de Janeiro. É consenso que diferenças na distribuição de espécies de *Candida* podem ocorrer em função da região e do período de estudo (PFALLER et al., 2000; ST-GERMAIN et al. 2001). Características climáticas, demografia, doenças de base, manejo de pacientes, terapia antifúngica e nível e classificação dos hospitais são outros fatores que também podem influenciar a taxa de isolamento das espécies (COLOMBO et al., 2003b).

Apesar de *C. albicans* ter sido o agente etiológico mais frequente nesta investigação, levando em conta apenas o gênero *Candida*, as espécies não-*albicans* representaram, em conjunto, a maioria dos isolados clínicos (56,5%) (**tabela 2**), bem como a maioria dos isolados de candidemias (59%) (**tabela 3**). O aumento progressivo nas taxas de recuperação das espécies não-*albicans* tem sido amplamente relatado (BARCHIESI et al., 1993; NGUYEN et al., 1996; PFALLER, 1996; VERDUYN-LUNEL et al., 1999). No Brasil, essa tendência foi igualmente confirmada (COLOMBO, 2000; COLOMBO et al., 1999; MEDRANO et al., 2006; NUCCI et al., 1998a) e taxas de isolamento de até 75,0% têm sido reportadas para espécies não-*albicans* (PASQUALOTTO et al., 2005a). A emergência de isolados não-*albicans* parece ser decorrente da seleção de cepas mais resistentes devido ao uso ostensivo de derivados azólicos (BERROUANE et al., 1999; MARR 2004; TRICK et al., 2002). Na realidade, a importância sanitária destas espécies reside exatamente na sua maior capacidade de desenvolver resistência às drogas antifúngicas de uso clínico (NUCCI & COLOMBO, 2002).

De acordo com o Programa Internacional de Vigilância Epidemiológica *ARTEMIS*, que também vem sistematicamente publicando os resultados sobre a

freqüência de isolamento de espécies de *Candida* recuperadas de candidemias e suas taxas de susceptibilidade às drogas antifúngicas em diversas partes do mundo, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* são as espécies não-*albicans* predominantes (PFALLER et al. 2003, 2005a). *C. glabrata* é a espécie não-*albicans* mais isolada na América do Norte e Europa (PFALLER et al., 2000, 2007), sendo menos frequente na América Latina (COLOMBO et al. 2003a; PFALLER et al., 2001, 2005b), por isso, também menos importante em nível de saúde pública (PFALLER et al., 2004b). Nesta região, as principais espécies não-*albicans* encontradas são *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (GODOY et al. 2003; PFALLER et al., 1998a 2000, 2007). Na presente investigação, depois de *C. albicans*, as espécies de *Candida* mais isoladas de candidemias foram ainda *C. parapsilosis* (36,7%), *C. guilliermondii* (12, 2%), *C. tropicalis* (8,1%) e *C. krusei* (2%) (**tabela 3**).

A recuperação de *C. parapsilosis* (36,7%) de hemoculturas em percentuais semelhantes aos encontrados neste estudo foi também amplamente relatado no Brasil por Antunes et al. (2004), Aquino et al. (2005), Colombo et al. (1999, 2007), Nucci et al. (1998a), Pasqualotto et al. (2005a) e Sugizaki et al. (1998). Os fatores de risco associados às candidemias por *C. parapsilosis* têm sido bem discutidos na literatura (MEDRANO et al., 2006; NUCCI & COLOMBO, 2007). Em *C. parapsilosis*, tipicamente, cateterismo e nutrição parenteral total são críticos (CANTÓN et al., 2001). De acordo com um estudo interinstitucional conduzido por Brito et al. (2006) no Brasil, *C. parapsilosis* parece ser, particularmente, mais frequente em pacientes com neoplasia com cateter venoso central tunelado (tipo de Hickman) implantado para a administração de quimioterápicos. Na presente casuística, contudo, foi *C. albicans* (57,1%), e não *C. parapsilosis* (42,9%), a espécie que apresentou a maior taxa de isolamento em cultura de cateter. O uso ostensivo de antifúngicos para a prevenção de infecções invasivas por *Candida* spp. em pacientes de alto risco é outro importante fator predisponente (ALMIRANTE et al., 2006). A forte colonização das mãos do pessoal de saúde e a formação de biofilmes em dispositivos médico-cirúrgicos é uma característica notável desta levedura que influencia grandemente sua disseminação hospitalar (PFALLER et al., 2008b). Com relação aos pacientes pediátricos e jovens, prematuridade, baixo peso ao nascimento, subnutrição e colonização prévia são também fatores de risco para a aquisição de infecção sistêmica por *C. parapsilosis* (VAN ASBECK et al., 2007). Neste grupo, a prevalência de candidemias é de 17% a 50% dos casos (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003). No presente trabalho, a faixa etária mais acometida foi aquela compreendida entre 0 e 20 anos. Brito et al. (2006),

estudando candidemias por *C. parapsilosis*, encontraram uma média de idade de quase 30 anos, mais elevada do que a encontrada nesta avaliação (23,3 anos).

No presente estudo, *C. guilliermondii* (12,2%) foi a segunda espécie não-*albicans* mais isolada de candidemias. Apesar de ser um patógeno pouco frequente, esta levedura tem demonstrado percentuais crescentes de isolamento (PFALLER et al., 2005b, 2006), principalmente, na América Latina, onde tem ocupado posições intermediárias entre as *Candida* não-*albicans* (GODOY et al., 2003). A maioria dos casos descritos está relacionada com pacientes com neoplasias (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003). Há poucos dados sobre a história natural das candidemias por este agente, havendo dúvidas se a origem é endógena ou exógena. No entanto, *C. guilliermondii* faz parte da microbiota transitória de mãos e unhas, o que pode associá-la a procedimentos invasivos (MATTA et al., 2007). Cirurgias abdominais e cardiovasculares, neoplasias, cateter venoso central e antibioticoterapia prévia são os principais fatores predisponentes para infecção hospitalar por esta espécie (MEDEIROS et al., 2007; PASQUALOTTO et al., 2006; PFALLER et al., 2007). No Brasil, taxas de isolamento de 6% a 12% têm sido relatadas (COLOMBO et al., 2007; MATSUMOTO, et al., 2001; VELASCO & BIGNI, 2008), fazendo com que a levedura seja considerada um patógeno emergente (NUCCI et al., 1998b).

Relativamente à *C. tropicalis* (8,1%), esta foi a terceira espécie não-*albicans* com maior taxa de recuperação em hemocultura. Ao contrário do que foi obtido nesta investigação, *C. tropicalis* foi a espécie não-*albicans* mais isolada em dois recentes estudos multicêntricos nacionais (COLOMBO et al., 2006; MATTA et al., 2007). De maneira geral, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* correspondem em conjunto cerca de 70% dos isolados não-*albicans* de candidemias em hospitais brasileiros (COLOMBO et al., 2006). As causas para o baixo percentual de isolamento encontrado neste estudo não estão claras, mas a doença de base, o manejo hospitalar e o regime terapêutico podem ter tido alguma influência (COLOMBO et al., 2008). Preferencialmente, *C. tropicalis* acomete pacientes com patologias hematológicas malignas (ABI-SAID et al., 1997), sendo, em geral, menos comum em pacientes com tumores sólidos (WINGARD, 1995). Na América Latina e Brasil, todavia, é encontrada causando, indiscriminadamente, infecção em pacientes hospitalizados (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003). No presente trabalho, a anemia falciforme foi a condição clínica mais importante no caso desta espécie. O risco de infecção invasiva por *C. tropicalis* é consideravelmente maior em neutropenia, mucosites e antibioticoterapia prolongada (KONTOYIANNIS et al., 2001). Cerca de 50% a 80% dos indivíduos colonizados, eventualmente, desenvolvem

candidemias por *C. tropicalis* quando fatores de risco estão presentes (KONTOYIANNIS et al., 2001; SANDFORD et al., 1980).

Nesta investigação, *C. krusei* (2%) foi a levedura com o menor percentual de isolamento, a partir de candidemias. Esta espécie tem se mostrado um patógeno hospitalar ocasional, acometendo, principalmente, pacientes hematológicos e aqueles submetidos a transplantes de medula óssea (PFALLER et al., 2008a; COLOMBO & GUIMARÃES, 2003). Além disto, pacientes neutropênicos sob prolongada quimioterapia com fluconazol têm se mostrado também susceptível a infecções da corrente sanguínea por *C. krusei* (PFALLER & DIEKEMA, 2007). Cateter e uso prévio de antibióticos parecem não condicionar os percentuais de candidemia (CANTÓN et al., 2001). Taxas de 2% a 4% têm sido reportadas para candidemias causadas por esta levedura nos Estados Unidos e Europa (PFALLER & DIEKEMA, 2007). No Brasil, estudos multicêntricos prospectivos conduzidos por Colombo et al. (2006) e Matta et al. (2007) revelaram taxas de infecção da corrente sanguínea de 0,6% a 1,1%. Em relação à presente casuística para *C. krusei* (2%), há consistência com os dados da literatura no que tange ao relato de percentuais extremamente baixos quando comparados com aqueles das outras espécies não-*albicans*.

No presente trabalho, sangue foi a mais importante fonte de *Candida* spp. (45,4%) (**tabela 3**). Contudo, também contribuíram de maneira considerável o trato urinário (21,3%), lesões tegumentares (8,3%), trato respiratório (7,4%) e cateter (6,5%). Apesar de hemocultura ser o principal marcador para infecções invasivas (MARTIN et al., 2003) e os espécimens não-estéreis serem considerados de importância relativa para o diagnóstico de infecção hospitalar (WANG et al., 2004), o isolamento de *Candida* spp., a partir desses espécimens, pode apresentar certo valor preditivo para candidemias (SANDFORD et al., 1980), pois muitos processos invasivos estão associados à microbiota do próprio hospedeiro (AGVALD-ÖHMAN et al., 2008; CHARLES et al., 2005). Nesta série, a distribuição das espécies de *Candida* para este grupo de amostras clínicas foi a seguinte: *C. albicans* (54%), *C. parapsilosis* (26%), *C. guilliermondii* (8%), *C. tropicalis* (6%), *C. glabrata* (2%), *C. famata* (2%) e *C. lambica* (2%). Estes achados são compatíveis com os estudos de prevalência envolvendo também espécimens não-estéreis conduzidos por Resende et al. (2002) no Brasil e por Comert et al. (2006) na Turquia. No entanto, *C. guilliermondii* surge aqui também como a segunda espécie não-*albicans* mais isolada, enquanto que nos trabalhos dos referidos autores esta levedura apresenta taxas bem inferiores (1% e 2%,

respectivamente). Além disto, nesta casuística, é reportado ainda o isolamento de *C. lambica* que tem sido considerada um patógeno infrequente (VERVAEKE et al., 2008).

De acordo com Hazen (1995), candidíases invasivas em humanos são causadas por cerca de 17 espécies. Entretanto, mais de 90% destas infecções são atribuídas, basicamente, há apenas 5 delas: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (PFALLER & DIEKEMA, 2007). A expansão do número de pacientes críticos tem determinado o aparecimento de novas espécies de *Candida*, (PFALLER et al., 2007). Este fato tem imposto aos laboratórios de microbiologia hospitalar a necessidade de melhorias em sua capacidade de identificação de espécies patogênicas, não somente para suporte à terapêutica das doenças infecciosas, mas também para seu controle e prevenção (PFALLER & DIEKEMA, 2002). O sucesso dos programas de vigilância das infecções hospitalares depende da competência do laboratório de microbiologia (PETERNSON et al., 2001).

No Brasil, o papel do laboratório de microbiologia hospitalar tem sido discutido e contextualizado. Segundo o Ministério da Saúde/ANVISA (ANVISA, 2004b), o objetivo do laboratório de microbiologia pode ser assim considerado:

"O objetivo de um laboratório de microbiologia não é apenas apontar o responsável por um determinado estado infeccioso, mas sim, indicar, através do monitoramento de populações microbianas, qual o perfil dos microrganismos que estão interagindo com o homem. Com essas informações, a equipe de saúde é capaz de definir quais microrganismos podem ser responsáveis pelo quadro clínico do paciente e assim, propor um tratamento mais adequado. No entanto, para alcançar esses objetivos, os laboratórios de microbiologia devem possuir estrutura capaz de estabelecer informações sobre a melhor amostra biológica, reconhecer a microbiota, reconhecer os contaminantes, (...) identificar microrganismos com propósitos epidemiológicos, obter resultados rápidos em casos de emergência, racionalizar no uso de antimicrobianos, realizar o transporte rápido das amostras e o relato dos resultados e manter uma educação médica contínua em relação aos aspectos da infecção hospitalar".

De acordo com Ferraz et al. (1997), o laboratório de microbiologia desempenha uma função importante no apoio à comissão de controle de infecção hospitalar nas diversas etapas da investigação epidemiológica, pois auxilia diretamente no diagnóstico de infecções e na identificação de pacientes com infecção ou colonização, cabendo-lhe realizar, quando necessário, estudos para estabelecer as diferenças e semelhanças entre microrganismos, realizar estudos do ambiente hospitalar e treinar o pessoal para as atividades de controle.

Prade et al. (1995), em seu estudo multicêntrico nacional sobre infecção hospitalar, consideram que, na medida em que se organizam as comissões e serviços de controle de infecção hospitalar, surge a necessidade de conhecimento das características epidemiológicas microbianas de cada instituição, acarretando a melhoria de técnicas e resultados microbiológicos. Conforme Rodrigues et al. (1997), o laboratório de microbiologia atua gerando e fornecendo relatórios sobre a distribuição de microrganismos identificados em sítios corporais e unidades do hospital.

Prade et al. (1995) afirmam ainda que um exame microbiológico é resultado de uma seqüência de etapas que devem ser executadas com precisão, acurácia e no menor tempo possível. Tornando-se necessário, para isso, que o laboratório detenha o controle de cada uma destas etapas, orientando a padronização de rotinas e checando a correta execução de suas atividades.

Recentemente, no entanto, a caracterização de laboratórios de microbiologia hospitalar no Brasil foi feita pelo Ministério da Saúde, ANVISA e Organização Panamericana de Saúde (OPAS), através do *Inquérito Nacional dos Laboratórios de Microbiologia de Hospitais com 10 ou mais Leitos de UTI e Hospitais Sentinelas* (BRASIL, 2007b). De acordo com o Ministério da Saúde, foram incluídos neste estudo os laboratórios responsáveis pelos exames microbiológicos de hospitais terciários públicos e privados das 5 regiões do Brasil. O levantamento dos dados foi feito no período de abril de 2002 a julho de 2005 por meio de visitas técnicas e preenchimento de questionários que continham as seguintes variáveis: identificação do laboratório e hospital, fonte de financiamento, infra-estrutura, recursos humanos, insumos e equipamentos, procedimentos (fases pré-analítica, analítica e pós-analítica), sistema da qualidade e biossegurança.

Um total de 464 unidades laboratoriais que prestavam serviços de microbiologia clínica para 531 hospitais foi avaliado. A maior parte destas instituições se encontrava na região sudeste (68%), seguido pelas regiões sul (18%), nordeste (7%), norte e centro-oeste (3%). Os estados com maior predomínio de hospitais foram São Paulo

(42%), Rio de Janeiro (15%) e Minas Gerais (8%) (BRASIL 2007a; 2007b). Os dados apurados foram consolidados pelo Ministério da Saúde no documento *Análise do Inquérito Nacional sobre Infra-estrutura, Recursos Humanos, Equipamentos, Procedimentos, Controle de Qualidade e Biossegurança nos Laboratórios de Microbiologia* (BRASIL, 2007a) e os resultados obtidos permitiram identificar graves deficiências em todos os aspectos investigados no inquérito nacional. Em termos gerais, havia laboratórios que não possuíam os equipamentos mínimos necessários para o seu funcionamento e, no tocante aos procedimentos microbiológicos, havia aqueles que não eram capazes, se quer, de realizar a coloração de Gram.

Particularmente, com relação aos fungos, o estudo do Ministério da Saúde revelou que apenas 12,9% laboratórios tinham profissionais especializados em micologia médica e que em 83,8% havia rotina para fungos, sendo que destes, 99,2% faziam microscopia direta (84,3% tinta da China e 78,7% hidróxido de potássio), 88,7% cultura, 42,2% microcultivo em lâmina e 14,4% identificação bioquímica manual. Kits para identificação de leveduras eram empregados por 10,0% dos laboratórios com rotina micológica e sistemas automatizados eram utilizados por 21,9%. A identificação do gênero *Candida* era feita por 84,6% dos laboratórios, no entanto, apenas 51,7% identificavam a espécie. Dos laboratórios que identificavam *Candida* spp., 62,9% faziam apenas tubo germinativo (BRASIL, 2007b).

Conforme o próprio Ministério da Saúde, estes dados são insatisfatórios, já que os laboratórios estudados realizam exames para hospitais com leitos em UTI onde infecções da corrente sanguínea por *Candida* spp. são frequentes (BRASIL, 2007a). Ainda segundo o Ministério da Saúde, o fato de 15,4% dos laboratórios não identificarem o gênero *Candida* e de 48,3% não identificarem as espécies deste gênero exerce impacto negativo sobre o real conhecimento da epidemiologia das infecções hospitalares e sobre o padrão de distribuição das espécies no Brasil (BRASIL, 2007a; 2007b). De acordo com Colombo & Guimarães (2007), o correto diagnóstico de espécies associadas às infecções fúngicas invasivas não é apenas de interesse para a epidemiologia, mas também são de importância para a clínica, pois a história natural destas infecções, bem como sua resposta ao tratamento com azólicos e poliênicos, variam com as diferentes espécies relacionadas. Além disto, o reconhecimento de surtos só é possível a partir da efetiva identificação do agente quanto à espécie (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003, 2007).

Pelo exposto, a análise dos métodos de identificação fúngica é claramente relevante para o sistema sanitário brasileiro, pois o diagnóstico das infecções invasivas

é deficiente. Como já mencionado, isto é particularmente verdade para os agentes de infecção da corrente sanguínea cujas taxas de morbi-mortalidade, em geral, são elevadas e os resultados da quimioterapia antifúngica são fortemente condicionados pelo tempo e etiologia (COLOMBO et al., 2006). No cenário nacional, as candidemias são os processos invasivos de natureza fúngica mais críticos, pois quase a metade dos laboratórios estudados pelo Ministério da Saúde não identificam a espécie de *Candida* envolvida na infecção.

Segundo Dealler (1991), estes índices poderiam ser melhorados com o emprego de um teste de baixo custo que permitisse um diagnóstico precoce e pudesse ser executado por um *staff* com moderado grau de expertise em micologia, como, por exemplo, a prova do tubo germinativo. No entanto, também conforme os dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2007b), apenas 44,6% dos laboratórios no Brasil realizam essa técnica. Esta prova é um procedimento diagnóstico que fornece uma identificação presuntiva de *C. albicans* (SHEPPARD et al., 2008). Aproximadamente 95% dos isolados clínicos desta espécie são capazes de produzir tubos geminativos quando incubados em soro humano a 37° C por 2-3 horas (LO et al., 2001; RIMEK et al., 2007). O tubo germinativo representa a iniciação de uma hifa verdadeira que se desenvolve a partir da célula de levedura. Em seu ponto de origem, o tubo germinativo apresenta paredes paralelas e ausência de constrições, o que o difere das pseudohifas (BERARDINELLI & OPHEIM, 1985).

Nesta investigação, um conjunto de provas convencionais e moleculares foi empregado para a identificação das espécies sob investigação e, dentre estas, a prova do tubo germinativo foi avaliada. Todas as espécies de levedura foram desafiadas quanto à capacidade de produção de tubo germinativo. No entanto, como esperado, apenas *C. albicans* (**anexo 1**) foi capaz de desenvolver esta estrutura. Em nossa casuística, um total de 10,6% dos isolados de *C. albicans* não foi capaz de produzir tubo germinativo, um percentual mais elevado do que aquele observado na literatura, que, normalmente, relata taxas de falsos-negativos em torno de 5% (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2001; LO et al., 2001; TERLECKA et al., 2006). Segundo Berardinelli & Opheim (1985), falso-negativos podem ocorrer em função do tamanho do inóculo, tempo de incubação, tipo de meio de cultura e tempo de preservação do isolado. Falso-positivos também podem ocorrer em cerca de 1%-2% dos casos, sendo que as espécies mais envolvidas são *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2001; TERLECKA et al., 2006). Há relatos ainda de tubo germinativo em *C. parapsilosis* (LIPPERHEIDE et al., 1993). No presente trabalho, não foi observada a produção de

tubos germinativos em *C. tropicalis* e em nenhum outro isolado não-*albicans*. Corroborando com os percentuais de sensibilidade (89,4%) e especificidade (100%) encontrados na presente casuística, taxas de sensibilidade e especificidade de 91%-100% e 95%-100%, respectivamente, têm sido informadas, por diferentes autores, para esta prova (ARORA et al., 2003; FOONGLADDA et al., 2002; HOPPE & FREY, 1999).

Neste estudo, todavia, analisando a prova do tubo germinativo em conjunto com a identificação em CHROMagar foi possível observar que quase 90% dos isolados de *C. albicans* (**anexo 1**) foram adequadamente identificados por esta prova, mas quando verificado os resultados da identificação no meio cromogênico, observou-se que este foi superior, pois 100% dos isolados foram corretamente identificados. Este dado é confirmado por Campbell et al. (1998) e Hoppe & Frey (1999) que também relataram, em comparações com meios cromogênicos, uma melhor acurácia destes métodos de identificação de *C. albicans* em relação ao tubo germinativo. Comportamento semelhante foi observado quando a prova do tubo germinativo foi comparada com a identificação bioquímica. Claramente superior, a bioquímica permitiu identificar corretamente 100% dos isolados de *C. albicans* testados enquanto que a prova do tubo germinativo detectou apenas 89,4%. Estes valores são consistentes com aqueles relatados por Guelfand et al. (2003), na Argentina, e Lo et al. (2001), em Taiwan, para comparações entre tubo germinativo e provas bioquímicas. Interessante notar que todos os isolados cuja prova do tubo germinativo foi negativa apresentaram baixos percentuais de probabilidade (68-78%), segundo o *software* do equipamento Vitek (BioMerieux, França). Contudo, apesar da solicitação de testes complementares para confirmação, todas essas leveduras foram caracterizadas como *C. albicans* pelo equipamento. Correlações positivas entre a indução de tubo germinativo e a produção de enzimas hidrolíticas têm sido demonstradas, mas em modelos experimentais de infecção (VIDOTTO et al., 1999). Relativamente à prova molecular, o tubo germinativo também apresentou menor sensibilidade (89,4%), pois 100% das cepas de *C. albicans* foram identificadas molecularmente.

Considerando a produção de clamidósporos, todos os isolados que apresentaram resultados negativos para tubo germinativo também foram negativos para clamidósporo, o que revela a mesma taxa de sensibilidade (89,4%). Tradicionalmente, o desenvolvimento de clamidósporos tem sido usado em micologia médica como procedimento diagnóstico de *C. albicans*. Mais de 90% de todos os isolados de *C. albicans* produzem clamidósporos quando inoculadas em meios apropriados. Esta característica é tão consistente nesta levedura quanto à produção de

tubo germinativo (BEHESHTI et al., 1975). O passo preliminar para o desenvolvimento de clamidósporos é a filamentação. Desse modo, as condições que favorecem a produção de hifas e pseudohifas encorajam, igualmente, o desenvolvimento de clamidósporos. Dentre os fatores que parecem favorecer a produção destas estruturas, a presença de dissacarídeos e trissacarídeos, mais do que outras hexoses, são preponderantes. Outros fatores que estimulam a produção de clamidósporos incluem pH levemente alcalino, microaerobiose, ausência de íons inorgânicos, uso de meios sólidos, diminuição da tensão superficial pelo tween 80 e inóculo de 24 horas e com densidade de aproximadamente 10^6 células/mL (MCGNNIS, 1980). Esta prova tem sido empregada quando não há formação de tubo germinativo para confirmação de *C. albicans* (SAND & RENNIE, 1999). Em nossos achados, todavia, como já mencionado, não encontramos diferenças entre os resultados de ambas as técnicas morfológicas. Segundo Lo et al. (2001), essas provas podem ser empregadas como primeiro passo para a identificação de leveduras hospitalares, mas comparativamente, a prova do tubo germinativo é mais econômica e menos laboriosa (HEELAN et al., 1996).

No contexto do laboratório de microbiologia hospitalar, algumas questões concernentes às limitações da prova do tubo germinativo e do clamidósporo devem ser abordadas. Estas provas são aplicadas apenas para a identificação de *C. albicans* ou para sua exclusão (HOPPE & FREY, 1999). Desse modo, o laboratório deverá decidir quando realizar tais procedimentos. Esta decisão irá depender do tipo de espécimen clínico, número de espécimens positivos com o mesmo organismo, número de organismos presentes e tipo de processo clínico (SAND & RENNIE, 1999). Nestas provas, deve ser sempre considerada a possibilidade de alguns isolados de *C. albicans* apresentarem resultados falso-negativos (5%), bem como falso-positivos (1-2%) (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2001; TERLECKA et al., 2006). Outra questão que deve ser ainda discutida é atinente à própria execução do teste no laboratório, já que são críticos para a produção de tubo germinativo a composição e a qualidade do soro sanguíneo empregado e o correto preparo do inóculo. Além disto, a experiência em micologia do analista é determinante para a obtenção de resultados fidedignos, pois é necessário o exame de pelo menos 100 células de levedura para se declarar a prova negativa (HOPPE & FREY, 1999).

Para laboratórios com grande número de isolamentos, as provas morfológicas podem não ser adequadas (LO et al., 2001). Nestes casos, provas cromogênicas e bioquímicas representaram considerável avanço. O CHROMagar-*Candida* e o sistema automatizado VITEK apresentam comodidade e facilidade de manuseio, gerenciamento

de dados (no caso do sistema automatizado) e capacidade de identificar, em um período de 24-48 horas, em nível de espécie, as principais leveduras de infecção hospitalar (ALMEIDA, 2005). O CHROMagar Candida é um método baseado em reações de enzimas espécie-específicas que hidrolizam um substrato cromogênico e cuja atividade é revelada através de um indicador de pH (ODDS & BERNAERTS, 1994), permitindo identificar, pela coloração e morfologia da colônia, basicamente, *C. albicans* (verde), *C. tropicalis* (azul) e *C. krusei* (rosa) e, em alguns casos, *C. glabrata* (rosácea). Este meio tem sido utilizado para isolamento primário e para a identificação de leveduras recuperadas em métodos convencionais (PFALLER et al., 1996). A principal característica do CHROMagar parece ser a sua capacidade de detectar culturas polifúngicas de espécimens clínicos (ODDS & BERNAERTS, 1994; PFALLER et al., 1996; WILLINGER & MANAFI, 1999).

Na presente casuística, todos os isolados de *C. albicans* (**anexo 1**) foram corretamente identificados, exibindo uma coloração verde-claro brilhante no meio CHROMagar. De acordo com Sivakumar et al. (2009) o meio é de grande utilidade na identificação presuntiva de candidemias por *C. albicans*. Okulicz et al. (2008) consideram que o CHROMagar Candida é especialmente eficiente na separação de *C. albicans* das espécies não-*albicans*. No entanto, Odds & Davidson (2000) e Saunte et al. (2005) relataram o crescimento de colônias de *C. albicans* de coloração rosa. Segundo Odds & Davidson (2000), temperaturas de incubação inferiores à 30° C parecem influenciar neste fenômeno. Não obstante conflitos de identificação, elevadas taxas de sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo para *C. albicans* têm sido descritas (GARCÍA-MARTOS et al., 1998). Conforme Odds & Bernaerts (1994), estas taxas excedem 99%.

Com relação à identificação de *Candida* não-*albicans*, o CHROMagar apresenta respostas diferentes em função do tipo de espécie sob investigação. Claramente, *C. tropicalis* e *C. krusei* são as espécies que demonstram os melhores rendimentos neste meio. Neste estudo, os 11 isolados de *C. tropicalis* (**anexo 1**) foram adequadamente identificados, apresentando a coloração azul-cobalto característica. De acordo com Pfaller et al. (1996), o CHROMagar detecta facilmente a presença de *C. tropicalis* no meio de cultura. Para esta espécie, Sán-Millán et al. (1996) encontraram uma sensibilidade de 93,8% e especificidade de 99,1%. Entretanto, Willinger & Manafi (1999), informaram uma taxa de sensibilidade de apenas 66,7%, em decorrência do surgimento de colônias de coloração branca e violeta. Falso-positivos podem ocorrer com *Saccharomyces cerevisiae* (WILLINGER & MANAFI, 1999) e algumas amostras de

C. guilliermondii e *C. humicolus* (BERNAL et al., 1995). Colorações esverdeadas têm sido também relatadas, o que pode levar a confusões com *C. albicans* (SIVAKUMAR et al., 2009).

O único representante da espécie *C. krusei* (LMC-287T) isolado neste trabalho (**anexo 1**) foi inequivocamente reconhecido em CHROMagar, tendo em vista o crescimento de uma colônia difusa, de coloração rosa, aspecto seco e fosco e textura rugosa. Com base nestas características morfológicas, segundo Powell et al. (1998), *C. krusei* é facilmente distinguida das outras espécies de *Candida*. Apesar da rara ocorrência de falso-positivos (BAUMGARTNER et al., 1996), *C. firmmentaria*, *C. inconspicua*, *C. lypolitica* e *C. norvergensis* podem apresentar morfologia colonial semelhante àquela de *C. krusei* (HOSPENTHAL et al., 2006). Todavia, sensibilidade de 99% e especificidade de 100% têm sido relatadas, por Hospenthal et al. (2006), para *C. krusei*.

Relativamente aos dois isolados de *C. glabrata* (LMC-353T, LMC-360T) (**anexo 1**), estes exibiram uma coloração rosácea no meio, o que não permitiu diferenciá-los de *C. guilliermondii* e da maioria de *C. parapsilosis*. Na realidade, a utilização de CHROMagar para a detecção de *C. glabrata* é controversa. De acordo com Freydiere (1996), que avaliou 289 isolados clínicos e encontrou 12 leveduras exibindo uma coloração rósea ou violácea, com exceção de *C. krusei*, todas as outras 11 eram indistinguíveis. Odds & Bernaerts (1994), Sán-Millán et al. (1996) e Sivakumar et al. (2009) também relataram o mesmo problema e questionaram a eficiência do CHROMagar para a identificação de *C. glabrata*. No entanto, Pfaller et al. (1996) afirmaram a capacidade deste meio cromogênico em diferenciar *C. glabrata* dos demais agentes, pois esta parece produzir caracteristicamente uma coloração violeta-escuro. Bernal et al. (1996), inclusive, demonstraram o bom rendimento do CHROMagar, ao encontrar, a partir de seus estudos, sensibilidade (98,9%) e especificidade (99,8%) elevadas para *C. glabrata*.

No caso das outras espécies não-*albicans* avaliadas (**anexo 1**), foi observado neste estudo que *C. parapsilosis* apresentou 25 colônias de coloração rosa e 08 de coloração branca e que *C. famata*, *C. guilliermondii* e *C. lambica* também exibiram colônias de tonalidade rósea. Além disto, *C. humicolus* mostrou um aspecto rosa-acinzentado e *Trichosporon* sp. uma coloração azul-turquesa. Tais achados têm sido, igualmente, relatados por outros autores (ARAÚJO et al., 2005; GARCÍA-MARTOS et al., 1998; KOEHLER et al., 1999; POWELL et al., 1998). De acordo com a literatura, contudo, estes aspectos das colônias são inconsistentes e não permitem uma

identificação específica do fungo (ODDS & BERNAERTS, 1994; SIVAKUMAR et al., 2009), o que faz com que o CHROMagar seja pouco efetivo na separação destas leveduras (PFALLER et al., 1996; WILLINGER & MANAFI, 1999). No presente trabalho, uma sensibilidade de 100% e especificidade de 69,3% para *C. guilliermondii* e uma sensibilidade de 75,7% e especificidade de 77,5% para *C. parapsilosis* foram, por exemplo, observadas neste meio cromogênico (**anexo 1**). Segundo García-Martos et al. (1998), as colorações rosa, púrpura e branca são compartilhadas por um grande número de espécies e, por isso, são as que oferecem as maiores dificuldades interpretativas, sendo necessário, por conseguinte, recorrer a outras características morfológicas, além da coloração, para orientar a identificação ou, ainda, empregar provas bioquímicas complementares.

Na realidade, o papel do CHROMagar no laboratório de microbiologia hospitalar irá depender dos recursos micológicos disponíveis, população atendida e necessidade de controle epidemiológico. A detecção e a rápida identificação de patógenos são de importância para o conhecimento do padrão de distribuição das espécies e para a seleção dos mais apropriados agentes antifúngicos (PFALLER & DIEKEMA, 2002). Certamente, por isso, o CHROMagar-*Candida* poderá ser útil como instrumento de diagnóstico em pacientes imunocomprometidos e em cultura de vigilância (PFALLER et al., 1987; SANDFORD et al., 1980).

Apesar de não ser endossado como um método definitivo de identificação, a acurácia do CHROMagar no reconhecimento de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. glabrata*, demonstrada em diferentes estudos (GARCÍA-MARTOS et al., 1998; ODDS & BERNAERTS, 1994; WILLINGER & MANAFI, 1999) e também na presente casuística, pode suportar seu uso como um guia para decisões clínicas e avaliações sanitárias. Somado a isto, dado que muitos laboratórios de microbiologia hospitalar, especialmente no Brasil (BRASIL, 2007b), não realizam outra metodologia de identificação de *Candida* spp., além da prova do tubo germinativo, o uso deste meio cromogênico poderá ampliar o nível da identificação micológica do laboratório. O custo potencial da implantação desta prova poderá ser minimizado na rotina dos laboratórios hospitalares pela rápida capacitação dos analistas no uso do meio cromogênico, bem como pela melhoria na eficiência micológica, pois a detecção dos agentes clínicos mais frequentes em infecção invasiva (*C. albicans* e *C. tropicalis*) passa a ser possível (HORVATH et al., 2003; OKULICZ et al., 2008).

Como já mencionado, tradicionalmente, a identificação de leveduras é feita através de avaliações da micromorfologia e por estudos bioquímicos, envolvendo

assimilação e fermentação de carboidratos (MURRAY et al., 2005). Apesar de requererem, frequentemente, vários dias para a correta interpretação dos resultados e empregarem colônias isoladas, o que retarda ainda mais as análises laboratoriais, os ensaios bioquímicos são considerados provas definitivas de identificação (HOSPENTAL et al., 2006; QUINDÓS et al., 2001). A miniaturização e a automação dos painéis bioquímicos contendo açúcares-chaves para a identificação dos isolados de importância clínica, representou um real ganho de tempo e eficiência de diagnóstico (ALMEIDA, 2005). O sistema de identificação automatizado VITEK (BioMerieux, França) vem evoluindo sua performance desde os primeiros estudos de Pfaller et al. (1988), que relataram percentuais de identificação de 83%, até os de El-Zaatari et al. (1990), que informaram percentuais de 97,2%. De acordo com Stager & Davis (1992), este método apresenta claramente melhor rendimento para aquelas espécies mais relevantes na clínica. Contudo, para aquelas com menor incidência, algumas dificuldades têm sido reportadas.

Na presente avaliação, 90 (79,6%) dos isolados apresentaram taxa de probabilidade de mais de 85% (88-99%) para a primeira opção de identificação oferecida pelo *software* do aparelho VITEK (BioMerieux, França) (**anexo 1**). O restante dos isolados (20,4%) apresentou taxas que variaram entre 50 a 83%. Segundo Dooley et al. (1994), a identificação é considerada aceitável se a probabilidade da primeira escolha do equipamento for $\geq 85\%$ a 24h ou 48h sem a indicação de teste suplementar ou se a 24h não for solicitada nova incubação por mais 24h Testes suplementares e/ou extra-incubações de 24h foram solicitados basicamente para os isolados com percentuais de probabilidade abaixo de 85%. A exceção ficou por conta do único isolado de *Trichosporon* sp. (99%) cujo equipamento solicitou a realização de testes suplementares. Deste modo, 89 (78,8%) isolados foram identificados corretamente pelo equipamento. Taxas semelhantes (76%) às encontradas neste estudo também foram informadas por Dooley et al. (1994). Entretanto, de maneira geral, a literatura tem relatado percentuais de identificação de até 98% para este sistema automatizado (EL-ZAATARI et al., 1990; FENN et al., 1994; GUTIÉRREZ et al., 1994; PFALLER et al., 1988; WADLIN et al., 1999). Neste trabalho, 84,3% das identificações corretas foram informadas pelo equipamento nas primeiras 24h de incubação. Ocasionalmente, todavia, alguns isolados de crescimento mais lento necessitaram de mais 24h para assimilar os carboidratos do painel bioquímico. Outros autores também relataram para este equipamento elevados percentuais de identificação no período de 24 horas (DOOLEY et al., 1994; FENN et al., 1994).

Com relação às espécies avaliadas pelo sistema VITEK, 10,6% dos isolados de *C. albicans* e 27,3% dos isolados de *C. tropicalis* foram identificados de forma incompleta com baixos percentuais de probabilidade (<85%) e solicitação de provas suplementares (**anexo 1**). Na verdade, estas taxas contrastam com aquelas que têm sido relatadas para as espécies de importância clínica, pois a literatura tem informado percentuais menores do que 1% (EL-ZAATARI et al., 1990; FENN et al., 1994). Segundo Dooley et al. (1994), apesar de menos frequente, estudos que complementem o diagnóstico bioquímico automatizado podem ser necessários para estas espécies. *C. guilliermondii*, todavia, foi a espécie com a maior taxa de identificações incompletas (75%) (**anexo 1**). De acordo com o equipamento, *C. famata* (6 isolados) e *C. tropicalis* (3 isolados) foram as espécies que surgiram como outras possibilidades de identificação para *C. guilliermondii*. Sand & Rennie (2003) relataram que o equipamento VITEK também solicitou provas complementares para a diferenciação com *C. famata* em 30% dos isolados de *C. guilliermondii*. Outros estudos têm demonstrado, contudo, que o sistema VITEK é capaz de detectar 100% dos isolados de *C. guilliermondii* testados (DOOLEY et al., 1994; EL-ZAATARI et al., 1990) e que trocas de identificação parecem ocorrer em percentuais muito baixos nesta espécie (FENN et al., 1994).

Apesar de não ter sido observado problemas na identificação de *C. parapsilosis*, no caso de um isolado (LMC-262T), testes complementares foram solicitados para a confirmação e separação de *C. tropicalis* (**anexo 1**). Segundo Sand & Ronnie (2003), estas leveduras diferem em apenas um teste de assimilação (arabinose), gerando certa dificuldade de identificação em alguns isolados. Nesta avaliação, a única cepa isolada de *C. krusei* (LMC-287T) foi corretamente identificada em 48h de incubação, o que foi confirmado pelo seu crescimento característico em CHROMagar. El-Zaatari et al. (1990) também identificaram sem maiores problemas todos os isolados de *C. krusei*, após o mesmo período de tempo. Todavia, diversos autores têm informado dificuldades com esta espécie quanto à necessidade de provas complementares, identificações incorretas ou falhas na identificação (DOOLEY et al., 1994; FENN et al., 1994; PFALLER et al., 1988).

Relativamente aos isolados de *C. humicolus* (LMC-255T, LMC-290T) e *R. glutinis* (LMC-276T, LMC-317T), estes foram identificados de maneira incompleta, sendo solicitado pelo equipamento outras provas (**anexo 1**). Almeida et al. (2008) também relataram problemas na identificação automatizada pelo VITEK de leveduras do gênero *Rhodotorula* recuperadas de hemocultura. Segundo estes autores, há a

necessidade de provas de assimilação de nitrato para separar as duas principais espécies (*R. glutinis* e *R. mucilaginosa*). Claramente, este sistema apresenta limitações para identificar isolados com pouca frequência na clínica (EL-ZAATARI et al., 1990; FENN et al., 1994).

Efetivamente, percentuais mais elevados de identificação podem ser obtidos se testes suplementares e/ou novas incubações são procedidos, quando solicitados pelo *software* do equipamento, naquelas amostras que apresentam baixos rendimentos na identificação bioquímica (RIDDLE et al., 1994; SAND & RENNIE, 1999). Contudo, Fenn et al. (1994) consideraram a solicitação de tais provas como importantes limitações na capacidade de identificação das espécies. De acordo com Sand & Rennie (1999), nenhum método automatizado é totalmente auto-suficiente, por isso, segundo estes autores, é inevitável a solicitação de provas complementares. A necessidade de avaliações que complementem a identificação decorre do fato da base de dados bioquímica destes equipamentos ser restrita a algumas espécies de levedura (PFALLER et al., 1988). Normalmente, estas provas complementares são compostas por análises morfológicas e testes de assimilação e fermentação de carboidratos específicos (KURTZMAN & FELL, 1998).

Em verdade, todos os isolados estudados no presente trabalho foram também avaliados quanto a sua capacidade de produzir tubo germinativo, clamidósporos e comportamento em CHROMagar-*Candida*. Com relação aos isolados identificados de maneira incompleta, foram detectados por algumas das provas suplementares propostas apenas 5 cepas de *C. albicans* (LMC-272T, LMC-273T, LMC-274T, LMC-322T, LMC-348T) e 3 de *C. tropicalis* (LMC-279T, LMC-293T, LMC-356T) (**anexo 1**). Nenhum dos isolados, todavia, produziu tubo germinativo e/ou clamidósporos, incluindo aquelas de *C. albicans*. De acordo com Guelfand et al. (2003) e Sood et al. (2000), tubo germinativo e clamidósporo são de valor para confirmação de *C. albicans*, mas pouco efetivos para outras espécies de *Candida* ou mesmo para aquelas cepas de *C. albicans* que não são capazes de produzi-los. Do mesmo modo, o CHROMagar é efetivo apenas para certas espécies de *Candida* como *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (ODDS & BERNAERTS, 1994), não sendo de utilidade para as demais.

No presente trabalho, o CHROMagar-*Candida* apresentou efetividade na detecção das 5 cepas de *C. albicans* não produtoras de tubo germinativo e clamidósporo e das 3 cepas de *C. tropicalis* acima mencionadas. Fotedar & Al-Hedaithy (2003), estudando o comportamento de 10 cepas de *C. albicans* clamidósporo e tubo germinativo-negativas neste meio cromogênico, relataram, igualmente, que o

CHROMagar-*Candida* foi capaz de identificar de forma correta estas cepas atípicas, bem como diferenciar seus sorotipos. García-Martos et al. (1998) também confirmaram a boa resposta do meio CHROMagar na reidentificação de *C. tropicalis* obtidas de amostras clínicas. Estes achados reafirmam a adequabilidade do CHROMagar como prova complementar na identificação ou confirmação de isolados com biologia alterada ou bioquímica com um baixo grau de certeza.

De acordo com Freydiere et al. (2001), um sistema automatizado eficiente deve ter uma base de dados capaz de identificar as leveduras de interesse médico, deve ser capaz ainda de identificar estes isolados com acurácia e reprodutibilidade, não fornecendo identificações trocadas, deve também apresentar taxas de identificação >90% e não solicitar a realização de provas complementares que são, em geral, onerosas e laboriosas e, principalmente, deve ser rápido, de execução simples e de baixo custo. Na presente avaliação, quando se considera apenas aqueles isolados de maior importância clínica (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*), a taxa de identificação sobe de 78,8% (totalidade dos isolados) para 90,1% (**anexo 1**). Esse dado é relevante porque a correta identificação dos isolados tem se tornado essencial para um adequado manejo clínico de pacientes críticos, bem como para estudos epidemiológicos detalhados e prevenção e contenção de surtos de infecção hospitalar (WADLIN et al., 1999).

Por necessitar apenas de uma simples suspensão de leveduras como inóculo e um único cartão de identificação e apresentar ainda rápida leitura automatizada (24-48h.), além de ser seguro e evitar o erro humano na interpretação de resultados, de acordo com Oliveira et al. (2006), o sistema VITEK é adequado ao laboratório de microbiologia de hospitais terciários. No entanto, segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2007b), a automação para fungos está presente em apenas 22% dos laboratórios hospitalares no Brasil.

Em um estudo conduzido por Peterson & Noskin (2001), nos Estados Unidos, laboratórios de hospitais adequadamente equipados para o controle da infecção hospitalar podem reduzir os custos com essas infecções em cerca de US\$2.000.000/ano e evitar em torno de 285 novos casos/ano. Modelos organizacionais mais modernos e eficientes têm surgido nos laboratórios de microbiologia hospitalar em decorrência da dramática mudança na epidemiologia dos pacientes hospitalizados e na abordagem clínica e terapêutica das doenças infecciosas, impondo, de maneira imperativa, a necessidade de maior financiamento destas instituições (CANTÓN, 2005). Neste sentido, a verba oficial para a melhoria do nível tecnológico e reaparelhamento

dos laboratórios hospitalares foi estimado por Peterson & Noskin (2001), tendo em conta a realidade Norte Americana, em cerca de U\$300.000-US\$500.000/ano. No Brasil, não há verba destinada, especificamente, ao controle de infecção hospitalar (SANTOS et al., 2005). Contudo, os recursos para o financiamento global das ações e serviços públicos em saúde são garantidos pela Emenda Constitucional (EC) no. 29/2000 (BRASIL, 2000b) que atualmente depende da aprovação do Projeto de Lei Complementar (PLC) no. 306/2008, ainda em tramitação no Congresso Nacional, para sua regulamentação. Segundo este PLC, os investimentos públicos com ações em serviços de saúde, incluindo vigilância sanitária e controle de infecções, treinamento de pessoal e aquisição de equipamentos, passarão a ser, na esfera federal, de 1,85% do Produto Interno Bruto (PIB) e, nas esferas estadual e municipal, de 12% e 15% da receita bruta, respectivamente (BRASIL, 2008).

A habilidade de identificar acuradamente microrganismos hospitalares é fundamental para qualquer sistema de vigilância em saúde, pois as informações geradas nos laboratórios de microbiologia condicionam as ações de controle, bem como influenciam as políticas e diretrizes dos programas institucionais e governamentais (ROSENTHAL et al., 2008a, 2008b). Assim, não há dúvidas de que a consolidação dos laboratórios de microbiologia nos programas de prevenção de infecção hospitalar passa tanto pela otimização das técnicas convencionais, quanto pela aquisição de novas metodologias de diagnóstico (CANTÓN, 2005). Classicamente, diversos métodos não-culturais têm sido propostos, não apenas para fins de diagnóstico como também para estudos de epidemiologia (YEO & WONG, 2002). No âmbito hospitalar, a biologia molecular tem se mostrado útil para estes 2 objetivos, contribuindo para uma maior rapidez na definição das etiologias, bem como para o entendimento dos mecanismos envolvidos na ocorrência de surtos (FOXMAN & RILEY, 2001; PFALLER, 2000b). No entanto, de acordo com Colombo et al. (2008), a maioria dos laboratórios de microbiologia hospitalar na América Latina não é capaz de realizar técnicas moleculares na rotina de seus serviços. O Inquérito Nacional de Laboratórios de Hospitais (BRASIL, 2007a, 2007b) do Ministério da Saúde, inclusive, é omissivo quanto à realização de procedimentos moleculares nos laboratórios de microbiologia dos 464 hospitais estudados no Brasil. Segundo Nolte (2006), custo, complexidade metodológica e ausência de padronização explicam a baixa adesão dos laboratórios às metodologias com DNA.

Apesar dos testes tradicionais serem mais difundidos nos laboratórios de hospitais (BRASIL, 2007a, 2007b), a detecção, diferenciação e identificação de

microrganismos pode se apresentar ambígua (SETTANNI & CORSETTI, 2007). Nesta situação, provas moleculares representam uma alternativa válida, pois além de aumentarem a sensibilidade e especificidade no processo de identificação, reduzem a subjetividade inerente aos métodos morfológicos e bioquímicos (ROSSELLÓ-MORA & AMANN, 2001). Em decorrência disso, a amplificação de sequências gênicas fúngicas para o diagnóstico de infecções invasivas tem apresentado, conceitualmente, grande apelo (MCLINTOCK & JONES, 2004). Muitos protocolos para reações em cadeia da polimerase (PCR) têm sido desenvolvidos, utilizando diferentes métodos de extração, sítios de amplificação e formas de detecção de amplicons (CHEN et al., 2001). Esses protocolos têm sido aplicados tanto ao microrganismo previamente isolado em cultura quanto à amostra clínica para a detecção direta do patógeno em sangue, líquido, urina e biópsia, o que evita a realização de cultivos em meios de isolamento e determina menor tempo de retenção de diagnóstico (PUTIGNANI et al., 2008; VOLLMER et al., 2008). Quando validada para uma determinada espécie de microrganismo, a técnica de identificação por PCR é considerada uma metodologia extremamente confiável (SETTANNI et al., 2005; WHITE et al., 2005). A PCR tem sido a principal ferramenta molecular empregada na detecção de DNA de leveduras de interesse médico (DASSANAYAKE & SAMARANAYAKE, 2003).

Dentre os diversos protocolos de PCR disponíveis, a *multiplex*-PCR tem sido amplamente descrita e seus parâmetros criteriosamente avaliados (EDWARDS & GIBBS, 1994; HENEGARIU et al., 1997; MARKOULATOS et al., 2002). Esta variante da PCR tem como maior vantagem a possibilidade de amplificação simultânea de diferentes sequências alvo com mais de um par de *primers* em um único tubo de reação (LIGUORI et al., 2009), o que permite identificar um grande número de espécies de fungos (FUJITA et al., 2001). De acordo com Li et al. (2003), a *multiplex*-PCR fúngica é capaz de indicar acuradamente um patógeno particular entre outros ou distinguir espécies ou cepas de um mesmo gênero, levando a uma considerável economia de tempo e trabalho. Na prática, esta economia de tempo tem forte impacto na clínica e epidemiologia das infecções invasivas, pois existe estreita correlação entre a administração precoce de terapia antifúngica e o percentual de sobrevivência de pacientes sob tratamento. Uma janela de 24h entre o início da candidemia e o estabelecimento da terapia específica pode aumentar as taxas de mortalidade em até 20% (GAREY et al., 2006; MORRELL et al., 2005). Consequentemente são necessários esforços no sentido de se obter um pronto diagnóstico quando estão

envolvidos pacientes que apresentam um alto risco para o desenvolvimento de candidíases disseminadas (PFALLER & DIEKEMA, 2007).

Vários autores têm relatado os resultados da utilização da *multiplex*-PCR na identificação de *Candida* spp. e de outros agentes de origem fúngica de espécimens clínicos. Fujita et al. (2001) reportaram a efetividade da *multiplex*-PCR ao detectarem leveduras recuperadas de candidemias que tinham sido incorretamente identificadas ou mesmo não indentificadas pelos testes fenotípicos tradicionais. A adequada detecção por esta PCR de 475 cepas de *Candida* spp. recuperadas de hemocultura foi também informada por Chang et al. (2001) e Li et al. (2003). De acordo com Carvalho et al. (2007a), a *multiplex*-PCR é capaz de discriminar com grande exatidão diferentes espécies de *Candida* presentes em amostras polifúngicas. No Brasil, Back-Brito et al. (2009) confirmaram a utilidade da *multiplex*-PCR na identificação de espécies de *Candida*, inclusive *C. dubliniensis*, isoladas de rinsados orais de 45 pacientes HIV+. Em dois outros estudos conduzidos no Brasil, Leal et al. (2008) e Lugarini et al. (2008) demonstraram que a diferenciação de isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans* e suas variedades (*grubii* e *neoformans*) e *C. gatti* pode ser feita eficientemente com o uso da técnica de *multiplex*-PCR. Em um terceiro estudo brasileiro, sorotipos, *mating types* e espécies de *Cryptococcus* isoladas de amostras ambientais foram também adequadamente determinados pela *multiplex*-PCR (CARVALHO et al., 2007b).

Diante da experiência publicada por diferentes autores na detecção de *Candida* spp. com o emprego desta PCR e sua potencial aplicação em laboratórios de microbiologia hospitalar e/ou de saúde pública, bem como em decorrência da escassez de trabalhos nacionais que incluam pacientes hospitalizados com candidíase invasiva, já que, até o momento, apenas o trabalho de Back-Brito et al. (2009) relata o uso de *multiplex*-PCR para a detecção de leveduras do gênero *Candida* recuperadas de estomatites em pacientes imunocoprometidos, optamos por utilizar esta metodologia de PCR na presente investigação, tendo como base os estudos de Carvalho et al. (2007a).

Neste estudo, para a extração do material genômico e posterior amplificação pela *multiplex*-PCR, foi utilizado o reagente comercial DNAzol, que é pronto para uso, conforme recomendação do fabricante. Indubitavelmente, o isolamento e purificação de DNA é uma etapa chave para a maioria dos estudos em biologia molecular e todas as técnicas de DNA recombinante. Muitos protocolos de isolamento estão disponíveis, no entanto, frequentemente, estes envolvem múltiplos passos, consomem muito tempo e ensejam a manipulação de substâncias tóxicas (ATKINS & CLARK, 2004).

Com relação ao DNAzol, o protocolo é simples, rápido e permite o isolamento do DNA genômico de amostras que estejam, inclusive, em pequenos volumes. Tecnicamente, o tiocianato de guanidina presente neste reagente hidroliza o RNA e permite a precipitação seletiva do DNA da célula lisada (CHOMCZYNSKI et al., 1997). No presente estudo, o DNAzol utilizado na extração de DNA dos isolados clínicos de levedura permitiu obter rapidamente, em cerca de 30 minutos, quantidades suficientes de material genômico para amplificar por *multiplex*-PCR padrões de bandas específicos, o que possibilitou a identificação das espécies de *Candida* (**figura 3**). Este resultado tem sido corroborado por outros autores que também empregaram o protocolo com DNAzol ou com seu princípio metodológico para a extração de material genômico de célula fúngica eucarionte (CZEMBOR & ARSENIUK, 1999; GUO et al., 2005; SANDHU et al., 1995).

A seleção de *primers* é, provavelmente, o parâmetro mais crítico para o sucesso da *multiplex*-PCR. O desenho dos *primers* tem influência na especificidade e eficiência de amplificação, principalmente, em relação a propriedades que são específicas para cada sistema, tais como: composição de bases (%G+C), comprimento, modificações químicas sofridas e pureza (POWER, 1996). Nesta investigação, foi utilizado combinadamente os *primers* levedura-específicos *UNI1* e *UNI2* descritos por Trost et al. (2004) e os *primers* espécies-específicos *Calb*, *Cgla*, *Ckru*, *Ctro*, *Cpar*, *Cgui*, *Clus* e *Cdub* descritos por Carvalho et al. (2007a) que amplificam as regiões ITS1 e ITS2 da maioria das *Candida* de importância médica. As diferenças na sequência destas regiões têm mostrado ser de grande valor na identificação de fungos potencialmente patogênicos (CHEN et al., 2000, 2001; Nagao et al., 2005). Segundo Leaw et al. (2006), taxas de correta identificação são da ordem de 96,8% para a região ITS1 e 99,7% para a região ITS2. Nesta *multiplex*-PCR, objetivamente, os *primers* espécie-específicos formam pares com o *primer* *UNI2*, com exceção do *primer* *Clus*, que forma par com o *primer* *UNI1* (CARVALHO et al., 2007a). A estratégia de *primers* proposta nesta técnica possibilita a redução de tempo desde que a detecção e a identificação do agente é efetuada em uma única etapa de amplificação, diferindo das demais PCR.

Na presente investigação, foi possível distinguir corretamente todas as espécies de *Candida* avaliadas e seus resultados foram concordantes (100%) com aqueles do tubo germinativo e clamidósporo para *C. albicans*, CHROMagar para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* e VITEK para todas as espécies de *Candida* (**anexo 1**). Resultados variáveis foram encontrados apenas para *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis*, que apresentaram sensibilidade entre 75,7%-100% e especificidade entre

69,3%-77,7% (**anexo 1**), quando a identificação molecular foi confrontada com CHROMagar. Diferentemente destes achados, Liguore et al. (2009), trabalhando com isolados clínicos de *Candida*, relataram importantes discrepâncias nos resultados da identificação molecular por *multiplex*-PCR, bioquímica pelo VITEK e cromogênica pelo CHROMagar. De acordo com Leal et al. (2008) e Lugarini et al. (2008), a *multiplex*-PCR apresentou 100% de concordância com a sorotipagem e foi mais acurada do que a prova da canavanina-glicina azul de bromotimol (CGB) na identificação de isolados de *Cryptococcus*. Na presente avaliação, a *multiplex*-PCR proposta mostrou-se específica, não amplificando o DNA dos demais isolados fúngicos não-*Candida*, como *C. humicolus*, *R. glutinis* e *Trichosporon* sp. Entretanto, segundo Pincus et al. (2007), a sensibilidade e a especificidade são críticas e comumente se apresentam variáveis. Em verdade, a sensibilidade e a especificidade da *multiplex*-PCR estão fortemente condicionadas à correta padronização e validação desta metodologia (EDWARDS & GIBBS, 1994; HENEGARIU et al., 1997; MARKOULATOS et al., 2002).

Segundo Settanni & Corsetti (2007), o impacto da *multiplex*-PCR na rotina dos laboratórios de microbiologia hospitalar não está somente associada à sua facilidade de execução e a notória economia de tempo, mas também à capacidade de confronto com as pressões a que os laboratórios hospitalares estão, normalmente, submetidos. Tais pressões estão relacionadas ao aumento do número de amostras, principalmente, para propósitos de controle de infecção hospitalar, necessidade de pronto reportamento de dados e resultados aos sistemas de notificação compulsória de agravos e orçamentos públicos e privados, frequentemente, reduzidos ou descontinuados (PETRICH et al., 2001). A habilidade dos laboratórios de microbiologia em detectar e identificar acurada e rapidamente os patógenos hospitalares pode ser prejudicada por estas dificuldades conjunturais, o que pode determinar ações equivocadas de contenção (PAGE et al., 2002). Assim, de acordo com Petrich et al. (2001), programas de vigilância em saúde que, em geral, são de complexa operacionalização, demandam grandes recursos e têm como base o diagnóstico microbiológico, são um dos principais beneficiados com o estabelecimento desta PCR.

O laboratório de microbiologia hospitalar é a primeira linha de defesa frente à disseminação de agentes nosocomias. Além da correta identificação microbiana, é papel dos laboratórios detectarem a resistência aos antimicrobianos de uso clínico (EMORI & GAYNES, 1993; PFALLER & DIEKEMA, 2002). Com a emergência das candidíases invasivas em pacientes imunocomprometidos, tem havido um crescente

interesse pelos antifúngicos, bem como pelos métodos laboratoriais de detecção da susceptibilidade que, indubitavelmente, auxiliam na escolha da melhor droga a ser empregada e/ou na análise de eventuais fracassos terapêuticos (RODERO et al., 2006).

Diversas drogas de uso clínico estão atualmente disponíveis (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006; LUMBRERAS et al., 2003, POLAK, 2003) e muitas outras em fase de desenvolvimento (KRCMERY & KALAVSKY, 2007; TING & WALKER, 2008). No entanto, classicamente, fluconazol, itraconazol e anfotericina B têm sido as drogas mais utilizadas no tratamento das infecções fúngicas invasivas (BOOGAERTS & MAERTENS, 2001; HEALY & BAKER, 2009; MOEN et al., 2009). Com o uso indiscriminado de antifúngicos, cepas resistentes ou com baixa susceptibilidade surgiram principalmente entre as espécies do gênero *Candida* (BRION et al., 2007; KANAFANI & PERFECT, 2008, PEREA & PATTERSON, 2002). Em decorrência deste fato, organizações internacionais como *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, EUA) e *European Committee on antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, CE) têm buscado a padronização dos testes de susceptibilidade (CLSI, 2008a, 2008b; EUCAST, 2008a, 2008b) e a incidência de resistência tem sido investigada (COLOMBO et al. 2008).

No Brasil, a magnitude do problema da resistência não é completamente conhecida, mas diversos pesquisadores brasileiros têm evidenciado o grande impacto das infecções causadas por germes resistentes no sistema hospitalar (BRASIL, 2006b). Em função disto, um consórcio entre Ministério da Saúde, ANVISA e OPAS foi criado para o desenvolvimento do *Projeto de Monitoramento e Prevenção da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde* que tem como objetivo aumentar a efetividade da assistência à saúde por meio do uso racional de antimicrobianos e detecção, prevenção e controle da emergência e disseminação da resistência microbiana em instituições hospitalares no país, além da implantação da *Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde* (Rede RM) (BRASIL, 2006a).

Em seu relatório publicado em 2006, a Rede RM informou que, durante o período de julho a novembro do referido ano, foi notificada por 55 hospitais participantes sobre o isolamento e o perfil de susceptibilidade de 606 patógenos considerados prioritários (BRASIL, 2007c). Dentre estes patógenos, somente 22 (3,6%) eram de origem fúngica e pertenciam ao gênero *Candida*. Em outro projeto, o *Inquérito Nacional dos Laboratórios de Microbiologia de Hospitais com 10 ou mais Leitos de UTI*

e *Hospitais Sentinelas*, realizado pelo Ministério da Saúde e ANVISA, apenas 41 (8,8%) laboratórios hospitalares dos 464 investigados faziam teste de susceptibilidade para *Candida* spp. (BRASIL, 2007b). Com base nestes informes, a ampliação do estudo do perfil de susceptibilidade às drogas antifúngicas de uso sistêmico, bem como a avaliação metodológica dos testes disponíveis é também, claramente, de importância sanitária.

De acordo com Nucci & Colombo (2002) e Rex et al. (2001), resistência é um conceito derivado de um fenômeno *in vitro* que, teoricamente, está associado com falhas terapêuticas (preditor de fracasso), enquanto que susceptibilidade tende mais a indicar eficácia (preditor de sucesso). Em micologia, isto não é necessariamente verdade, pois além da resistência microbiológica, pode existir ainda uma resistência clínica que é influenciada por uma série de fatores, entre eles, o *status* imunológico dos hospedeiros, infecção em sítios não-vascularizados (abscessos, cateteres, próteses), pobre absorção e rápida metabolização e eliminação da droga antifúngica (NUCCI & COLOMBO, 2002). Apesar deste contexto, os testes de susceptibilidade poderão ser úteis em medicina e saúde pública, se seus resultados puderem ser efetivamente correlacionados com a clínica (REX et al., 2001) ou consolidados em estudos epidemiológicos (PFALLER & DIEKEMA, 2002).

Atualmente, além dos métodos de referência publicados pelo CLSI e EUCAST, alguns sistemas comerciais têm sido desenvolvidos e estão acessíveis aos laboratórios assistenciais. Contudo, importantes limitações relacionadas a problemas de reprodutibilidade e capacidade de detectar cepas resistentes com acurácia estão presentes (ARIKAN, 2007). No Brasil, segundo o documento *Análise do Inquérito Nacional sobre Infra-estrutura, Recursos Humanos, Equipamentos, Procedimentos, Controle de Qualidade e Biossegurança nos Laboratórios de Microbiologia* do Ministério da Saúde (BRASIL, 2007a), os métodos empregados para a determinação das CIM nos laboratórios hospitalares que realizavam testes de susceptibilidade para antifúngicos são: automação (41,7%), microdiluição em caldo do CLSI (33,3%) e sistema comercial ETEST (25%). Interessante notar que, mesmo sendo uma metodologia simples e de menor custo, a utilização da técnica de difusão em ágar do CLSI não foi mencionada no referido documento.

No presente estudo, foi investigada a susceptibilidade dos isolados clínicos de *Candida* frente aos três antifúngicos (fluconazol, itraconazol e anfotericina B) disponíveis nas farmácias dos hospitais da rede pública de saúde (RENAME, 2007e), empregando a metodologia de microdiluição em caldo descrita nos documentos M27-

A2 do CLSI (CLSI, 2002b) e E.Dis. 7.1 do EUCAST (EUCAST, 2002) e a metodologia de difusão em ágar descrita no documento M44-A do CLSI (CLSI, 2004) e na bula do método comercial CECOM.

Apesar de certa dificuldade de execução, o desenvolvimento da metodologia de microdiluição em caldo e a definição dos pontos de corte para fluconazol e itraconazol pelo CLSI permitiram a ampliação do uso clínico dos testes de susceptibilidade e tornaram essas provas uma importante ferramenta de avaliação epidemiológica em programas de vigilância em saúde (HOSPENTHAL et al., 2004; DIEKEMA & PFALLER, 2002). Em decorrência disto, diversos estudos têm investigado o desempenho da microdiluição em caldo publicada no documento M27-A2 como instrumento de apoio clínico e sanitário (LAGROU et al., 2007; NAKAMURA & TAKAHASHI, 2006; MESSER et al., 2006; RODERO et al. 2005; ST-GERMAIN et al., 2008). Neste trabalho, utilizando esta metodologia, foi possível observar que a quase totalidade dos isolados era susceptível às drogas ensaiadas (**tabela 4**). Para estes isolados, CIM₅₀ e CIM₉₀ foram, respectivamente, em relação ao fluconazol: 0,5µg/mL e 1,0µg/mL, itraconazol: 0,06µg/mL e 0,12µg/mL e anfotericina B: 0,25µg/mL e 0,5µg/mL. A variação dos valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ para os derivados azólicos avaliados nesta casuística foi menor do que aquela reportada em estudos multicêntricos internacionais (PFALLER et al., 1999, 2001), bem como em estudos nacionais (COLOMBO et al., 2006; MATTA et al., 2007), caracterizando a alta susceptibilidade destes isolados a estas drogas.

Levando em conta apenas o fluconazol, que é a droga de primeira linha no tratamento de candidíases invasivas, e considerando, separadamente, os isolados clínicos de *Candida*, *C. guilliermondii* foi a espécie que apresentou os maiores valores de CIM₅₀ (1,0µg/mL) e CIM₉₀ (2,0µg/mL) (**tabela 5**). Kennedy et al. (2006) também relataram que, dentre os isolados de *Candida* estudados, *C. guilliermondii* apresentou as maiores variações de CIM. Em casuística brasileira, Colombo et al. (2007) informaram que *C. guilliermondii* foi, do mesmo modo, a espécie de levedura com um dos valores de CIM mais elevados. De acordo com Saitoh et al. (2008), *C. guilliermondii* pode se apresentar refratária à terapia profilática com fluconazol. Associada a taxas de isolamento de até 30,4%, esta levedura pode se tornar, potencialmente, um patógeno de difícil manejo (CHAKRABARTI et al., 2009).

Relativamente a *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, estas espécies apresentaram iguais valores de CIM₅₀ (0,5µg/mL) e CIM₉₀ (1,0µg/mL) (**tabela 5**). Tais resultados são semelhantes aos encontrados por Mekkadas et al. (2007). Em estudos conduzidos no Brasil, por Colombo et al. (2006) e Matta et al. (2007), *C. albicans* e *C.*

tropicalis apresentaram valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ compatíveis com os reportados nesta investigação, mas *C. parapsilosis* apresentou valores, claramente, superiores. A susceptibilidade destas espécies ao fluconazol, na verdade, tem se mantida estável, sendo infrequente o relato de resistência (PFALLER & DIEKEMA, 2007), o que confirma os achados do presente estudo. *C. lambica* (LMC-325T) foi o único isolado desta série susceptível dose-dependente (CIM = 16µg/mL) (**tabela 5**). Pfaller et al. (2004a) têm relatado menor atividade do fluconazol frente às cepas clínicas de *C. lambica*. Nesta casuística, resistência foi encontrada apenas em *C. krusei* (LMC-287T) (CIM = 64 µg/mL) (**tabela 5**). Valores de CIM elevados para esta levedura têm sido amplamente reportados (MESSER et al., 2006). Como *C. krusei* é considerada intrinsecamente resistente ao fluconazol (PFALLER et al., 2001), o fenômeno da resistência é um evento esperado. Hautala et al. (2009), no entanto, relataram a manutenção de níveis elevados de susceptibilidade ao fluconazol para esta espécie, a despeito de quimioterapia antifúngica prolongada.

Até recentemente, o papel do itraconazol no tratamento das infecções por *Candida* spp. em pacientes imunocomprometidos era controverso (MAERTENS & BOOGAERTS, 2005). Em decorrência do espectro de ação mais amplo do que aquele do fluconazol e de ser menos tóxico do que a anfotericina B, seu emprego oral profilático e parenteral terapêutico tem sido recomendado em indivíduos neutropênicos (GAFTER-GVILI et al., 2008; MONDAL et al., 2004; PANDYA et al., 2003). Todavia, dados associados à correlação *in vitro-in vivo* ainda são escassos (MAERTENS & BOOGAERTS, 2005). Nesta avaliação, a aplicação da metodologia descrita no documento M27-A2 permitiu verificar a ausência de resistência e que 3,4% dos isolados clínicos eram susceptíveis dose-dependente (**tabela 4**). Percentual semelhante de cepas susceptíveis dose-dependente foram também relatados por Lagrou et al. (2007). Entretanto, Messer et al. (2006) encontraram taxas bem mais elevadas (28,9%) de susceptibilidade dose-dependente para este antifúngico. Variações na distribuição das espécies podem explicar as diferenças de susceptibilidade (PFALLER & DIEKEMA, 2007). Os intervalos dos valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ foram, respectivamente, para *C. albicans*: 0,06µg/mL e 0,12µg/mL, *C. parapsilosis*: 0,03µg/mL e 0,12µg/mL, *C. guilliermondii*: 0,06µg/mL e 0,25µg/mL, *C. glabrata*: 0,12µg/mL e 0,25µg/mL (**tabela 6**). Estes valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ confirmam a grande susceptibilidade dos isolados ao itraconazol. Estudos multicêntricos conduzidos por Colombo et al. (2006), Messer et al. (2006) e Rodero et al. (2005) corroboram estes dados. Todavia, *C. glabrata* e *C. guilliermondii* têm se caracterizado

por uma reduzida susceptibilidade aos derivados azólicos, incluindo o itraconazol (COLOMBO et al., 2007; QUINDÓS et al., 1999). Samra et al. (2005) informaram que cepas que desenvolvem resistência a antifúngicos azoles, em geral, desenvolvem resistência cruzada a outras drogas da mesma classe. Na presente casuística, praticamente não houve resistência, contudo, foi possível observar que CIM mais elevadas de fluconazol estavam, em sua maioria, associadas com CIM mais elevadas de itraconazol (**tabelas 8 e 9**). Laet Sant'Ana et al. (2002) também informaram relação semelhante.

Os pontos de corte propostos tanto para o fluconazol quanto para o itraconazol nas diretrizes interpretativas do teste de sensibilidade para *Candida* spp. do CLSI (**anexo 3**) foram definidos com base nos resultados obtidos em estudos clínicos que avaliaram a resposta de pacientes com aids à terapia das candidíases orofaríngeas com o uso destes dois antifúngicos (CLSI, 2002b). Para a anfotericina B, no entanto, não há definições seguras quanto aos pontos de corte, bem como não há ainda suficiente coerência interna dos resultados de CIM obtidos com a metodologia do CLSI. Em decorrência das dificuldades técnicas, este método de referência tem limitada habilidade para identificar isolados clínicos de *Candida* resistentes à anfotericina B (REX et al., 1995). A interferência do *status* imunológico na correlação *in vitro-in vivo* (ARIKAN, 2007) é outro fator que se soma às dificuldades metodológicas.

Na presente casuística, apesar de todos os isolados terem sido considerados susceptíveis a anfotericina B (**tabela 4**), 01 cepa de *C. guilliermondii* (LMC-306T), 02 cepas de *C. parapsilosis* (LMC-257T, LMC-264T), 01 cepa de *C. tropicalis* (LMC-268T) apresentaram CIM de 1,0µg/mL (**tabelas 7 e 10**). Não obstante a falta de valores de corte, segundo Nolte et al. (1997), CIM $\geq 1,0\mu\text{g/mL}$ indicariam cepas de *Candida* resistentes. No entanto, Pfaller et al. (1994) consideram que CIM $\geq 2,0\mu\text{g/mL}$ seriam mais adequadas para detectar resistência à anfotericina B. Conforme Espinel-Ingroff (2008), resistência clínica tem sido mais relacionada à CIM $\geq 2,0\mu\text{g/mL}$ do que à CIM $\geq 1,0\mu\text{g/mL}$. Na prática, contudo, nenhum desses valores de *cutoff* deve ser tratado como pontos de corte definitivamente estabelecidos (REX et al., 2001). Os resultados dos testes de susceptibilidade relatados neste trabalho indicam, como já mencionado, que a maioria dos isolados apresentou variação de valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ entre 0,25µg/mL e 0,5µg/mL (**tabela 7**), demonstrando, claramente, grande susceptibilidade a este poliênico. Em outros estudos nacionais e internacionais, esta variação de CIM tem sido maior (COLOMBO et al., 2006, 2007; MESSER et al., 2006; RODERO et al., 2005). Entretanto, de acordo com Espinel-Ingroff (2008), são esporádicos os relatos de

cepas resistentes ou que apresentam valores de CIM muito elevados para anfotericina B e, em geral, os isolados clínicos envolvidos são espécies pouco frequentes (PFALLER & DIEKEMA, 2007).

Nesta investigação, empregando EUCAST, os isolados de *Candida* se mostraram, igualmente, susceptíveis aos antifúngicos testados (**tabela 4**). As CIM₅₀ e CIM₉₀ foram, respectivamente, 0,5µg/mL e 2,0µg/mL para o fluconazol, 0,03µg/mL e 0,12µg/mL para o itraconazol e 0,25µg/mL e 0,5µg/mL para a anfotericina B. Estes achados são concordantes com aqueles relatados por Cuenca-Estrella et al. (2002) e Arcaya et al. (2006) para a Europa e América do Sul e demonstram, igualmente, a franca susceptibilidade às drogas avaliadas. Em estudo conduzido no Brasil por Claudino et al. (2008), utilizando EUCAST, as variações de CIM₅₀ e CIM₉₀ encontradas para a anfotericina B e fluconazol foram inferiores ao observado neste trabalho. No entanto, para fluconazol e itraconazol, os resultados reportados por Espinel-Ingroff et al. (2005), em estudo multicêntrico internacional, também empregando EUCAST, apresentaram CIM₅₀ e CIM₉₀, claramente, mais elevadas. Diferenças na susceptibilidade de base dos isolados parecem condicionar estas variações (CUENCA-ESTRELLA & RODRÍGUEZ-TUDELA, 2001).

Como visto na casuística do CLSI, *C. guilliermondii* foi a espécie que apresentou as maiores variações de CIM₅₀ e CIM₉₀ (0,5µg/mL e 4,0µg/mL, respectivamente) para fluconazol (**tabela 5**). Em estudos de Cuenca-Estrella et al. (2006) e Espinel-Ingroff et al. (2005), esta levedura apresentou também as maiores variações de CIM com EUCAST, reafirmando certa tendência à diminuição de susceptibilidade. Para *C. glabrata* e *C. lambica*, uma CIM mais elevada (16µg/mL) foi observada para fluconazol (**tabelas 5 e 8**). Este dado é consistente com a literatura que tem informado uma menor susceptibilidade destas espécies ao fluconazol (CUENCA-ESTRELLA et al. 2002a, 2002b).

Com relação a *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, o valor de CIM₉₀ encontrado para estas espécies foi de 1,0µg/mL (**tabela 5**). Baixos valores de CIM₉₀ foram também observados por Arcaya et al. (2006) e Cuenca-Estrella et al. (2006) para estas mesmas espécies com o uso de EUCAST, o que confirma os relatos de susceptibilidade apresentados nesta investigação. Contudo, cepas resistentes, mostrando valores de CIM₉₀ de $\geq 64\mu\text{g/mL}$, foram reportados por Espinel-Ingroff et al. (2005) em uma série americana e europeia e por Matsumoto et al. (2007) em um estudo brasileiro.

A utilização dos pontos de corte mais estritos do EUCAST (EUCAST, 2007). determinou diferenças na susceptibilidade ao fluconazol (**tabela 4**), o que tornou esta metodologia mais discriminativa. Por estes, 2,6% de todos os isolados seriam resistentes a este azólico, já que o limite entre susceptibilidade e resistência passou a ser a concentração de 4µg/mL (**anexo 4**). Considerando a proposta do EUCAST para *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* frente ao fluconazol, 2 isolados de *C. albicans* (LMC-361T, LMC-362T) passaram a ser resistentes por exibirem concentrações $\geq 8\mu\text{g/mL}$ e 1 isolado de *C. tropicalis* (LMC-357T) passou a ser susceptível dependente de dose/ intermediário por apresentar uma concentração de 4µg/mL (**tabela 8**). O impacto destas mudanças tem sido pouco avaliado (CLAUDINO et al., 2008; DIMOPOULOS et al., 2009).

Com relação ao itraconazol, *C. albicans* e *C. parapsilosis* apresentaram as menores variações de CIM₅₀ e CIM₉₀ (0,03µg/mL e 0,12µg/mL, respectivamente), empregando o documento E.DIS.7.1 (**tabela 6**). Dados semelhantes foram reportados por Arcaya et al. (2006) na Venezuela. Em casuística Argentina, esses valores se mostraram um pouco mais elevados (CUENCA-ESTRELLA et al., 2002b). No entanto, o relato de resistência ao itraconazol ou CIM elevadas é menos frequente para estas espécies (FIGUEIREDO et al., 2007; MATSUMOTO et al. 2007; RODERO et al., 2005). *C. tropicalis* também se apresentou susceptível ao itraconazol, quando avaliada por EUCAST, exibindo valores de CIM₅₀ e CIM₉₀, respectivamente, de 0,06µg/mL e 0,12µg/mL (**tabela 6**). Comparativamente a outros estudos multicêntricos, que também empregaram esta metodologia, a maioria dos isolados apresentou valores de CIM₉₀ mais elevados, demonstrando para este derivado azólico uma susceptibilidade menor do que a informada neste trabalho (CUENCA-ESTRELLA et al., 2002b; ESPINEL-INGROFF et al., 2005; MATSUMOTO et al. 2007; RODERO et al., 2005). A CIM₉₀ para *C. glabrata* e *C. famata* (**tabela 6**) também apresentou valores mais elevados, o que é concordante com a literatura internacional (CUENCA-ESTRELLA et al., 2002b, 2006; ESPINEL-INGROFF et al., 2005). Entretanto, Matsumoto et al. (2007), em investigação conduzida no Brasil, encontram valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ extremamente baixas.

No presente estudo, todos os isolados clínicos de *Candida* avaliados pela metodologia do EUCAST também exibiram CIM com valores $\leq 1,0\mu\text{g/mL}$ frente à anfotericina B (**tabelas 7 e 10**). As cepas com CIM de 1,0µg/mL foram *C. parapsilosis* (LMC-264T, LMC-284T), *C. tropicalis* (LMC-268T, LMC-357T) e *C. lambica* (LMC-325T). Este valor de CIM foi maior do que aqueles informados por Cuenca-Estrella et al. (2002b, 2006) em estudos multicêntricos de susceptibilidade. À semelhança do

CLSI, o método do EUCAST tem demonstrado limitada capacidade de detecção de cepas resistentes à anfotericina B (COLOMBO et al., 2008).

Uma metodologia de fácil realização e custo mais reduzido, comparativamente aos métodos de microdiluição em caldo, é descrita no documento M44-A. Por ser uma variação da técnica de difusão em ágar empregada em bacteriologia (BAUER et al., 1966), seus insumos estão normalmente disponíveis nos laboratórios de microbiologia hospitalar e, por isto, em geral, os profissionais estão familiarizados com sua execução. Este método foi validado apenas para isolados de *Candida* frente ao fluconazol e voriconazol (CLSI, 2004), classificando-os em susceptíveis, susceptíveis dependente de dose e resistentes (**anexo 4**). Entretanto, esta metodologia não permite estimar com precisão os valores de CIM. De acordo com Pfaller & DIEKEMA (2007), o método de difusão em ágar pode ser útil na seleção de terapias mais eficazes, não-tóxicas e menos custosas. Sua efetividade na confirmação da susceptibilidade ou na detecção de resistência ao fluconazol tem sido verificada em diversos estudos multicêntricos internacionais (PFALLER et al. 2000, 2005b, 2007). Como já referido, no Brasil, é escassa a literatura sobre o uso dessa metodologia nos laboratórios de microbiologia hospitalar (COLOMBO et al. 2002; SONI et al. 1999).

Neste trabalho, empregando esta metodologia de difusão em ágar, foi demonstrado o baixo percentual de resistência (2,6%) ao fluconazol (**tabela 11**), o que é compatível com o que tem sido relatado por outros autores (PFALLER et al. 2004a; TESTORE et al. 2004) e o observado na presente casuística de microdiluição em caldo. No gênero *Candida*, *C. krusei* (LMC-287T) foi o único isolado resistente (**tabela 12**). Entretanto, a resistência em *C. krusei* é um achado comum (COMERT et al. 2006). *R. glutinis* foi a outra espécie cuja resistência foi detectada por esta técnica. De acordo com Gómez-López et al. (2005), fluconazol é inefetivo *in vitro* para a maioria dos isolados de *Rhodotorula* spp. Susceptibilidade dependente de dose foi encontrada em *C. albicans* (2,1%) e *C. tropicalis* (9,1%) (**tabela 12**). Empregando esta metodologia, Pfaller et al. (2005a, 2007) também reportaram taxas semelhantes em estudos globais que incluíram a América Latina. Para *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *C. lambica*, o fluconazol foi 100% efetivo (**tabela 12**). Todavia, resistência adquirida em isolados de *C. glabrata* tem sido frequentemente relatada (COLOMBO et al. 2006; MATTA et al. 2007; PFALLER et al. 2004b). De acordo com Pfaller & Diekema (2007) o uso desta técnica como um método de triagem e vigilância em saúde é adequado e fortemente recomendado em laboratórios de microbiologia hospitalar.

Relativamente ao itraconazol e anfotericina B, a baixa reprodutibilidade de resultados e a limitação do poder preditivo positivo na identificação de cepas resistentes permitiu, até o presente momento, apenas a padronização da técnica de difusão em ágar para as combinações *candida-fluconazol* e *candida-voriconazol* (CLSI, 2004, 2007). No entanto, apesar das dificuldades, um esforço no sentido de avaliar e otimizar essa metodologia tem sido feito por diversos autores (ESPINEL-INGROFF et al., 2007; MESSER et al., 2009; MILICI et al., 2007; SINGH et al., 2007). Na presente análise, com base no tamanho das zonas de inibição obtidas pela utilização da metodologia CECON, 7,1% dos isolados apresentaram susceptibilidade dependente de dose/ intermediária e 92,9% mostraram-se susceptíveis ao itraconazol (**tabelas 11 e 12**). Dentre as espécies de *Candida*, *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata* e *C. lambica* exibiram os menores diâmetros de inibição, com valores entre 16 e 19mm, sendo, por isto, categorizados como susceptíveis dependente de dose (**anexo 5**). Mesmo utilizando outras metodologias de difusão em ágar, percentuais semelhantes têm sido encontrados por outros autores brasileiros e latinoamericanos (DOLANDE-FRANCO et al., 2008; MATSUMOTO et al., 2007). Contudo, em estudo conduzido por Espinel-Ingroff et al. (2007), a maioria das cepas exibiu taxas de susceptibilidade menores do que as reportadas nesta série. Segundo estes autores, o percentual de susceptibilidade dependente de dose foi de 23,6% e de resistência de 11,8%. Com relação a anfotericina B, na presente casuística, 100% dos isolados exibiram CIM <1µg/mL (>10mm) (**tabelas 11 e 12**), o que está em concordância com a literatura (ESPINEL-INGROFF et al., 2007; PFALLER & DIEKEMA, 2007).

O estudo comparativo entre as metodologias de microdiluição em caldo do CLSI e EUCAST mostrou alta concordância (>96%) de resultados para todos os 3 antifúngicos testados, considerando a diferença de até 2 diluições (**tabelas 13-15**). No entanto, foi verificada uma tendência de obtenção de valores de CIM mais baixos para EUCAST (**tabela 16**), o que pode ser indesejável, se forem consideradas as CIM mais altas como as mais seguras. O coeficiente de correlação intraclassa (CCI) calculado também exibiu um alto grau de correlação entre as metodologias (>0,88) (**tabela 20**), demonstrando que estas se apresentam equivalentes. Elevadas taxas de concordância (92%) e correlação (0,90) para os mesmos antifúngicos ensaiados foram igualmente reportados por Cuenca-Estrella et al. (2002a). Separadamente, fluconazol e anfotericina B foram os antifúngicos com os melhores resultados de concordância (99,1%), seguido por itraconazol (96,5%) (**tabelas 13-15**). Itraconazol também apresentou a menor correlação (0,89 a 0,92) entre as metodologias (**tabela 20**).

Contrastando com os dados da presente casuística, Espinel-Ingroff et al. (2005), encontraram taxas de reprodutibilidade consideravelmente menores tanto para fluconazol (78,5%) quanto para itraconazol (58,5%). Nos estudos de Cuenca-Estrella et al. (2002a), itraconazol também demonstrou o menor nível de correlação (0,82 a 0,88).

Dentre os isolados clínicos, *C. tropicalis* foi a espécie que apresentou a melhor taxa de concordância para todos os antifúngicos investigados (100%), sendo seguida por *C. albicans* (97,9% a 100%), *C. parapsilosis* (93,9% a 100%) e *C. guilliermondii* (91,7% a 100%) (**tabelas 13-15**). *C. tropicalis* também mostrou a melhor correlação (0,87 a 0,96) entre os isolados clínicos (**tabela 21**). Para estas espécies, Espinel-Ingroff et al. (2005) reportaram concordância de 74% a 98% para o fluconazol e 59% a 77% para itraconazol. Relativamente à anfotericina B, Alves (2004) encontrou 100% de concordância para todas os isolados de *Candida* spp. avaliados. De acordo com Espinel-Ingroff et al. (2005), a concordância entre metodologias é dependente da espécie fúngica, droga antifúngica e condições de execução das técnicas.

A comparação entre as metodologias de difusão em ágar do CLSI e microdiluição em caldo do CLSI e EUCAST foi também realizada neste estudo. Para fluconazol, a maioria dos isolados apresentou concordância entre zonas de inibição ≥ 19 mm [S] e CIM $\leq 8,0$ µg/mL [S] em ambas as metodologias (**tabela 17**). Em diâmetros entre 15-18mm (SDD/I) foram encontradas CIM entre 8,0-4,0µg/mL [S] em CLSI e CIM de 16µg/mL [SDD] em EUCAST. Para os diâmetros entre 0-14mm [R], foram verificadas CIM de 64µg/mL (R), 16µg/mL [SDD] e 0,25µg/mL [S] tanto em CLSI quanto em EUCAST. Tomando como base estes resultados, foi possível verificar que a concordância geral foi 95,6% entre M44-A e M27-A2 e 94,7% entre M44-A e E.Dis.7.1. Taxas de concordância globais similares (93,1%) entre M44-A e o método de referência M27-A2 foram igualmente encontradas por Pfaller et al. (2003; 2004a; 2007) nos estudos multicêntricos do Programa de Vigilância Internacional *ARTEMIS*. Na presente casuística, o CCI também foi elevado: (-)0,88 com CLSI e (-)0,89 com EUCAST (**tabela 20**). Dentro das espécies de *Candida*, o CCI foi homogêneo, variando de (-)0,93 a (-)0,94 (**tabela 21**). Espinel-Ingroff et al. (2007) relataram concordância (96,4%) e correlação (0,87) semelhantes para fluconazol entre as metodologias de difusão em ágar e microdiluição em caldo publicadas pelo CLSI. Em trabalho conduzido por Rodero et al. (2006), na Argentina, contudo, o CCI verificado entre M44-A e E.Dis.7.1 para este antifúngico foi menor (0,76) do que o observado no presente trabalho.

A avaliação comparativa entre a metodologia comercial de difusão em ágar da CECON e as metodologias de referência descritas nos documentos M27-A2 e E.Dis.7.1

revelou que a maior parte dos isolados com diâmetro de inibição ≥ 20 mm [S] frente ao itraconazol apresentava concentrações entre 0,015-0,125 μ g/mL [S] nas duas metodologias de microdiluição em caldo (**tabela 18**). Em diâmetros entre 12-19mm [SDD], a maioria dos isolados também apresentou concentrações entre 0,015-0,125 μ g/mL [S]. Em decorrência disto, a taxa de concordância geral foi 92% para comparações com M27-A2 e 90,3% em comparações com E.Dis.7.1. Relativamente à anfotericina B, diâmetros >10 mm [S] exibiram faixa de concentração entre 0,06-1,0 μ g/mL [S] na microdiluição (**tabela 19**), o que representou uma concordância de 100%. O CCI foi -0,97 para ambas as drogas antifúngicas (**tabela 20**). Considerando individualmente por espécies, *C. guilliermondii* [(-)0,97] e *C. tropicalis* [(-)0,99] foram as que apresentaram a melhor correlação para itraconazol e anfotericina B, respectivamente (**tabela 21**). Não há na literatura relatos de estudos comparativos com a metodologia CECON para itraconazol e anfotericina B frente a fungos isolados de infecção hospitalar. Entretanto, a partir do trabalho de Espinel-Ingroff (2006) e Espinel-Ingroff et al. (2007) que compararam um método comercial (Neo-Sensitabs - Rosco, Dinamarca) cuja metodologia é semelhante a do método CECON e uma modificação do M44-A para itraconazol e anfotericina B com o método de referência M27-A2, foi possível verificar que os resultados apresentados para itraconazol são similares no que diz respeito à concordância (95,5%/ 92,7%) e correlação (0,86/ 0,84) com os obtidos no presente estudo, mas os resultados de correlação para anfotericina B foram contrastantes, sendo claramente inferiores (0,68/ 0,47) aos encontrados nesta casuística. É importante considerar que, como a metodologia de difusão em ágar do método comercial CECON não está padronizada para itraconazol e anfotericina B e não há ainda publicações que relatem estudos de correlação com a resposta clínica, os resultados apresentados na presente investigação não podem ser empregados de maneira direta como um guia para a quimioterapia antifúngica. Contudo, em decorrência de sua simplicidade, esta técnica talvez possa ser uma ferramenta útil em avaliações preliminares do comportamento de *Candida* spp. frente ao itraconazol e anfotericina B em programas de vigilância epidemiológica.

Em resumo, o presente trabalho contribuiu para o conhecimento da prevalência das espécies de *Candida* isoladas de candidemia na região do Rio de Janeiro, bem como demonstrou que provas cromogênicas e bioquímicas são ferramentas de diagnóstico adequadas aos laboratórios de microbiologia hospitalar. A *multiplex*-PCR foi utilizada com sucesso na detecção molecular dos isolados de *Candida*, podendo ser utilizada em adição ou como uma alternativa aos métodos convencionais. Estes

resultados reforçam ainda a importância da realização de estudos de vigilância para a documentação do perfil de susceptibilidade aos antifúngicos testados. De acordo com os dados apresentados, as metodologias de difusão em ágar (CLSI/M44-A e CECON) e de microdiluição em caldo (M27-A2 e EUCAST/E.Dis.7.1) apresentaram alto índice de concordância e correlação. Deste modo, segundo Alves (2004), o método mais adequado será aquele que oferecer a melhor correlação de resultados *in vivo* e *in vitro*. Para tanto, todavia, há a necessidade de definição de diretrizes interpretativas ou pontos de corte para as diferentes metodologias, antifúngicos e microrganismos (COUTINHO, 2006).

6. CONCLUSÃO

1. Na casuística analisada predominaram indivíduos jovens, do sexo masculino e com doença de base hematológica, sendo leucemais (20%) e doença falciforme (16%) as condições clínicas mais frequentes.

2. *C. albicans* foi isoladamente a espécie de *Candida* mais prevalente tanto em relação às candidemias quanto em relação ao conjunto dos espécimens clínicos.

3. Dentre as espécies não-*albicans*, houve preponderância de *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. tropicalis* em candidemais e nos demais espécimens clínicos. Digno de nota foi o elevado percentual de recuperação de *C. guilliermondii*.

4. As provas do tubo germinativo e do clamidósporo mostraram alta taxa de falso-negativos (10,6%), sugerindo não serem adequadas como única metodologia de identificação de *C. albicans*.

5. A prova do CHROMagar-*Candida* revelou ser um eficiente método de identificação presuntiva de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, o que indica ser útil na triagem e/ou em cultura de vigilância destas espécies.

6. A identificação bioquímica em aparelho VITEK das espécies de *Candida* estudadas demonstrou elevadas taxas de detecção, confirmando o método como um protocolo seguro para a identificação definitiva deste grupo de leveduras em laboratórios de microbiologia hospitalar.

7. A técnica de *multiplex*-PCR apresentou-se como um método prático, rápido e eficaz na identificação específica de espécies de *Candida*. O índice de concordância com a prova bioquímica automatizada foi de 100%, o que sugere a possibilidade de sua utilização como um protocolo de identificação confirmatório ou suplementar adequado à vigilância em saúde.

8. A maioria dos isolados clínicos foi susceptível a todas as drogas avaliadas. Todavia, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. lambica* foram as espécies de *Candida* que apresentaram os mais elevados valores de CIM (> SDD) de antifúngicos azólicos.

9. A resistência ao fluconazol foi baixa (0,9%), segundo os protocolos de microdiluição em caldo CLSI/M27-A2 e EUCAST/E.Dis.7.1. Entretanto, a aplicação dos pontos de cortes mais estritos do EUCAST aumentou o poder discriminatório do método, elevando o percentual de resistência para 2,6%.

10. Resistência ao itraconazol não foi encontrada por nenhum dos 02 protocolos de microdiluição em caldo. Contudo, o documento EUCAST/E.Dis.7.1. foi capaz de detectar um maior percentual de cepas SDD (5,4%) do que o documento CLSI/M27-A2 (3,5%).

11. Foi observado 100% de susceptibilidade dos isolados à anfotericina B tanto pelo documento CLSI/M27-A2 quanto pelo EUCAST/E.Dis.7.1.

12. Baixa resistência ao fluconazol (2,6%) foi também detectada pela metodologia de difusão em ágar, segundo o documento de referência CLSI/M44-A. A capacidade deste protocolo em identificar as CIM mais elevadas (SDD/R) encontradas no documento CLSI/M27-A2 foi verificada.

13. Não foi também observada resistência ao itraconazol pelo protocolo de difusão em ágar do método comercial CECOM. No entanto, CIM com valores mais elevados (SDD) foram detectadas. Esta metodologia revelou igualmente 100% de susceptibilidade dos isolados clínicos à anfotericina B.

14. A concordância e correlação entre os documentos de referência CLSI/M27-A2 e EUCAST/E.Dis.7.1 foi alta (>96%/>0,89) para todos os antifúngicos avaliados, demonstrando que tecnicamente são equivalentes e adequados à definição/confirmação de susceptibilidades. Entretanto, uma vantagem da metodologia de microdiluição em caldo do EUCAST diz respeito ao maior tamanho do inóculo e a suplementação de glicose no meio RPMI 1640, o que permitiu melhorar a taxa de crescimento das leveduras e antecipar a leitura em 24h. Além disto, a leitura

espectrofotométrica indicada em EUCAST ofereceu a possibilidade de rastreabilidade por automação na documentação dos dados.

15. A concordância e correlação entre os protocolos de difusão em ágar CLSI/M44-A e CECON e os documentos de referência CLSI/M27-A2 e EUCAST/E.Dis.7.1 foi elevada (>92%/-0,97), sugerindo que estes protocolos de difusão em ágar são adequados à triagem de isolados clínicos frente aos 03 antifúngicos analisados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABI-SAID, D.; ANAISSIE, E.; UZUN, O.; RAAD, I.; PINZCOWSKI, H.; VARTIVARIAN, S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. **Clin. Infect. Dis.**, v. 24, n. 6, p. 1122-1128, Jun. 1997.

ADAMS-GRAVES, P.; OSTRIC, E. J.; MARTIN, M.; RICHARDSON, P.; LEWIS, J. B, JR. Sickle cell hospital unit: a disease-specific model. **J. Healthc. Manag.**, v. 53, n. 5, p. 305-315, sep-oct. 2008.

AGVALD-OHMAN, C.; KLINGSPOR, L.; HJELMQVIST, H.; EDLUND, C. Invasive candidiasis in long-term patients at a multidisciplinary intensive care unit: *Candida* colonization index, risk factors, treatment and outcome. **Scand. J. Infect. Dis.**, v.4, n. 2, p.145-532, 2008

ALEXANDER, B. D. Diagnosis of fungal infection: new technologies for the mycology laboratory. **Transpl. Infect. Dis.**, v. 4 (Suppl. 3), p. 32-37, 2002.

ALMEIDA, G. M.; COSTA, S. F.; MELHEM, M.; MOTTA, A. L.; SZESZS, M. W.; MIYASHITA, F.; PIERROTTI, L. C.; ROSSI, F.; BURATTINI, M. N. *Rhodotorula* spp. isolated from blood cultures: clinical and microbiological aspects. **Med. Mycol.**, v. 46, n. 6, p. 547-556, Sep. 2008.

ALMEIDA, G. M. D. ***Rhodotorula* spp. isoladas de hemoculturas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo: características clínicas e microbiológicas.** São Paulo: USP, 2005. 139p. il. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, São Paulo.

ALMIRANTE, B.; RODRÍGUEZ, D.; CUENCA-ESTRELLA, M.; ALMELA, M.; SANCHEZ, F.; AYATS, J.; ALONSO-TARRES, C.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; PAHISSA, A.; Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 5, p.1681-1685, may 2006.

AL-REZQI, A.; HAWKES, M.; DOYLE, J.; RICHARDSON, S. E.; ALLEN, U. Invasive mold infections in iatrogenically immunocompromised children: An eight-yr review. **Pediatr. Transplant.**, *in press* 2008.

AL-SALEM, A. H. Indications and complications of splenectomy for children with sickle cell disease. **J. Pediatr. Surgery**, v. 41, p. 1909-1915, 2006.

ALVES, P. C. **Avaliação comparativa de testes de susceptibilidade a antifúngicos pelos métodos NCCLS e EUCAST de leveduras no gênero *Candida***. Campinas: UNICAMP, 2004. 95p. il. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Campinas, Faculdade de Medicina, Campinas.

ANAISSIE, E. J. Diagnosis and therapy of fungal infection in patients with leukemia--new drugs and immunotherapy. **Best Pract. Res. Clin. Haematol.**, v. 21, n. 4, p. 683-690, dec. 2008.

ANAISSIE, E. J. Opportunistic mycoses in the immunocompromised host: experience at a cancer center and review. **Clin. Infect. Dis.** v. 14 (Suppl. 1), p. S43-S53, 1992.

ANAISSIE, E. J.; BODEY, G. P.; KANTARJIAN, H; DAVID, C.; BARNETT, K; BOW, E.; DEFELICE, R.; DOWNS, N.; FILE, T.; KARAM, G.; POTTS, D.; SHELTON, M.; SUGAR, A. Fluconazole therapy for chronic disseminated candidiasis in patients with leukemia and prior amphotericin b therapy. **Am. J. Med.** v. 91, p. 142-150, 1991.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA intensifica controle de infecção em serviços de saúde. **Rev. Saude Publ.**, v. 38, n.3, p. 475-478, 2004a.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de Microbiologia Clínica para o controle de infecção em serviços de saúde**. Módulos I-X. Brasília: ANVISA, 2004b.

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. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 9, n. 5, p. 411-418, 2005.

ARAÚJO, C. R.; MIRANDA, K. C.; PASSOS, X. S.; SOUZA, L. K. H.; LEMOS, J. A.; KHRASI, C. H. A.; COSTA, C. R.; SILVA, M. R. R.; FERNANDES, O. F. L. Identificação de leveduras do gênero *Candida* por métodos manuais convencionais e pelo método cromógeno do CHROMagar-Candida. **Rev. Patol. Trop.**, v. 34, n.1, p. 37-42, jan.-abr. 2005.

ARCAYA, N. M.; MESA, L. M.; PINEDA, M. R.; BELTRÁN-LUENGO, H.; MILAGROS-CALVO, B. [Profile of antifungal susceptibility of species of *Candida* isolated from hemocultures in a university hospital, Maracaibo, Venezuela]. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 23, n. 2, p. 97-100, jun. 2006.

ARENDRUP, M. C.; FURSTED, K.; GAHRN-HANSEN, B.; JENSEN, I. M.; KNUDSEN, J. D.; LUNDGREN, B.; SCHONHEYDER, H. C.; TVEDE, M. Seminal surveillance of fungemia in denmark: notably high rates of fungemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 9, p. 4434-4440, 2005.

ARIKAN, S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. **Med. Mycol.**, v. 45, n. 7, p. 569-587, nov. 2007.

ARORA, D. R.; SAINI, S.; APARNA-GUPTA, N. Evaluation of germ tube test in various media. **Indian J. Pathol. Microbiol.**, v. 46, n. 1, p.124-126, jan. 2003.

ASCIOGLU, S.; REX, J. H.; PAUW, B.; BENNETT, J. E.; BILLE, J.; CROKAERT, F.; DENNING, D. W.; DONNELLY, J. P.; EDWARDS, J. E.; ERJAVEC, Z.; FIERE, D.; LORTHOLARY, O.; MAERTENS, J.; MEIS, J. F.; PATTERSON, T. F.; RITTER, J.; SELLESLAG, D.; SHAH, P. M.; STEVENS, D. A.; WALSH, T. J. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplantation: an international consensus. **Clin. Infect. Dis.**, v. 34, p. 07-14, 2002.

ATKINS, S. D.; CLARK, I. M. Fungal molecular diagnostics : a mini review. **J. Appl. Genet.** v. 45, n. 1, p. 3-15, 2004.

AVILA-AGUERO, M. L.; CANAS-COTO, A.; ULLOA-GUTIERREZ, R.; CARO, M. A., AFARO, B; PARIS, M. M. Risk factors for candida infections in a neonatal intensive care unit in Costa Rica. **Inter. J. Infect. Dis.**, v. 9, p.90-95, 2005.

BACK-BRITO, G. N.; MOTA, A. J.; VASCONCELLOS, T. C.; QUERIDO, S. M.; JORGE, A. O.; REIS, A. S.; BALDUCCI, I.; KOGA-ITO, C. Y. Frequency of *Candida* spp. in the oral cavity of Brazilian HIV-positive patients and correlation with CD4 cell counts and viral load. **Mycopathologia**, v. 167, n. 2, p. 81-87, feb. 2009.

BADIA, X.; ROSET, M.; CARRERAS, E.; AUSIN, I.; HERRERA L. [Meta-analysis on safety and efficacy of liposomal amphotericin B in the empirical treatment of febrile neutropenia]. **Med. Clin.** (Barc), v. 122, n. 16, p. 610-616, may 2004.

BADIEE, P.; KORDBACHEH, P.; ALBORZI, A.; MALEKHOSEINI, S.; RAMZI, M.; MIRHENDI, H.; MAHMOODI, M.; SHAKIBA, E. Study on invasive fungal infections in immunocompromised patients to present a suitable early diagnostic procedure. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 13, n.1, p. 97-102, jan. 2009.

BAGINSKI, M.; CZUB, J.; STERNAL, K. Interaction of amphotericin B and its selected derivatives with membranes: molecular modeling studies. **Chem. Rec.**, v. 6, n. 6, p. 320-332, 2006.

BALAJEE, S. A.; SIGLER, L.; BRANDT, M. E. DNA and the classical way: identification of medically important molds in the 21st century. **Med. Mycol.**, v. 45, n. 6, p. 475-490, sep. 2007.

BANDEIRA, F. M. G. C.; PERES, J. C.; CARVALHO, E. J.; IVANE BEZERRA, I.; ADERSON S. ARAÚJO, A. S.; MELLO, M. R. B.; MACHADO, C. Hidroxiuréia em pacientes com síndromes falciformes acompanhados no Hospital Hemope, Recife, Brasil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v. 26, n. 3, p. 189-194, 2004.

BANERJEE, S. N.; EMORI, T. G.; CULVER, D. H.; GAYNES, R. P.; JARVIS, W. R.; HORAN, T.; EDWARDS, J. R.; TOLSON, J.; HENDERSON, T.; MARTONE, W. J. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the united stated, 1980-

1989. national nosocomial infections surveillance system. **Am. J. Med.**, v. 91, p. 86S-89S, 1991.

BARBERINO, M. G.; SILVA, N.; REBOUÇAS, C.; BARREIRO, K.; ALCÂNTARA, A. P.; NETTO, E. M.; ALBUQUERQUE, L.; BRITES, C. Evaluation of blood stream infections by *Candida* in three tertiary hospitals in Salvador, Brazil: a case-control study. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 10, n. 1, p. 36-40, feb 2006.

BARCHIESI, F.; MORBIDUCCI, V.; ANCARANI, F.; SCALISE, G. Emergence of oropharyngeal candidiasis caused by non-*albicans* species of *Candida* in HIV-infected patients. **Eur. J. Epidemiol.**, v. 9, n. 4, p. 455-456, jun. 1993.

BARKER, K. S.; ROGERS, P. D. Recent Insights into the Mechanisms of Antifungal Resistance. **Curr. Infect. Dis. Rep.**, v. 8, n. 6, p. 449-456, nov. 2006.

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 Infect. Dis.**, v. 10, p. 6:21, feb. 2006.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* V. 45, n. 4, p. 493-496, apr. 1966.

BAUMGARTNER, C.; FREYDIERE, A. M.; GILLE, Y. Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using albicans ID and CHROMagar *Candida* plates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 2, p. :454-456, feb. 1996.

BECK-SAGÉ, C. M.; JARVIS, W. R.; NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE SYSTEM. Secular Trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. **J. Infect. Dis.**, v. 167, p. 1247-1251, 1993.

BEHESHTI, F.; SMITH, A. G.; KRAUSE, G. W. Germ tube and chlamyospore formation by *Candida albicans* on a new medium. **J. Clin. Microbiol.**, v. 2, n. 4, p. 345-348, oct. 1975.

BENDEL, C. M. Colonization and epithelial adhesion in the pathogenesis of neonatal candidiasis. **Semin. Perinatol.**, v. 27, n. 5, p. 357-364, oct. 2003.

BERARDINELLI, S.; OPHEIM, D. J. New germ tube induction medium for the identification of *Candida albicans*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 22, n. 5, p. 861-862, nov. 1985.

BERNAL, S.; MARTÍN-MAZUELOS, E.; GARCÍA, M.; ALLER, A. I.; MARTÍNEZ, M. A.; GUTIÉRREZ, M. J. Evaluation of CHROMagar Candida medium for the isolation and presumptive identification of species of *Candida* of clinical importance. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 24, n. 4, p. 201-204, apr. 1996.

BERROUANE, Y. F.; HERWALDT, L. A.; PFALLER, M. A. Trends in antifungal use and epidemiology of nosocomial yeast infections in a university hospital. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 3, p. 531-537, mar. 1999.

BILLE, J.; MARCHETTI, O.; CALANDRA, T. Changing face of health-care associated fungal infections. **Cur. Opin. Infect. Dis.**, v. 18, p. 314-319, 2005.

BJORKLUND, A.; ASCHAN, J.; LABOPIN, M.; REMBERGER, M.; RINGDEN, O.; WINIARSKI, J.; LJUNGMAN, P. Risk factors for fatal infectious complications developing late after allogeneic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant**, v. 40, n. 11, p. 1055-1062, dec. 2007.

BJORNSON, A. B. The Immune Deficit. In: Embury, S. H.; Hebbel, R. P.; Mohandas, N.; Steinberg, M. N. **Sickle cell disease: basic principles and clinical practice**. New York: Raven Press, 1994, p. 335-348.

BLANCO, J. L.; GARCIA, M. E. Immune response to fungal infections. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 125, n. 1-2, p. 47-70, sep. 2008.

BODEY, G. P. Managing infections in the immunocompromised patient. **Clin. Infect. Dis.**, v. 40, Suppl. 4, p. S239, apr. 2005.

BODEY, G. P.; ANAISSIE, E. J.; EDWARDS, J. E. Definitions of *Candida* Infections, p. 407-408. In BODEY G. P. Editor. **Candidiasis: pathogenesis, diagnosis, and treatment**. New York: Raven Press, 1993.

BODEY G. P.; BUCKLEY, M.; SATHE, Y. S.; FREIREICH, E. J. Quantitative relationships between circulation leukocytes and infection in patients with acute leukemia. **Ann. Intern. Med.**, v. 64, p. 328-340, 1966.

BODEY, G.; BUELTMANN, B.; DUGUID, W.; GIBBS, D.; HANAK, H.; HOTCHI, M.; MALL, G.; MARTINO, P.; MEUNIER, F.; MILLIKEN S.; NAOE, S.; OKUDAIRA, M.; SCEVOLA, D.; VAN'T WOUT, J. Fungal infections in cancer patients: an international autopsy survey. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 11, n. 2, p. 99-109, feb. 1992.

BODEY, G. P.; MARDANI, M.; HANNA, H. A.; BOKTOUR, M.; ABBAS, J.; GIRGAWY, E.; HACHEM, R. Y.; KOTOYIANNIS, D. P.; RAAD, I. I. The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* fungemia in immunocompromised patients with cancer. **Am. J. Med.**, v. 112, p. 380-385, 2002.

BOKTOUR, M. R.; KONTOYIANNIS, D. P.; HANNA, H. A.; HACHEM, R. Y.; GIRGAWY, E.; BODEY, G. P.; RAAD II. Multiple-species candidemia in patients with cancer. **Cancer**, v. 101, n. 8, p. 1860-1865, oct. 2004.

BONASSOLI, L. A.; BERTOLI, M.; SVIDZINSKI, T. I. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. **J. Hosp. Infect.**, v. 59, n. 2, p.159-162, feb. 2005.

BOOGAERTS, M.; MAERTENS, J. Clinical experience with itraconazole in systemic fungal infections. **Drugs**, v. 61, Suppl 1, p. 39-47, 2001.

BOUGNOUX, M. E.; KAC, G.; AEGERTER, P.; D'ENFERT, C.; FAGON, J. Y.; CandiRea Study Group Candidemia and candiduria in critically ill patients admitted to intensive care units in France: incidence, molecular diversity, management and outcome. **Intensive Care Med.**, v. 34, n. 2, p. 292-299, feb. 2008.

BOW, E. J. Infection Risk and Cancer Chemotherapy: The impact of the chemotherapeutic regimen in patients with lymphoma and solid tissue malignancies. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 41 (Suppl. D), p. 1-5, 1998.

BOW, E. J.; LOEWEN, R.; CHEANG, M. S.; SCHAFFNER, B. Invasive Fungal Disease in adults under going remission-induction therapy for acute myeloid leukemia: the

pathogenetic role of the antileukemic regimen. **Clin. Infect. Dis.**, v. 21, n. 2, p. 361-9, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada No. 48, de 02 de junho de 2000. Aprova o Roteiro de Inspeção do Programa de Controle de Infecção Hospitalar. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 03 jun. 2000a. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=181>>. Acesso em: 02 mai. 2005.

BRASIL. Congresso Nacional. Câmara dos Deputados. Comissão de Seguridade Social e Família. Projeto de Lei Complementar no. 306 de 2008. **Dispõe sobre os valores mínimos a serem aplicados anualmente por Estados, Distrito Federal, Municípios e União em ações e serviços públicos de saúde, os critérios de rateio dos recursos de transferências para a saúde e as normas de fiscalização, avaliação e controle das despesas com saúde nas três esferas de governo.** Poder Legislativo, Brasília, DF, mai. 2008. Disponível em: <<http://www.camara.gov.br/sileg/integras/566121.pdf><http://elegis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=181>>. Acesso em: 25 fev. 2009.

BRASIL. Congresso Nacional. Lei No. 8.078, de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a Proteção do Consumidor e Dá Outras Providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 set. 1990b. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=181>>. Acesso em: 19 mai. 2005.

BRASIL. Congresso Nacional. Lei No. 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as Condições para a Promoção, Proteção e Recuperação da Saúde, a Organização e o Funcionamento dos Serviços Correspondentes, e Dá Outras Providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 set. 1990c. Disponível em: <<http://elegis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=181>>. Acesso em: 15 set. 2004.

BRASIL. Congresso Nacional. Lei No. 9.431, de 06 de janeiro de 1997. Dispõe sobre a Obrigatoriedade da Manutenção de Programa de Controle de Infecções Hospitalares pelos Hospitais do País. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder

Executivo, Brasília, DF, 07 jan. 1997. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=181>>. Acesso em: 19 mai. 2005.

BRASIL. Congresso Nacional. Lei No. 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, Cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e Dá Outras Providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 jan. 1999. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=182&word=>>>. Acesso em: 19 mai. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Análise do inquérito nacional sobre infra-estrutura, recursos humanos, equipamentos, procedimentos, controle de qualidade e biossegurança nos laboratórios de microbiologia**. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, USP, 2007a. 103p. il. - Universidade de São Paulo, São Paulo.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Inquérito nacional de laboratórios de microbiologia de hospitais com 10 ou mais leitos de UTI e hospitais sentinelas**. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, USP, 2007b. 166p. il. - Universidade de São Paulo, São Paulo.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Monitoramento e prevenção da resistência microbiana em serviços de saúde – Termo de Cooperação 37 (TC-37) entre Organização Pan-americana de Saúde (OPAS) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em parceria com a Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB/SVS/MS)**, 2006a. 22p. il. - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Monitoramento e prevenção da resistência microbiana em serviços de saúde. Relatório anual de 2006 – Termo de Cooperação 37 (TC-37) entre Organização Pan-americana de Saúde (OPAS) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em parceria com a Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB/SVS/MS)**, 2007c. 29p. il. - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Projeto de implantação da rede nacional de monitoramento de resistência microbiana em serviços de saúde**. Brasília: ANVISA, 2006b. 22p. il. - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria No. 196, de 24 de junho de 1983. Instruções para o Controle e Prevenção das Infecções Hospitalares. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 28 jun. 1983. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=1085&word=>>. Acesso em: 19 mai. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria No. 666, de 17 de maio de 1990. Cria, no Departamento de Programas da Secretaria Nacional de Assistência à Saúde, a Divisão de Controle. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mai. 1990a. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=691&word=>>. Acesso em: 19 mai. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria No. 930, de 27 de agosto de 1992. Expede, na Forma de Anexos, Norma para o Controle das Infecções Hospitalares. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo**, Brasília, DF, 28 ago.1992. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=490&word=>>. Acesso em: 19 mai. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria No. 2.616, de 12 de maio de 1998. Expede Diretrizes e Normas para a Prevenção e o Controle da Infecção Hospitalar. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 13 mai. 1998. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=482#>>. Acesso em: 15 set. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Portaria SAS No. 431 de 03 de outubro de 2001. Aprova, na forma do anexo desta portaria, o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas tratamento da leucemia mielóide crônica do adulto, bem como os modelos de termo de consentimento informado dele integrantes. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo**, Brasília, DF, 05 out. 2001. Disponível em: <http://br.search.yahoo.com/search;_ylt=A0oG759FTIpJBdcA>.

qtnz6Qt.?p=Portaria+SAS+431+de+03++outubro+2001&y=Buscar&fr=yfp&rd=r1=>.

Acesso em 18 jan. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2008: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2007d. 94p. il. Color. tab. - Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos 2007. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. 5ª. Ed.** Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007e. 286 p.: il. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos.. Emenda Constitucional no. 29 de 13 de Setembro de 2000. Altera os artigos 34, 35, 156, 160, 167 e 198 da Constituição Federal e acrescenta artigo ao Ato das Disposições Constitucionais Transitórias, para assegurar os recursos mínimos para o financiamento das ações e serviços públicos de saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 set. 2000b. Disponível em: <[http:// www.planalto.gov.br/ccivil_03/Constituicao/Emendas/Emc/emc29.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Constituicao/Emendas/Emc/emc29.htm)>. Acesso em: 25 fev. 2009.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. Lei no. 10.406 de 10 de janeiro de 2002. Institui o Código Civil. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 11 jan. 2002. Disponível em: <http://www.presidencia.gov.br/ccivil_03/LEIS/2002/L10406.htm>. Acesso em: 19 mai. 2005.

BRION, L. P.; UKO, S. E.; GOLDMAN, D. L. Risk of resistance associated with fluconazole prophylaxis: systematic review. **J. Infect.**, v. 54, n. 6, p. 521-529, jun. 2007.

BRITO, L. R.; GUIMARÃES, T.; NUCCI, M.; ROSAS, R. C.; PAULA-ALMEIDA, L.; DA MATTA, D. A.; COLOMBO, A. L. Clinical and microbiological aspects of candidemia

due to *Candida parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. **Med. Mycol.**, v. 44, n. 3, p. 261-266, may 2006.

BROWN, J. M. Fungal infections in bone marrow transplant patients. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 17, n. 4, p. 347-352, aug. 2004.

BUKHARY, Z. A. Candiduria: a review of clinical significance and management. **Saudi J. Kidney Dis. Transpl.**, v. 19, n. 3, p. 350-360, may 2008.

CALANDRA, T.; COHEN, J.; INTERNATIONAL SEPSIS FORUM DEFINITION OF INFECTION IN THE ICU CONSENSUS CONFERENCE. The international sepsis forum consensus conference on definitions of infection in the intensive care unit. **Crit. Care Med.**, v. 33, n. 7, p. 1538-1548, jul. 2005.

CAMPBELL, C. K.; HOLMES, A. D.; DAVEY, K. G.; SZEKELY, A.; WARNOCK, D. W. Comparison of a new chromogenic ágar with the germ tube method for presumptive identification of *Candida albicans*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 17, n. 5, p. 367-368, may 1998.

CAMPS, I. R. Risk factors for invasive fungal infections in haematopoietic stem cell transplantation. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 32, Suppl. 2, p. S119-S123, nov. 2008.

CANTÓN, R. Role of the microbiology laboratory in infectious disease surveillance, alert and response. **Clin. Microbiol. Infect.** v. 11, Suppl. 1, p. 3-8, apr. 2005.

CANTÓN, E.; VIUDES, A.; PEMÁN, J. [Systemic nosocomial infection by yeasts]. **Rev. Iberoam. Micol.** v. 18, n. 2, p. 51-55 jun. 2001.

CANUTO, M. M.; RODERO, G. F. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. **Lancet Infect. Dis.**, v. 2, p. 550-563, 2002.

CARNEIRO-SAMPAIO, M.; COUTINHO, A. Immunity to microbes: lessons from primary immunodeficiencies. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 4, p. 1545-1555, apr. 2007.

CARRERAS, E.; MENSA, J. [Febrile neutropenia: past, present and future]. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v. 23, Suppl. 5, p. 2-6, dec. 2005.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; GIUSIANO, G.; EZKURRA, P. A.; QUINDÓS, G. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. **Rev. Esp. Quimioter.**, v. 19, n. 2, p. 130-139, jun. 2006.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; PEMÁN, J.; GOBERNADO, M. Nuevos antifúngicos. presente y futuro. **Rev. Esp. Quimioter.**, v. 12, n.3, p. 1-10, 1999.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; QUINDÓS, G.; CÁRDENES, C. D.; ALONSO-VARGAS, R.; ARÉVALO, P.; BRIÓ, S.; MADARIAGA, L. [Evaluation of Chromalbicans Ágar for presumptive identification of *Candida albicans*]. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 18, n. 3, p. 105-108, sep. 2001.

CARVALHO, A.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; MARTINS, M. L.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A. G.; LUDOVICO, P.; RODRIGUES, F. *Multiplex* PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species. **Med. Mycol.**, v. 45, n. 7, p. 619-627, nov. 2007a.

CARVALHO, V. G.; TERCETI, M. S.; DIAS, A. L.; PAULA, C. R.; LYON, J. P.; DE SIQUEIRA, A. M.; FRANCO, M. C. Serotype and mating type characterization of *Cryptococcus neoformans* by multiplex PCR. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.**, v. 49, n. 4, p. 207-210, jul.-aug. 2007b.

CASALINUOVO, I. A.; DI FRANCESCO, P.; GARACI, E. Fluconazole resistance in *Candida albicans*: a review of mechanisms. **Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.**, v. 8, n. 2, p. 69-77, mar-apr. 2004.

CASTAGNOLA, E.; FARACI, M.; MORONI, C.; BANDETTINI, R.; GRANATA, C.; CARUSO, S.; BAGNASCO, F.; CAVIGLIA, I.; MALGORZATA, M.; FURFARO, E.; NATALIZIA, A. R.; DE FAZIO, V.; MORREALE, G.; LANINO, E.; HAUPT, R.; DINI, G.; VISCOLI, C. Invasive mycoses in children receiving hemopoietic SCT. **Bone Marrow Transplant**, v. 41, Suppl. 2, p. S107-S111, jun. 2008.

CHAKRABARTI, A.; CHATTERJEE, S. S.; RAO, K. L.; ZAMEER, M. M.; SHIVAPRAKASH, M. R.; SINGHI, S.; SINGH, R.; VARMA, S. C. Recent experience

with fungaemia: change in species distribution and azole resistance. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 41, n. 4, p. 275-284, 2009.

CHANG, H. C.; LEAW, S. N.; HUANG, A. H.; WU, T. L.; CHANG, T. C. Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a *multiplex* PCR method. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n.10, p. 3466-3471, oct. 2001.

CHARLES, P. E.; DALLE, F.; AUBE, H.; DOISE, J. M.; QUENOT, J. P.; AHO, L. S.; CHAVANET, P.; BLETTERY, B. *Candida* spp. colonization significance in critically ill medical patients: a prospective study. **Intensive Care Med.**, v. 31, n. 3, p. 393-400, mar. 2005.

CHEN, Y. C.; EISNER, J. D.; KATTAR, M. M.; RASSOULIAN-BARRETT, S. L.; LAFE, K.; YARFITZ, S. L.; LIMAYE, A. P.; COOKSON, B. T. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of dna sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rna genes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 6, p. 2302-2310, jun. 2000.

CHEN, Y. C.; EISNER, J. D.; KATTAR, M. M.; RASSOULIAN-BARRETT, S. L.; LAFE, K.; BUI, U.; LIMAYE, A. P.; COOKSON, B. T. Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39 n. 11, p. 4042-4051, nov. 2001.

CHENG, M. F.; YANG, Y. L.; YAO, T. J.; LIN, C. Y.; LIU, J. S.; TANG, R. B.; YU, K. W.; FAN, Y. H.; HSIEH, K. S.; HO, M.; LO, H. J. Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species. **BMC Infect. Dis.**, v. 5, n. 1, p. 22-26, apr. 2005.

CHIOU, C. C.; GROLL, A. H.; WALSH, T. J. New drugs and novel targets for treatment of invasive fungal infections in patients with cancer. **Oncologist**, v. 5, p. 120-135, 2000.

CHOMCZYNSKI, P.; MACKEY, K.; DREWS, R.; WILFINGER, W. DNAzol: a reagent for the rapid isolation of genomic DNA. **Biotechniques**, v. 22, n. 3, p. 550-553, mar. 1997.

CHOW, J. K.; GOLAN, Y.; RUTHAZER, R.; KARCHMER, A. W.; CARMELI, Y.; LICHTENBERG, D.; CHAWLA, V.; YOUNG, J.; HADLEY, S. Risk factors for *albicans*

and non-*albicans* candidemia in the intensive care unit. **Crit. Care Med.**, v. 36, n. 7, p. 1993-1998, jul. 2008.

CHULAMOKHA, L.; SCHOLAND, S. J.; RIGGIO, J. M.; BALLAS, S. K.; HORN, D.; DESIMONE, J. A. Bloodstream infections in hospitalized adults with sickle cell disease: a retrospective analysis. **Am. J. Hematol.**, v. 81, n. 10, p. 723-728, oct. 2006.

CLARKSON, J.; WORTHINGTON, H.; EDEN, O. Interventions for treating oral mucositis for patients with cancer receiving treatment. **Aust. Dent. J.**, v. 53, n. 4, p. 363-365, dec, 2008.

CLAUDINO, A. L.; PEIXOTO, R. F, JR.; MELHEM, M. S.; SZESZS, M. W.; LYON, J. P.; CHAVASCO, J. K.; FRANCO, M. C. Correlation between CLSI, EUCAST and Etest methodologies for amphotericin B and fluconazole antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. Clinical isolates. **Pharmazie**, v. 63, n. 4, p. :286-289, apr. 2008.

CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A. Overview of host defense mechanisms in systemic mycoses and the basis for immunotherapy. **Semin. Respir. Infect.**, v. 16, n. 1, p. 60-66, 2001.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Quality control minimal inhibitory concentration (MIC) limits for microdilution and MIC interpretative breakpoint.** Second informational supplement M-27S2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2005.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi.** Approved standard – second edition M-38A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2008a.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi.** Approved standard - M-38A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2002a.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi.** Proposed standard M-38P. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 1998.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts.** Approved standard M-27A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 1997.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts.** Approved standard – second edition M-27A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2002b.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts.** Approved standard – third edition M-27A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2008b.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts.** Proposed standard M-27P. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 1992.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts.** Third informational supplement M-27S3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2008c.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference method for disk diffusion susceptibility testing of yeasts.** Approved standard M-44A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2004.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Zone diameter interpretative standards, corresponding minimal inhibitory concentration (MIC) interpretative breakpoints, and quality control limits for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts.** Second informational supplement M44-S2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2007.

CODY, W. L.; WILSON, J. W.; HENDRIXSON, D. R.; MCIVER, K. S.; HAGMAN, K. E.; OTT, C. M.; NICKERSON, C. A.; SCHURR, M. J. Skim milk enhances the preservation of thawed -80 degrees C bacterial stocks. **J. Microbiol. Methods.**, v. 75, n. 1, p. 135-138, sep. 2008.

COLOMBO, A. L. **Contribuição para o entendimento da epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. e para sua abordagem terapêutica.** São Paulo: UNIFESP, 2003. 287p. il. Tese (Livre-Docência) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

COLOMBO, A. L. [Epidemiology and treatment of hematogeneous candidiasis: a brazilian perspective]. **Braz. J. Infec. Dis.**, v. 4, n. 3, p. 113-118, 2000.

COLOMBO, A. L.; DA MATTA, D.; DE ALMEIDA, L. P.; ROSAS, R. Fluconazole susceptibility of Brazilian *Candida* isolates assessed by a disk diffusion method. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 6, n. 3, p. 118-123, jun. 2002.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. [Candiduria: a clinical and therapeutic approach]. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, n. 3, p. 332-337, may-jun. 2007.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L. R.; DE ALMEIDA MONFARDINI, L. P.; CUNHA, A. K.; RADY, P.; ALVES, T.; ROSAS, R. C. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 28, n. 5, p. 570-576, may. 2007.

COLOMBO, A. L.; NAKAGAWA, Z.; VALDETARO, F.; BRANCHINI, M. L. M.; KUSSANO, E. J. U.; NUCCI, M. Susceptibility profile of 200 bloodstream isolated of *candida* spp. collected from brazilian tertiary care hospitals. **Med. Mycol.**, v. 41, p. 235-239, 2003a.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J.; BRAZILIAN NETWORK CANDIDEMIA STUDY. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide

sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **J. Clin. Microbiol.**, v. 8, n. p. 2816-2823, aug. 2006.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; SALOMÃO, R.; BRANCHINI, M. L.; RICHTMANN, R.; DEROSI, A.; WEY, S. B. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 34, n. 4, p. 281-286, aug. 1999.

COLOMBO, A. L.; 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 randomizeddouble-blind study of caspofungin versus amphotericin B for the treatment of invasive candidiasis. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 22, n. 8, p. 470-474, aug. 2003b.

COLOMBO, A. L.; THOMPSON, L.; GRAYBILL, J. R. The north and south of candidemia: Issues for Latin America. **Drugs Today** (Barc)., v. 44, Suppl A1-A34, sep. 2008.

COMERT, F.; KULAH, C.; AKTAS, E.; EROGLU, O.; OZLU, N. Identification of *Candida* species isolated from patients in intensive care unit and in vitro susceptibility to fluconazole for a 3-year period. **Mycoses**, v. 50, n. 1, p. 52-57, jan. 2007.

CORNELY, O. A.; BÖHME, A.; BUCHHEIDT, D.; EINSELE, H.; HEINZ, W. J.; KARTHAUS, M.; KRAUSE, S. W.; KRÜGER, W.; MASCHMEYER, G.; PENACK, O.; RITTER, J.; RUHNKE, M.; SANDHERR, M.; SIENIAWSKI, M.; VEHRESCHILD, J. J.; WOLF, H. H.; ULLMANN, A. J. Primary prophylaxis of invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies. Recommendations of the Infectious Diseases Working Party of the German Society for Haematology and Oncology. **Haematologica**, v. 94, n. 1, p. 113-22, jan. 2009.

CORNWELL, E. E.; BELZBERG, H.; OFFNE, T. V.; DOUGHERTY, W. R.; MORALES, I. R.; ASENSIO, J.; DEMETRIADES, D. The pattern of fungal infections in critically ill surgical patients. **Am. Surg.**, v. 61, n. 10, p. 847-50, 1995.

COSTA, P. J. M. S.; VILELA, R. Q. B.; CIPOLOTTI, R.; FIGUEIREDO, M. S. Diversidade clínica e laboratorial no haplótipo bantu da anemia falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 28, n. 1, p. 40-44, 2006.

COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; PINA-VAZ, C.; MENDONÇA, D.; GONÇALVES-RODRIGUES, A. A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 27, n. 5, p. 365-374, may 2008.

COTTEN, C. M.; MCDONALD, S.; STOLL, B.; GOLDBERG, R. N.; POOLE, K.; BENJAMIN, D. K ; NATIONAL INSTITUTE FOR CHILD HEALTH AND HUMAN DEVELOPMENT NEONATAL RESEARCH NETWORK. The association of third-generation cephalosporin use and invasive candidiasis in extremely low birth-weight infants. **Pediatrics**, v. 118, n. 2, p. 717-722, aug. 2006.

COUILLARD, S.; BENKERROU, M.; GIROT, R.; BROUSSE, V.; FERSTER, A.; BADER-MEUNIER, B. Steroid treatment in children with sickle-cell disease. **Haematologica**, v. 92, n. 3, p. 425-426, mar. 2007.

COUTINHO, G. **Fatores de virulência e resistência a antifúngicos de amostras clínicas e ambientais de *Cryptococcus neoformans***. São Paulo: SESSP, 2006. 126p. il. Dissertação (Mestrado) - Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo, Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo.

CROFTON, J.; MITCHISON, D. A. Streptomycin resistance in pulmonary tuberculosis. **Br. J. Med.**, v. 2, p. 1009-1015, 1948.

CUELLAR-RODRÍGUEZ, J.; SIERRA-MADERO, J. G. [Infections in solid organ transplant recipients]. **Rev. Invest. Clin.**, v. 57, n. 2. p. 368-380, mar-apr. 2005.

CUENCA-ESTRELLA, M.; GOMEZ-LOPEZ, A.; MELLADO, E.; BUITRAGO, M. J.; MONZON, A.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 Spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, n. 3, p. 917-921, mar. 2006.

CUENCA-ESTRELLA, M.; LEE-YANG, W.; CIBLAK, M. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; MELLADO, E.; WARNOCK, D. W.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. Comparative

evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST broth microdilution procedures for antifungal susceptibility testing of *Candida* species. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 11, p. 3644-3647, nov. 2002a.

CUENCA-ESTRELLA, M.; RODERO, L.; GARCÍA-EFFRÓN, G.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. Antifungal susceptibilities of *Candida* spp. isolated from blood in Spain and Argentina, 1996-1999. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 49, n. 6, p. 981-987, jun. 2002b.

CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L. Present status of the detection of antifungal resistance: the perspective from both sides of the ocean. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 7, Suppl. 2, p. 46-53, 2001.

CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L. Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos en los estudios de sensibilidad? **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 19, p. 133-138, 2002.

CZEMBOR, P. C.; ARSENIUK, E. Study of genetic variability among monopycnidial and monopycnidiospore isolates derived from single pycnidia of *Stagonospora* spp. And *Septoria tritici* with the use of RAPD-PCR, MP-PCR and rep-PCR techniques. **J. Phytopathol.**, v. 147, p. 539-546, 1999.

DALE, D. C.; GUERRY, D.; WEWERKA, J. R. Chronic neutropenia. **Medicine**, v. 58, p. 128-144, 1979.

DALMAU, L. M. Observations on mycological technique with particular reference to pathogenic fungi. **P. R. J. Public Health Trop. Med.**, v. 5, p. 302-311, 1929..

DANZIGER-ISAKOV, L. Infectious diseases in pediatric transplantation: literature review 2005-2006. **Pediatr. Transplant.**, v. 11, n. 6, p. 595-600, sep. 2007.

DASSANAYAKE, R. S.; SAMARANAYAKE, L. P. Amplification-based nucleic acid scanning techniques to assess genetic polymorphism in *Candida*. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 29, n. 1, p. 1-24, 2003.

DEALLER, S. F. *Candida albicans* colony identification in 5 minutes in a general microbiology laboratory. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, n. 5, p. 1081-1082, may 1991.

DI NUZZO, D. V. P. & FONSECA, S. F. Sickle cell disease and infection. **J. Pediatr.**, v. 80, p. 347-354, 2004.

DIAMOND, R. D.; HAUDENSCHILD, C. C. Monocyte-mediated serum-independent damage to hyphal and pseudohyphal forms of *Candida albicans in vitro*. **J. Clin. Invest.** v. 67, p. 173-182, 1981.

DICTAR, M. O.; MAIOLO, E.; ALEXANDER, B.; JACOB, N.; VERÓN, M. T. Mycoses in the transplant patient. **Med. Mycol.**, v. 38 (suppl 1), p. 251-258, 2000.

DIMOPOULOS, G.; KARABINIS, A.; SAMONIS, G.; FALAGAS, M. E. Candidemia in immunocompromised and immunocompetent critically ill patients: a prospective comparative study. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 26, n. 6, p. 377-384, jun. 2007.

DIMOPOULOS, G.; VELEGRAKI, A.; FALAGAS, M. E. A 10-year survey of antifungal susceptibility of candidemia isolates from intensive care unit patients in Greece. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 53, n. 3, p. 1242-1244, mar. 2009.

DOLANDE-FRANCO, M. E. ; REVIKINA, V. ; PANIZO, M. M. ; MACERO, C. ; MORENO, X. ; CALVO, A. ; SELGRAD, S. ; PAPTATZIKOS, J. ; VERGARA, V. ; MENDOZA, M. J. [Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* clinical isolations coming from six health care centers in the metropolitan area of Caracas, Venezuela (years 2003-2005)]. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 25, n. 1, p. 17-21, mar. 2008.

DONNELLY, J. P. Symptoms and diagnosis of nosocomial fungal infections-state-of-the-art. **Eur. J. Med. Res.**, v. 7, n. 5, p. 192-199, 2002.

DOOLEY, D. P.; BECKIUS, M. L.; JEFFREY, B. S. Misidentification of clinical yeast isolates by using the updated Vitek Yeast Biochemical Card. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 12, p. 2889-2892, dec. 1994.

EDWARDS, M. C.; GIBBS, R. A. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. **PCR Methods Appl.** v. 3, n. 4, p. S65-S75, feb. 1994.

EGUSA, H.; SOYSA, N. S.; ELLEPOLA, A. N.; YATANI, H.; SAMARANAYAKE, L. P. Oral candidosis in HIV-infected patients. **Curr. HIV Res.**, v. 6, n. 6, p. 485-499, nov. 2008.

ELLEPOLA, A. N.; MORRISON, C. J. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. **J. Microbiol.**, v. 43, Spec., n. 65-84, feb. 2005.

ELLIS M. Febrile neutropenia. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1138, p. 29-50, sep. 2008.

ELLIS, M. Invasive fungal infection: evolving challenges for diagnosis and therapeutics. **Mol. Immunol.**, v. 38, p. 947-957, 2001.

EL-ZAATARI, M.; PASARELL, L.; MCGINNIS, M. R.; BUCKNER, J.; LAND, G. A.; SALKIN, I. F. Evaluation of the updated Vitek yeast identification data base. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, n. 9, p. 1938-1941, sep. 1990.

EMORI, T. G.; GAYNES, R. P. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, n. 4, p. 428-442, oct. 1993.

EPSTEIN, J. B.; POLSKY, B. Oropharyngeal candidiasis: a review of its clinical spectrum and current therapies. **Clin. Ther.**, v. 20, n.1, p. 40-57, 1998.

ESPINEL-INGROFF, A. Clinical utility of *in vitro* antifungal susceptibility testing. **Rev. Esp. Quimioter.** v. 13, n. 2, p. 1-7, 2000.

ESPINEL-INGROFF, A. Comparison of three commercial assays and a modified disk diffusion assay with two broth microdilution reference assays for testing zygomycetes, *Aspergillus* spp., *Candida* spp., and *Cryptococcus neoformans* with posaconazole and amphotericin B. **J. Clin. Microbiol.** v. 44, n. 10, p. 3616-3622, oct. 2006.

ESPINEL-INGROFF A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 25, n. 2, p. 101-106, jun. 2008.

ESPINEL-INGROFF, A.; BARCHIESI, F.; CUENCA-ESTRELLA, M.; PFALLER, M. A.; RINALDI, M.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; VERWEIJ, P. E. International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 8, p. 3884-3889, aug. 2005.

ESPINEL-INGROFF, A.; BARCHIESI, F.; HAZEN, K. C.; MARTINEZ-SUAREZ, J. V.; SCALISE, G. Standardization of antifungal susceptibility testing and clinical relevance. **Med. Mycol.**, v. 36 (Suppl. I), p. 68-78, 1998.

ESPINEL-INGROFF, A.; CANTON, E.; GIBBS, D.; WANG, A. Correlation of Neo-Sensitabs tablet diffusion assay results on three different ágar media with CLSI broth microdilution M27-A2 and disk diffusion M44-A results for testing susceptibilities of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B, caspofungin, fluconazole, itraconazole, and voriconazole. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 3, p. 858-864, mar. 2007.

EUCAST - European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing. **EUCAST clinical MIC breakpoints. Antimicrobials for *Candida* infections: fluconazole breakpoints.** Version 1.0. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Taufkirchen, Germany, 2007.

EUCAST - European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing. **Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds.** Definitive document E.Def. 9.1. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Taufkirchen, Germany, 2008b.

EUCAST - European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing. **Method for the determination of minimum inhibitory concentration (mic) by broth dilution of fermentative yeasts.** Definitive document E.Def. 7.1. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Taufkirchen, Germany, 2008a.

EUCAST - European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing. **Method for the determination of minimum inhibitory concentration (mic) by broth dilution of**

fermentative yeasts. Discussion document E.Dis. 7.1. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Taufkirchen, Germany, 2002.

FAVERO, A. Management of fungal infections in neutropenic patients: more doubts than certainties? **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 16, p. 135-137, 2000.

FENN, J. P.; SEGAL, H.; BARLAND, B.; DENTON, D.; WHISENANT, J.; CHUN, H.; CHRISTOFFERSON, K.; HAMILTON, L.; CARROLL, K. Comparison of updated Vitek Yeast Biochemical Card and API 20C yeast identification systems. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 5, p. 1184-1187, may 1994.

FERRAZ, A. B.; FERRAZ, E. M.; BACELAR, T. S. Infecção da ferida cirúrgica. In: Ferraz EM. **Infecção em cirurgia.** São Paulo: MEDSI; 1997. p. 267-277.

FIDEL, P. L. History and update on host defense against vaginal candidiasis. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 57, n. 1, p. 2-12, jan. 2007.

FIGUEIREDO, V. T.; DE ASSIS-SANTOS, D.; RESENDE, M. A.; HAMDAN, J. S. Identification and in vitro antifungal susceptibility testing of 200 clinical isolates of *Candida* spp. responsible for fingernail infections. **Mycopathologia**, v. 164, n. 1, p. 27-33, jul. 2007.

FILIOTI, J.; SPIROGLOU, K.; PANTELIADIS, C. P.; ROILIDES, E. Invasive candidiasis in pediatric intensive care patients: epidemiology, risk factors, management, and outcome. **Intensive Care Med.**, v. 33, n. 7, p. 1272-1283, jul. 2007.

FISHMAN, J. A. Infection in solid-organ transplant recipients. **N. Engl. J. Med.**, v. 357, n. 25, p. 2601-2614, dec. 2007.

FONTANA, R. T. As infecções hospitalares e a evolução histórica das infecções. **Rev. Bras. Enferm.** v. 59, n. 5, p. 703-706, set./out. 2006.

FOONGLADDA, S.; HAOUHARN, P.; SAKULMAIWATANA, P.; CHAIPRASERT, A. Comparative evaluation of Candi Select test and conventional methods for identification of *Candida albicans* in routine clinical isolates. **Mycoses**, v. 45, n. 3-4, p. :75-78, apr. 2002.

FOTEDAR, R.; AL-HEDAITHY, S. S. Identification of chlamyospore-negative *Candida albicans* using CHROMagar *Candida* medium. **Mycoses**, v. 46, n. 3-4, p. 96-103, apr. 2003.

FOTHERGILL, A. W.; RINALDI, M. G.; SUTTON, D. A. Antifungal susceptibility testing. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 20, n. 3, p. 699-709, sep. 2006.

FOXMAN, B.; RILEY, L. Molecular epidemiology: focus on infection. *Am J Epidemiol.* V. 153, n. 12, p. 1135-41, jun. 2001.

FRANCIS, P.; WALSH, T. J. Approaches to the management of fungal infections in cancer patients: Part 2. **Oncology**, v. 6, p. 133-148, 1992

FREYDIERE, A. M. Evaluation of CHROMagar *Candida* plates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 8, p. 2048, aug. 1996.

FREYDIERE, A. M.; GUINET, R.; BOIRON, P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. **Med. Mycol.**, v. 39, n. 1, p. 9-33, feb. 2001.

FRIDKIN, S. K. The changing face of fungal infections in health care settings. **Clin Infect Dis.**, v. 41, n. 10, p. 1455-1460, nov. 2005.

FRIDKIN, S. K.; JARVIS, W. R. Epidemiology of nosocomial fungal infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 9, n. 4, p. 499-511, 1996.

FRIEDRISH, J. R. Cirurgia e anestesia na doença falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemater.** v. 29, n. 3, p. 304-308, 2007.

FUJITA, S.; SENDA, Y.; NAKAGUCHI, S.; HASHIMOTO, T. *Multiplex* PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 10, 3617-3622, oct. 2001.

GAFTER-GVILI, A.; VIDAL, L.; GOLDBERG, E.; LEIBOVICI, L.; PAUL, M. Treatment of invasive candidal infections: systematic review and meta-analysis. **Mayo Clin. Proc.** V. 83, n. 9, p. 1011-1021, sep. 2008.

GALA-PERALTA, S.; CARDESA-SALZMAN, T.; GARCÍA-GARCÍA, J. J.; ESTELLA-AGUADO, J.; GENÉ-GIRALT, A.; LUACES-CUBELLS, C. [Bacteraemia risk criteria in the paediatric febrile neutropenic cancer patient. **Clin. Transl. Oncol.**, v. 7, n. 4, p. 165-168, may 2005.

GALBÁN, B.; MARISCAL, F. [Epidemiology of candidemia in ICU]. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 23, n. 1, p. 12-15, mar. 2006.

GARCÍA-MARTOS, P.; GARCÍA-AGUDO, R.; HERNÁNDEZ-MOLINA, J. M.; MARÍN, P.; TALLERO, E.; MIRA, J. [Identification of yeasts of clinical interest on CHROMagar Candida culture Medium]. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 15, n. 3, p. 131-5, sep. 1998.

GAREY, K. W.; REGE, M.; PAI, M. P.; MINGO, D. E.; SUDA, K. J.; TURPIN, R. S.; BEARDEN, D. T. Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, n. 1, p. 25-31, jul. 2006.

GARRIDO, R. S.; AGUADO, J. M.; DÍAZ-PEDROCHE, C.; LEN, O.; MONTEJO, M.; MORENO, A.; GURGUÍ, M.; TORRE-CISNEROS, J.; PAREJA, F.; SEGOVIA, J.; GARCIA, M.; LUMBRERAS, C. A review of critical periods for opportunistic infection in the new transplantation era. **Transplantation**, v. 82, n. 11, p. 1457-1462, dec. 2006.

GEORGOPAPADAKOU, N. H. Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drug. **Cur. Opin. Microbiol.**, v. 1, n. 5, p. 547-57, 1998.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation do these mechanisms with bacterial resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, n. 4, p. 501-517, 1999.

GIL-LAMAIGNERE, C.; ROILIDES, E.; HACKER, J.; MULLER F. M. Molecular typing for fungi--a critical review of the possibilities and limitations of currently and future methods. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 9, n. 3, p. 172-85, 2003.

GIRAO, E.; LEVIN, A. S.; BASSO, M.; GOBARA, S.; GOMES, L. B.; MEDEIROS, E. A.; COSTA, S. F. Seven-year trend analysis of nosocomial candidemia and antifungal (fluconazole and caspofungin) use in Intensive Care Units at a Brazilian University Hospital. **Med. Mycol.**, v. 10, p. 1-8, apr. 2008.

GIRMENIA, C.; CIMINO, G.; DI CRISTOFANO, F.; MICOZZI, A.; GENTILE, G.; MARTINO, P. Effects of hydration with salt repletion on renal toxicity of conventional amphotericin B empirical therapy: a prospective study in patients with hematological malignancies. **Support Care Cancer**, v. 13, n. 12, p. 987-992, dec. 2005.

GODOY, P.; TIRABOSCHI, I. N.; SEVERO, L. C.; BUSTAMANTE, B.; CALVO, B.; ALMEIDA, L. P.; DA MATTA, D. A.; COLOMBO, A. L. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 401-405, apr. 2003.

GOLAN, Y. Overview of transplant mycology. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 62 (8 Suppl. 1), p. S17-S21, 2005.

GOMEZ-LOPEZ, A.; MELLADO, E.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA-ESTRELLA, M.; Susceptibility profile of 29 clinical isolates of *Rhodotorula* spp. and literature review. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 55, n. 3, p. 312-6, mar. 2005.

GOWARDMAN, J. R.; MONTEGOMERY, C.; THIRLWELL, S.; SHEWAN, J.; IDEMA, A.; LARSEN, P. D.; HAVILL, J. C. Central venous catheter-related bloodstream infections: an analysis of incidence and risk factors in a cohort of 400 patients. **Intensive Care Med.**, v. 24, p. 1034-1039, 1998.

GRAZEBROOK, J. Hospital-acquired Infection. Counting the cost of infection. **Nurs. Times**, v. 82, n. 6, p. 24-26, feb. 1986.

GREENE, J. Catheter-related complications of cancer therapy. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 10, n. 2, p. 255-295, 1996.

GROHSKOPF, L. A.; ANDRIOLE, V. T. Medical reviews: systemic *Candida* infections. **Yale J. Biol. Med.**, v. 69, p. 505-515, 1997.

GROLL, A. H.; WALSH, T. Antifungal chemotherapy: advances and perspectives. **Swiss Med. Wkly.** , v. 132, p. 303-311, 2002a.

GROLL, A. H.; WALSH, T. J. Invasive fungal infections in the neutropenic cancer patient: current approaches and futures strategies. **Infect. Med.**, v. 19, n. 7, p. 326-334, 2002b.

GUDLAUGSSON, O.; GILLESPIE, S.; LEE, K.; VANDE-BERG, J.; HU, J.; MESSER, S.; HERWALDT, L.; PFALLER, M.; DIEKEMA D. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. **Clin. Infect. Dis.**, v. 37, n. 9, p. 1172-1177, nov. 2003.

GUELFAND, L.; GRISOLÍA, P.; BOZZANO, C.; KAUFMAN, S. [Comparison of methods for the identification of the most common yeasts in the clinical microbiology laboratory]. **Rev. Argent. Microbiol.**, v. 35, n. 1, p. 49-53, jan.-mar., 2003.

GUERY, B. P.; ARENDRUP, M. C.; AUZINGER, G.; AZOULAY, E.; BORGES-SÁ, M.; JOHNSON E. M.; MÜLLER, E.; PUTENSEN, C.; ROTSTEIN, C.; SGANGA, G.; VENDITTI, M.; ZARAGOZA-CRESPO, R.; KULLBERG, B. J. Management of invasive candidiasis and candidemia in adult non-neutropenic intensive care unit patients: Part I. Epidemiology and diagnosis. **Intensive Care Med.**, v. 35, n.1, p. 55-62, jan. 2009a.

GUERY, B. P.; ARENDRUP, M. C.; AUZINGER, G.; AZOULAY, E.; BORGES-SÁ, M.; JOHNSON, E. M.; MÜLLER, E.; PUTENSEN, C.; ROTSTEIN. C.; SGANGA, G.; VENDITTI, M.; ZARAGOZA-CRESPO, R.; KULLBERG, B. J. Management of invasive candidiasis and candidemia in adult non-neutropenic intensive care unit patients: Part II. Treatment. **Intensive Care Med.**, *in press* 2009b.

GULER, S.; URAL, O.; FINDIK, D.; ARSLAN, U. Risk factors for nosocomial candiduria. **Saudi Med. J.**, v. 27, n. 11, p. 1706-1710, nov. 2006.

GUO, J. R.; SCHNIEDER, F.; ABD-ELSALAM, K. A.; VERREET, J. A. Rapid and efficient extraction of genomic DNA from different phytopathogenic fungi using DNAzol reagent. **Biotechnol. Lett.**, v. 27, n. 1, p. 3-6, jan. 2005.

GUTIERREZ, J.; MARTIN, E.; LOZANO, C.; CORONILLA, J.; NOGALES, C. Evaluation of the ATB 32C, automicrobic system and API 20C using clinical yeast isolates. **Ann. Biol. Clin.** (Paris). v. 52, n. 6, p. 443-6, 1994.

HA, U. S.; CHO, Y. H. Catheter-associated urinary tract infections: new aspects of novel urinary catheters. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 28, n. 6, p. 485-490, dec. 2006.

HAGE, C. A.; GOLDMAN, M.; WHEAT, L. J. Mucosal and invasive fungal infections in HIV/AIDS. **Eur. J. Med. Res.**, v. 7, p. 236-241, 2002.

HAMERSCHLAK, N. Leukemia: genetics and prognostic factors. **J. Pediatr.**, v. 84, suppl. 4, 2008; p. S55-S57, 2008.

HAUTALA, T.; KAKKO, S.; SIITONEN, T.; SAILY, M.; KOISTINEN, P.; KOSKELA, M.; Clinical *Candida krusei* isolates remain susceptible during extensive exposure to antifungal drugs. **Med. Mycol.**, v. 4, p. 1-6, feb. 2009.

HAZEN K. C. New And emerging yeast pathogens. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 8, p. 462-478, 1995.

HEALY, C. M.; BAKER, C. J. Fluconazole prophylaxis in the neonatal intensive care unit. **Pediatr. Infect. Dis . J.**, v. 28, n. 1, p. 49-52, jan. 2009.

HEELAN, J. S.; SILIEZAR, D.; COON, K. Comparison of rapid testing methods for enzyme production with the germ tube method for presumptive identification of *Candida albicans*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 11, p. 2847-2849, nov. 1996.

HENEGARIU, O.; HEEREMA, N. A.; DLOUHY, S. R.; VANCE, G. H.; VOGT, P. H. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. **Biotechniques**. v. 23, n. 3, p. 504-511, sep. 1997.

HENRIQUES. M.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. *Candida* species adhesion to oral epithelium: factors involved and experimental methodology used. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 32, n. 4, p. 217-226, oct.-dec. 2006.

HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Q. Rev. Biol.**, v. 66, p. 411-453, 1991.

HIRSHOREN, N.; ELIASHAR, R.; WEINBERGER, J. M. *Candida* epiglottitis: a rare emergent condition - appearance, treatment and pitfalls. **Eur. J. Intern. Med.**, v. 19, n. 8, p. e84-e85, dec. 2008.

HOBSON, R. P. The global epidemiology of invasive candida infections – is the tide turning? **J. Hosp. Infect.**, v. 55, p. 159-168, 2003.

HOHL, T. M.; RIVERA, A.; PAMER, E. G. Immunity to fungi. *Curr. Opin. Immunol.*, v. 18, n. 4, p. 465-472, aug. 2006.

HOLZHEIMER, R. G.; DRALLE, H. Management of mycoses in surgical patients. **Eur. J. Med. Res.**, v. 7, p. 200-226, 2002.

HOPPE, J. E.; FREY, P. Evaluation of six commercial tests and the germ-tube test for presumptive identification of *Candida albicans*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 18, n. 3, p.188-191, mar. 1999.

HORVATH, L. L.; HOSPENTHAL, D. R.; MURRAY, C. K.; DOOLEY, D. P. Direct isolation of *Candida* spp. from blood cultures on the chromogenic medium CHROMagar Candida. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 6, p. 2629-2632, jun. 2003.

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 chromogenic medium CHROMagar Candida. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.**, v. 5, p. 1-5, jan. 2006.

HOSPENTHAL, D. R., MURRAY, C. K.; RINALDI, M. G. The role of antifungal susceptibility testing in the therapy of candidiasis. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 48, p. 153-160, 2004.

HÜBEL, K.; CHEMNITZ, J.; BROCHHAGEN, H. G.; CORNELLY, O. A. Successful treatment of chronic disseminated candidiasis with caspofungin and itraconazole in a

patient with progressive acute leukemia and prolonged neutropenia. **Int. J. Hematol.**, v. 79, n. 3, p. 289-292, apr. 2004.

ITURRY-YAMAMOTO, G. R.; PORTINHO, C. P. Sistema complemento: ativação, regulação e deficiências congênitas e adquiridas. **Rev. Ass. Med. Brasil.** v. 47, n. 1, p. 41-51, 2001.

JARVIS, W. R. The Epidemiology of colonization. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 17, p. 47-52, 1996.

JOHNSON, E. M. Issues in antifungal susceptibility testing. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 61, Suppl. 1, p. i13-i18, jan. 2008.

KALIL, A. C.; DAKROUB, H.; FREIFELD, A. G. Sepsis and solid organ transplantation. **Curr. Drug Targets.**, v. 8, n. 4, p. 533-541, apr. 2007.

KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clin. Infect. Dis.**, v. 46, n. 1, p. 120-128, jan. 2008.

KAUFFMAN, C. A. Candiduria. **Clin. Infect. Dis.**, v. 41, Suppl. 6, p. S371-S376, sep. 2005.

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. Y.; DISMUKES, W. E. Prospective Multicenter Surveillance Study of Funguria in Hospitalized Patients. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, p. 14-18, 2000.

KEDZIERSKA, A.; KOCHAN, P.; PIETRZYK, A.; KEDZIERSKA, J. Current status of fungal cell wall components in the immunodiagnostics of invasive fungal infections in humans: galactomannan, mannan and (1-->3)-beta-D-glucan antigens. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 26, n. 11, p. 755-766, nov. 2007.

KENNEDY, H. F.; SHANKLAND, G. S.; BAGG, J.; CHALMERS, E. A.; GIBSON, B. E.; WILLIAMS, C. L. Fluconazole and itraconazole susceptibilities of *Candida* spp. isolated from oropharyngeal specimens and blood cultures of paediatric haematology/oncology patients. **Mycoses**, v. 49, n. 6, p. 457-462, nov. 2006.

KLEPSEK, M. E. Antifungal resistance among *Candida* species. **Pharmacotherapy**, v. 21, n. 8S, p. 124S-132S, 2001.

KOCH, S.; HAEFNER, H.; HUENGER, F.; HAASE, G.; WILDBERGER, J.; LEMMEN, S. W. [Diagnostics and therapy for invasive fungal infections in an intensive care unit]. **Anaesthesist**, v. 54, n. 10, p. 1047-1064, oct. 2005.

KOEHLER, A. P.; CHU, K. C.; HOUANG, E. T.; CHENG, A. F. Simple, reliable, and cost-effective yeast identification scheme for the clinical laboratory. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 2, p. 422-426, feb. 1999.

KONTNY, U.; WALSH, T. J.; ROSSLER, J.; UHL, M.; NIEMEYER, C. M. Successful treatment of refractory chronic disseminated candidiasis after prolonged administration of caspofungin in a child with acute myeloid leukemia. **Pediatr. Blood Cancer**, v. 49, n. 3, p. 360-362, sep. 2007.

KONTOYIANNIS, D. P.; LEWIS, R. E. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. **Lancet**, v. 359, p. 1135-1144, 2002.

KONTOYIANNIS, D. P.; VAZIRI, I.; HANNA, H. A.; BOKTOUR, M.; THORNBURY, J.; HACHEM, R.; BODEY, G. P.; RAAD, I. I. Risk Factors for *Candida tropicalis* fungemia in patients with cancer. **Clin. Infect. Dis.**, v. 33, n. 10, p.1676-1681, nov. 2001.

KOSMIN, A. R.; FEKETE, T. Use of fungal blood cultures in an academic medical center. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, n. 11, p. 3800-3801, nov. 2008.

KRCMERY, V.; KALAVSKY, E. Antifungal drug discovery, six new molecules patented after 10 years of feast: why do we need new patented drugs apart from new strategies? **Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.**, v. 2, n. 3, p.:182-187, nov. 2007.

KULLBERG, B. J.; OUDE-LASHOF, A. M. L. Epidemiology of opportunistic invasive mycoses. **Eur. J. Med. Res.**, v. 7, p. 183-191, 2002.

KUMAMOTO, C. A.; VINCES, M. D. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. **Cell Microbiol.**, v. 7, n. 11, p.1546-1554, nov. 2005.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The Yeasts, a taxonomic study**. 4th ed. Amsterdam: Elsevier Scientific. 1998, 1074p.

LACERDA, R. A. Produção científica nacional sobre infecção hospitalar e a contribuição da enfermagem: ontem, hoje e perspectivas **Rev. Lat. Am. Enferm.**, v. 10, n. 1, p. 55-63, 2002.

LAET SANT'ANA, P.; MILAN, E. P.; MARTINEZ, R.; QUEIROZ-TELLES, F.; FERREIRA, S.; ALCÂNTARA, A. P.; CARVALHO, M. T.; COLOMBO, A. L. Multicenter Brazilian Study of Oral *Candida* Species Isolated from Aids Patients. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 2, p. 253-257, mar. 2002

LAGROU, K.; VERHAEGEN, J.; PEETERMANS, W. E.; DE RIJDT, T.; MAERTENS, J.; VAN WIJNGAERDEN, E. Fungemia at a tertiary care hospital: incidence, therapy, and distribution and antifungal susceptibility of causative species. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 26, n. 8, p. :541-547, aug. 2007.

LARS-FLÖRL, C; CUENCA-ESTRELLA, M.; DENNING, D. W.; RODRÍGUEZ-TUDELA, R. L. Antifungal susceptibility-testing in *Aspergillus* species. **Med. Mycol.**, v. 44, p. S319-S325, sep. 2006.

LARS-FLÖRL, C; PERKHOFER, S. *In vitro* susceptibility testing in *Aspergillus* spp. according to EUCAST methodology. **Mycosis.**, v. 51, n. 5 p. 437-446, apr. 2008.

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. **J. Clin. Microbiol.**,v. 46, n. 9, p. 3021-3027, sep. 2008.

LEAL, A. L.; FAGANELLO, J.; BASSANESI, M. C., VAINSTEIN, M. H. *Cryptococcus* species identification by *multiplex* PCR. **Med. Mycol.**, v. 4, n. 6, p. 377-383, jun. 2008.

LEATHER, L. H.; WINGARD, J. R. Infections following hematopoietic stem cell transplantation. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 15, n. 2, p. 483-520, 2001.

LEAW, S. N.; CHANG, H. C.; SUN, H. F.; BARTON, R.; BOUCHARA, J. P.; CHANG, T. C. Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n.3, p. 693-699., mar. 2006.

LEN, O.; PAHISSA, A. Donor-transmitted infections]. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v. 25, n. 3, p. 204-212, mar. 2007.

LEONE, MARC; ALBANÈSE, J.; GARNIER, F.; SAPIN, C.; BARRAU, K.; BIMAR, K.; MARTIN, C. Risk factors of nosocomial catheter-associated urinary tract infection in a polyvalent intensive care unit. **Intensive Care Med.**, v.29, p. 1077-1080, 2003.

LEVITZ, S. M. Overview of host defenses in fungal infections. **Clin. Infect. Dis.**, v. 14 (Suppl. 1), p. S37-42, 1992.

LEVY, S. B. The challenge of antibiotic resistance. **Sci. Am.**, v. 278, p. 46-53, 1998.

LEVY, S. B. The microbial resistance to antibiotic: a involving and persistent problem. **Lancet**, v. 2, p. 83-88, 1982.

LEWIS, J. S.; GRAYBILL, J. R. Fungicidal versus Fungistatic: what's in a word? **Expert Opin. Pharmacother.**, v. 9, n. 6, p. 927-935, apr. 2008.

LI, Y. L.; LEAW, S. N.; CHEN, J. H.; CHANG, H. C.; CHANG, T. C. Rapid identification of yeasts commonly found in positive blood cultures by amplification of the internal transcribed spacer regions 1 and 2. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 22, n. 11, p. 693-696, nov. 2003.

LIGUORI, G.; DI ONOFRIO, V.; LUCARIELLO, A.; GALLÉ, 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 Microbiol. Immunol.**, v. 24, n. 1, p. 76-78, feb. 2009.

LINTON, C. J.; BORMAN, A. M.; CHEUNG, G.; HOLMES, A. D.; SZEKELY, A.; PALMER, M. D.; BRIDGE, P. D.; CAMPBELL, C. K.; JOHNSON, E. M. Molecular identification of unusual pathogenic yeast isolates by large ribosomal subunit gene sequencing: 2 years of experience at the United Kingdom mycology reference laboratory. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 4, p. 1152-1158, apr. 2007.

LIPP, H. P. Antifungal agents--clinical pharmacokinetics and drug interactions. **Mycoses**, v. 51, Suppl. 1, p. 7-18, 2008.

LIPPERHEIDE, V.; ANDRAKA, L.; PONTÓN, J.; QUINDÓS, G. Evaluation of the albicans IDR plate method for the rapid identification of *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 36, n. 11-12, p. 417-420, nov.-dec. 1993.

LO, H. J.; HO, Y. A.; HO, M. Factors accounting for misidentification of *Candida* species. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 34, n. 3, p. 171-177, sep. 2001.

LOEFFLER, J.; STEVENS, D. A. Antifungal drug resistance. **Clin. Infect. Dis.**, v. 36 (Suppl. 1), p. S31-41, 2003.

LOO, D. S. Systemic antifungal agents: an update of established and new therapies. **Adv. Dermatol.**, v. 22, p.101-124, 2006.

LORTHOLARY O.; DUPONT B. Antifungal prophylaxis during neutropenia and immunodeficiency. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 10, n. 3, p. 477-504, 1997.

LUGARINI, C.; GOEBEL, C. S.; CONDAS, L. A.; MURO, M. D.; DE FARIAS, M. R.; FERREIRA, F. M.; VAINSTEIN, M. H. *Cryptococcus neoformans* Isolated from Passerine and Psittacine bird excreta in the state of Paraná, Brazil. **Mycopathologia**, v. 166, n.2, p. 61-69, aug. 2008

LUMBRERAS, C.; LIZASOAIN, M.; AGUADO, J. M. [Systemic antifungal agents]. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v. 21, n. 7, p. 366-379; aug.-sep. 2003.

LUNDSTROM, T.; SOBEL, J. Nosocomial candiduria: a review. **Clin. Infect. Dis.**, v. 32, p. 1602-1607, 2001.

LUNEL, F. M. V.; MEIS, F. G. M.; VOSS, A. Nosocomial fungal infections: candidemia. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 34, p. 213-220, 1999.

LUO, G.; MITCHELL, T. G. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using *multiplex* PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 8, p. 2860-2865, aug. 2002.

LYMAN, G. H. Risks and consequences of chemotherapy-induced neutropenia. **Clin. Cornerstone**, v. 8, Suppl. 5, p. S12-S18, 2006.

MACHADO, P. R. L.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, L.; CARVALHO E. M. Mecanismo de resposta imune às infecções. **An. Bras. Dermatol.**, v. 79, n. 6, p. 647-664, nov.-dez. 2004.

MAERTENS, J.; BOOGAERTS, M. The place for itraconazole in treatment. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 56, Suppl. 1, p. i33-i38, sep. 2005.

MAERTENS, J.; VREBOS, M.; BOOGAERTS, M. Assessing Risk Factors for Systemic Fungal Infections. **Eur. J. Cancer Care**, v. 10, p. 56-62, 2001.

MAGALHÃES. Alterações renais nas doenças falciformes. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 279-284, 2007.

MAGILL, S. S.; SWOBODA, S. M.; JOHNSON, E. A.; MERZ, W. G.; PELZ, R. K.; LIPSETT, P. A.; HENDRIX, C. W. The association between anatomic site of *Candida* colonization, invasive candidiasis, and mortality in critically ill surgical patients. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 55, n. 4, p. 293-301, aug. 2006.

MAGNUS, S. A.; HAMBLETON, I. R.; MOOSDEEN, F.; SERJEANT, G. R. Recurrent infections in homozygous sickle cell. **Arch. Dis. Child.**, v. 80, p. 537-541, 1999.

MAHAYNI, R.; VASQUEZ, J. A.; ZERVOS, M.J. Nosocomial candidiasis: epidemiology and drug resistance. **Infect. Agents Dis.**, v. 4, n. 4, p. 248-253, 1995.

MAKI, D. G.; KLUGER, D. M.; CRNICH, C. J. The risk of bloodstream infection in adults with different intravascular devices: a systematic review of 200 published prospective studies. **Mayo Clin. Proc.**, v. 81, n. 9, p. 1159-1171, sep. 2006.

MALECH, H. L.; GALLIN J. I. Current concepts: immunology. neutrophils in human diseases. **N. Engl. J. Med.**, v. 317, n. 11, p. 687-94, 1987.

MANUEL R. J.; KIBBLER, C. C. The epidemiology and prevention of invasive aspergillosis. **J. Hosp. Infect.**, v. 39, n.2, p. 95-109, 1998.

MARIE, S. New developments in the diagnosis and management of invasive fungal infections. **Haematologica**, v. 85, p. 88-93, 2000.

MARIK, P. E. Fungal infections in solid organ transplantation. **Expert Opin. Pharmacother.**, v. 7, n. 3, p. 297-305, feb. 2006.

MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N.; MONCANY, M. *Multiplex* polymerase chain reaction: a practical approach. **J. Clin. Lab. Anal.**, v. 16, n.1, p. 47-51., 2002.

MARÓDI, L.; JOHNSTON, R. B. Invasive *Candida* species disease in infants and children: occurrence, risk factors, management, and innate host defense mechanisms. **Curr. Opin. Pediatr.**, v. 19, n. 6, p. 693-697, dec. 2007.

MARR, K. A. Invasive *Candida* infections: the changing epidemiology. **Oncology (Williston Park)**. v. 18, n.14 (Suppl 13), p. 9-14, dec. 2004.

MARR, K. A.; CARTER, R. A.; CRIPPA, F.; WALD, A.; COREY, L. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. **Clin. Infect. Dis.**, v. 34, p. 909-917, 2002.

MARTIN, G. S.; MANNINO, D. M.; EATON, S.; MOSS, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **N. Engl. J. Med.**, v. 348, n. 16, p. 1546-1554, apr. 2003.

MARTINEZ, R. An update on the use of antifungal agents. **J. Bras. Pneumol.**, v. 32, n. 5, p. 449-460, sep.-oct. 2006.

MARTINO, R.; SUBIRÀ, M. Invasive fungal infections in hematology: new trends. **Ann. Hematol.**, v. 81, n. 5, p. 233-243, may 2002.

MASOOD, A.; SALLAH, S. Chronic disseminated candidiasis in patients with acute leukemia: emphasis on diagnostic definition and treatment. **Leuk. Res.**, v. 29, n. 5, p. 493-501, may 2005.

MATSUMOTO, F. E.; DIAS, A. L.; MELHEM, M. S.; SZESZS, M. W.; AULER, M. E.; RUIZ, L. S.; GONÇALVES DA SILVA, E.; GANDRA, R. F.; PAULA, C. R. Antifungal susceptibility of bloodstream yeasts isolated at a public children's hospital in Brazil: comparison of the Etest and the AFST-EUCAST microdilution method. **Can. J. Microbiol.**, v. 53, n. 12, p. 1300-1306, dec. 2007.

MATSUMOTO, F. E.; GANDRA, R. F.; RUIZ, L. S.; AULER, M. E.; MARQUES, S. A.; PIRES, M. F.; 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.

MATTA, D. A.; DE ALMEIDA, L. P.; MACHADO, A. M.; AZEVEDO, A. C.; KUSANO, E. J.; TRAVASSOS, N. F.; SALOMÃO, R.; COLOMBO, A. L. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 57, n. 4, p. 399-404, apr. 2007.

MAYS, S. R.; BOGLE, M. A.; BODEY, G. P. Cutaneous fungal infections in the oncology patient: recognition and management. **Am. J. Clin. Dermatol.**, v. 7, n. 1, p. 31-43, 2006.

MCGINNIS, M.R. **Laboratory handbook of medical mycology**. New York: Academic Press; 1980. 459 p.

MCLINTOCK, L. A.; JONES, B. L. Advances in the molecular and serological diagnosis of invasive fungal infection in haemato-oncology patients. **Br. J. Haematol.**, v. 126, n. 3, p. 289-297, aug. 2004.

MCSWEENEY, P. A.; STORB, R. Bone marrow transplantation for hematologic malignancies and cancer. **Immunol. Allergy Clin. North Am.**, v. 16, n. 2, p. 393-427, 1996.

MÉAN, M.; MARCHETTI, O.; CALANDRA, T. Bench-to-bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. **Crit. Care**, v. 12, n. 1, p. 204., 2008.

MEDRANO, D. J.; BRILHANTE, R. S.; CORDEIRO, R. DE A.; ROCHA, M. F.; RABENHORST, S. H.; SIDRIM, J. J. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Rev. Inst. Méd. Trop. Sao Paulo**. v. 48, n. 1, p. 17-20, jan-feb. 2006.

MEERSSEMAN, W.; LAGROU, K.; MAERTENS, J.; VAN WIJNGAERDEN, E. Invasive aspergillosis in the intensive care unit. **Clin. Infect. Dis.**, v. 45, n. 2, p. 205-216, jul. 2007.

MEHTA, S.; JIANDANI, P.; DESAI, M. Ocular lesions in disseminated candidiasis. **J. Assoc. Physicians India**, v. 55, p. 483-485, jul. 2007.

MELLADO, E.; CUENCA-ESTRELLA M.; RODRÍGUEZ-TUDELA J. L. Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. **Enferm. Infec. Microbiol. Clin.**, v. 20, p. 523-530, 2002.

MELLES, D. C.; MARIE, S. Prevention of infections in hyposplenic and asplenic patients: an update. **Neth. J. Med.** v. 62, n. 2, 45-51, 2004.

MÉNDEZ-ÁLVAREZ, S.; PÉREZ-ROTH, E. La PCR-multiple em microbiologia. **Enferm. Infec. Microbiol. Clin.**, v. 22, n. 3, p.183-192, 2004.

MENSA, J.; PITART, C.; MARCO, F. Treatment of critically ill patients with candidemia. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 32 (Suppl 2), p. S93-S97, nov. 2008.

MESSER, S. A.; JONES, R. N. ; FRITSCHKE, T. R. International surveillance of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp.: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003). **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 5, p. 1782-1787, may 2006.

MESSER, S. A.; MOET, G. J.; KIRBY, J. T.; JONES, R. N. Activity of Contemporary Antifungal Agents, including the Novel Echinocandin Anidulafungin, Tested Against *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. and *Aspergillus* spp.: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-2007). **J. Clin. Microbiol.**, apr. 2009.

MESSINA, C.; FARACI, M.; DE FAZIO, V.; DINI, G.; CALÒ, M. P.; CALORE, E; EBMT PAEDIATRIC WORKING PARTY. Prevention and treatment of acute GvHD. **Bone Marrow Transplant**, v. 41, Suppl. 2, p. S65-S70, jun. 2008.

MILDE, K.; KOSTKA, V.; KALETA, E. F.; WILLEMS, H.; JÄGER, C. Multiplex-PCR-based differentiation and characterization of *Candida*-isolates derived from tortoises (Testudinidae). **Vet. Microbiol.**, v. 76, n. 4, p. 395-402, oct. 2000.

MILICI, M. E.; MAIDA, C. M.; SPREGHINI, E.; RAVAZZOLO, B.; OLIVERI, S.; SCALISE, G.; BARCHIESI, F. Comparison between disk diffusion and microdilution methods for determining susceptibility of clinical fungal isolates to caspofungin. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 11, p. 3529-3533, nov. 2007.

MIRHENDI, H.; DIBA, K.; REZAEI, A.; JALALIZAND, N.; HOSSEINPUR, L.; KHODADADI, H. Colony-PCR is a rapid and sensitive method for DNA amplification in yeasts. **Iranian J. Publ. Health**, v. 36, n. 1, p. 40-44, 2007.

MISHRA, N. N.; PRASAD, T.; SHARMA, N.; PAYASI, A.; PRASAD, R.; GUPTA, D. K.; SINGH, R. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. A review. **Acta Microbiol. Immunol. Hung.**, v. 54, n. 3, p. 201-235, sep. 2007.

MOEN, M. D, Lyseng-Williamson KA, Scott LJ. Liposomal amphotericin B: a review of its use as empirical therapy in febrile neutropenia and in the treatment of invasive fungal infections. **Drugs**, v. 69, n. 3, p. 361-92, 2009.

MOHAN-DAS, V.; BALLAL, M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 25, n. 4, p. 208-210, dec. 2008.

MONDAL, R. K.; SINGHI, S. C.; CHAKRABARTI, A. M J. Randomized comparison between fluconazole and itraconazole for the treatment of candidemia in a pediatric

intensive care unit: a preliminary study. **Pediatr. Crit. Care Med.**, v. 5, n. 6, p. 561-5, nov. 2004.

MONTEJO, M. [Invasive infection by *Aspergillus* and other filamentous fungi in solid organ transplant recipients]. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 19, n. 1, p. 9-12, mar. 2002.

MORRELL, M; FRASER, V. J.; 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. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, n. 9, p. 3640-3645, sep. 2005.

MOSS, H. A.; ELLIOT T. S. J. The cost of infections related to central venous catheters designed for long-term use. **Br. J. Med. Econ.**, v. 11, p. 1-7, 1997.

MULHALL, B. P.; WONG, R. K. Infectious Esophagitis. **Curr. Treat. Options Gastroenterol.**, v. 6, n. 1, p. 55-70, feb. 2003.

MULLAOGLU, S.; TURKTAS, H.; KOKTURK, N.; TUNCER, C.; KALKANCI, A.; KUSTIMUR, S. Esophageal candidiasis and *Candida* colonization in asthma patients on inhaled steroids. **Allergy Asthma Proc.**, v. 28, n. 5, p. 544-549, sep.-oct. 2007.

MURRAY, C. K.; BECKIUS, M. L.; GREEN, J. A.; HOSPENTHAL, D. R. Use of chromogenic medium in the isolation of yeasts from clinical specimens. **J. Med. Microbiol.**, v. 54, (Pt 10), p. 981-985, oct. 2005.

MURRAY, C. K.; LOO, F. L.; HOSPENTHAL, D. R.; CANCIO, L. C.; JONES, J. A.; KIM, S. H.; HOLCOMB, J. B.; WADE, C. E.; WOLF, S. E. Incidence of systemic fungal infection and related mortality following severe burns. **Burns**, v. 34, n. 8, p. 108-112, dec. 2008.

NAGAO, K.; OTA, T.; TANIKAWA, A.; TAKAE, Y.; MORI, T.; UDAGAWA, S., NISHIKAWA, T. Genetic identification and detection of human pathogenic *Rhizopus* species, a major mucormycosis agent, by multiplex PCR based on internal transcribed spacer region of rRNA gene. **J. Dermatol. Sci.**, v. 39, n. 1, p. 23-31, jul. 2005.

NÁGARAJA, P. A.; MATHEW, T.; SHETTY, D. P. *Candida tropicalis* causing prosthetic valve endocarditis. **Indian J. Med. Microbiol.**, v. 23, n. 2, p. 139-140, apr. 2005.

NAKAMURA, T.; TAKAHASHI, H. Epidemiological study of *Candida* infections in blood: susceptibilities of *Candida* spp. to antifungal agents, and clinical features associated with the candidemia. **J. Infect. Chemother.**, v. 12, n. 3, p. 132-138, jun. 2006.

NAUFEL, C. C. S.; BRAGA, J. A. P.; CANÇADO, R. D.; LANGHI JR., D. M.; BORDIN, J. O. [Hyper-hemolytic transfusional reaction in sickle cell patients: two case reports]. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 24, n. 4, p. 292-299, oct.-dez. 2002.

NEELY, M. N.; GHANNOUM, M. A. The exciting future of antifungal therapy. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 19, n. 12, p. 897-914, dec. 2000.

NEOFYTOS, D.; HORN, D.; ANAISSIE, E.; STEINBACH, W.; OLYAEI, A.; FISHMAN, J.; PFALLER, M.; CHANG, C.; WEBSTER, K.; MARR, K. Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance registry. **Clin Infect Dis.**, v. 48, n. 3, p. 265-273, 2009.

NEOFYTOS, D.; HORN, D.; DE SIMONE, J. A. JR. *Rhodotorula glutinis* catheter related fungemia in a patient with sickle cell disease: case presentation and literature review. **South Med. J.**, v. 100, n. 2, p. 198-200, feb. 2007.

NETH, O. W.; BAJAJ-ELLIOTT, M.; TURNER, M. W.; KLEIN, N. J. Susceptibility to infection in patients with neutropenia: the role of the innate immune system. **Br. J. Haematol.**, v. 129, n. 6, p. 713-722, jun. 2005.

NGUYEN, M. H.; PEACOCK, J. E. JR.; MORRIS, A. J.; TANNER, D. C.; NGUYEN, M. L.; SNYDMAN, D. R.; WAGENER, M. M.; RINALDI, M. G.; YU, V. L. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. **Am. J. Med.**, v. 100, n. 6, p. 617-23, 1996.

NGUYEN, M. H.; PEACOCK, J. E. JR.; TANNER, D. C.; MORRIS, A. J.; NGUYEN, M. L.; SNYDMAN, D. R.; WAGENER, M. M.; YU, V. L. Therapeutic approaches in patients with candidemia. Evaluation in a multicenter, prospective, observational study. **Arch. Intern. Med.**, v. 155, n. 22, p. 2429-2435, dec. 1995.

NOLTE, F. S. Case studies in cost effectiveness of molecular diagnostics for infectious diseases: pulmonary tuberculosis, enteroviral meningitis, and BK vírus nephropathy. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, n. 11, p. 1463-1467, dec. 2006.

NOLTE, F. S.; PARKINSON, T.; FALCONER, D. J.; DIX, S.; WILLIAMS, J.; GILMORE, C.; GELLER, R.; WINGARD, J. R.; Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, n. 1, p. 196-199, jan. 1997.

NUCCI, M. Candiduria in hospitalized patients: a review. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 4, n. 4, p. 168-172, 2000.

NUCCI, M.; ANAISSIE, E. Revising the source of candidemia skin or gut? **Clin. Infect. Dis.**, v. 33, p. 1959-1967, 2001.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 58, n. 1, p. 77-82, may 2007.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L. Risk factors for breakthrough candidemia. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 21, n. 3, p. 209-211, mar. 2002.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L.; SILVEIRA, F.; RICHTMANN, R.; SALOMÃO, R.; BRANCHINI, M. L.; SPECTOR, N. Risk factors for death in patients with candidemia. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 19, p. 846-850, 1998a.

NUCCI, M.; MARR, K. Emerging fungal diseases. **Clin. Infect. Dis.**, v. 41, p. 521-526, 2005.

NUCCI, M.; PERFECT, J. R. When primary antifungal therapy fails. **Clin. Infect. Dis.**, v. 46, n. 9, p. 426-33, may 2008.

NUCCI, M.; SILVEIRA, M. I.; SPECTOR, N.; SILVEIRA, F.; VELASCO, E.; AKITI, T.; BARREIROS, G.; DEROSSI, A.; COLOMBO A. L.; PULCHERI, W. Risk factors for death among cancer patient with fungemia. **Clin. Infec. Dis.**, v. 27, p. 107-111, 1998b.

NUCCI, M.; SILVEIRA, M. I.; SPECTOR, N.; SILVEIRA, F.; VELASCO, E.; MARTINS, C. A.; DEROSI, A.; COLOMBO A. L.; PULCHERI, W. Fungemia in cancer patients in Brazil: predominance of non-*albicans* Species. **Mycopathol.**, v. 141, p. 65-68, 1998c.

O'GRADY, N. P. O.; ALEXANDER, M.; DELLINGER, E. P.; GERBERDING, J. L.; HEARD, S. O.; MAKI, D. G.; MASUR, H.; MCCORNICK, R. D.; MERMEL, L. A.; PEARSON, M. L.; RAAD, I. I.; RANDOLPH, A.; WEINSTEIN, R. A. Guideline for prevention of intravascular catheter-related infections. **Clin. Infect. Dis.**, v. 35, p. 1281-11307, 2002.

O'SHAUGHNESSY, E. M.; SHEA, Y. M.; WITEBSKY, F. N. G. Laboratory diagnosis of invasive mycosis. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 17, p. 135-158, 2003.

ODDS, F. C. Pathogenesis of *Candida* infections. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 31, n. 3 (Pt 2), p. S2-S5, sep. 1994.

ODDS, F. C.; Refletions on the question: what does molecular mycology have to do with the clinician treating the patient? **Med. Mycol.**, v. 41, p. 1-6, 2003.

ODDS, F. C. Resistance of yeasts to azoles derivative antifungals. **J. Agents Chemother.**, v. 31, p. 463-471, 1993.

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

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends Microbiol.**, v. 11, n.6, p. 272-279, 2003.

ODDS, F. C.; DAVIDSON, A. "Room temperature" use of CHROMagar *Candida*. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 38, n. 3, p. 147-150, nov. 2000.

ODDS, F. C.; JACOBSEN, M. D. Multilocus sequence typing of pathogenic *Candida* species. **Eukaryot. Cell.**, v. 7, n. 7, p. 1075-1084, jul. 2008.

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. 141-146, mar. 2008.

OLIVEIRA, G. DOS S.; RIBEIRO, E. T.; BARONI, F. DE A. An evaluation of manual and mechanical methods to identify *Candida* spp. From human and animal sources. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**. v. 48, n. 6, p. 311-315, nov.-dec. 2006

OLIVEIRA-LULA, E. C.; OLIVEIRA-LULA, C. E.; ALVES, C. M.; LOPES, F. F.; PEREIRA, A. L. Chemotherapy-induced oral complications in leukemic patients. **Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.**, v. 71, n. 11, p.1681-1685, nov. 2007.

OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PAPPAS, P. G. Invasive candidiasis in the intensive care unit. **Crit. Care Med.**, v. 34, n. 3, p. 857-63, mar. 2006.

OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REX, J. H.; BENNETT, J.; KULLBERG, B. J. Deeply invasive candidiasis. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 16, p. 793-820, 2002.

PAGANO, L.; MELE, L.; FIANCHI, L.; MELILLO, L.; MARTINO, B.; D'ANTONIO, D.; TOSTI, M. E.; POSTERARO, B.; SANGUINETTI, M.; TRAPÈ, G.; EQUITANI, F.; CAROTENUTO, M.; LEONE, G. Chronic disseminated candidiasis in patients with hematologic malignancies. Clinical features and outcome of 29 episodes. **Haematologica**, v. 87, n. 5, p. 535-541, may, 2002.

PAGE, B.; PETRICH A.; STEVENS, D.; LUINSTR, K.; CALLERY, S.; GAFNI, A.; MAHONY, J.; CHERNESKY, M.; GROVES, D. Training costs and investment payback of implementing molecular diagnostics for identification of vancomycin resistant enterococci in a clinical microbiology laboratory. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 42, n. 2, p. 91-97, feb. 2002.

PANDYA, N. A.; ATRA, A. A.; RILEY, U.; PINKERTON, C. R. Role of itraconazole in haematology/oncology. **Arch. Dis. Child**. v. 88, n. 3, p. 258-260, mar. 2003.

PAPPAS, P. G. Invasive candidiasis. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 20, n. 3, p. 485-506, sep. 2006.

PASQUALOTTO, A. C.; ANTUNES, A. G.; SEVERO, L. C. *Candida guilliermondii* as the aetiology of candidosis. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.**, v. 48, n. 3, p. 123-127, may-jun. 2006.

PASQUALOTTO, A. C.; NEDEL, W. L.; MACHADO, T. S.; SEVERO, L. C. A 9-year study comparing riskfactors and the outcome of paediatric and adults with nosocomial candidaemia. **Mycopathologia.**, v. 160, n. 2, p. 111-116, sep. 2005a.

PASQUALOTTO, A. C.; SUKIENNIK, T. C.; SEVERO, L. C.; DE AMORIM, C. S.; COLOMBO, A. L. An outbreak of *Pichia anomala* fungemia in a Brazilian pediatric intensive care unit. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 26, n. 6, p. 553-558, jun. 2005b

PASSOS, X. S.; COSTA, C. R.; ARAÚJO, C. R.; NASCIMENTO, E. S. E.; SOUZA, L. K.; FERNANDES, O. DE F.; SALES, W. S.; SILVA, M. DO R. Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* spp. bloodstream isolates from a Brazilian tertiary carehospital. **Mycopathologia**, v. 163, n. 3, p. 145-51, mar. 2007.

PAUW, B. E.; PICAZO, J. J. Present situation in the treatment of invasive fungal infection. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 32, Suppl. 2, p. S167-S171, nov. 2008.

PEDREIRA, E. N.; CARDOSO, C. L.; BARROSO, E. C., SANTOS, J. A.; FONSECA, F. P.; TAVEIRA, L. A. Epidemiological and oral manifestations of HIV-positive patients in a specialized service in Brazil. **J. Appl. Oral. Sci.**, v. 16, n. 6, p. 369-375, nov.dec., 2008.

PEMÁN, J.; ALMIRANTE, B. [Advances in the diagnosis and treatment of yeast infections: role of the new antifungal agents]. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v. 26, Suppl 13, p. 38-46, nov. 2008.

PEMÁN, J.; MARTÍN-MANZUELOS, E.; RUBIO-CALVO, M. C. **Guía práctica de Identificación y Diagnóstico en micología clínica**. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología, 2001.

PEMÁN, J.; MARTÍN-MANZUELOS, E.; RUBIO-CALVO, M. C. **Guía práctica de Identificación y Diagnóstico en micología clínica - Atualizada**. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología, 2008.

PEREA, S. & PATTERSON, T. F. Antifungal resistance in pathogenic fungi. **Clin. Infect. Dis.**, v. 35, p. 1073-1080, 2002.

PERFECT, J. R. Antifungal resistance: the clinical front. **Oncology** (Williston Park), v. 18, n. 14, Suppl. 13, p. 15-22, dec. 2004.

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

PETERSON, L. R.; HAMILTON, J. D.; BARON, E. J.; TOMPKINS, L. S.; MILLER, J. M.; WILFERT, C. M.; TENOVER, F. C.; THOMSON JR, R. B. Role of clinical microbiology laboratories in the management and control of infectious diseases and the delivery of health care. **Clin. Infect. Dis.** v. 32, n. 4, p. 605-611, feb. 2001.

PETERSON, L. R.; NOSKIN, G. A. New technology for detecting multidrug-resistant pathogens in the clinical microbiology laboratory. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 7, n. 2, p.306-311, mar.-apr. 2001.

PETRI, M. G.; KÖNIG, J.; MOECKE, H. P.; GRAMM, H. J.; BARKOW, H.; KUJAH, P.; DENNHART, R.; SCÄFER, H.; MEYER, N.; KALMAR, P.; THÜLIG, P.; MÜLLER, J.; LODE, H. Epidemiology of invasive mycosis in icu patients: a prospective multicenter study in 435 non-neutropenic patients. **Intensive Care Med.**, v. 23, p. 317-325, 1997.

PETRICH, A.; LUINSTRAS, K.; PAGE, B.; CALLERY, S.; STEVENS, D.; GAFNI, A.; GROVES, D.; CHERNESKY, M.; MAHONY, J. B. Effect of routine use of a *multiplex* PCR for detection of vanA- and vanB- mediated enterococcal resistance on accuracy, costs and earlier reporting. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 4, 1n. 4, p. 215-220, dec. 2001.

PETTERSON, T. Advances and challenges in management of invasive mycoses. **Lancet**, v. 366, p. 1013-1025, 2005.

PFALLER, M. A. Antifungal susceptibility testing: progress and future developments. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 4, p. 2, p. 55-60, 2000a.

PFALLER, M. A. Epidemiology of candidiasis. **J. Hosp. Infect.**, v. 30 (Suppl.), p. 329-338, 1995a.

PFALLER, M. A. Epidemiology and control of fungal infections. **Clin. Infect. Dis.**, v. 19 (Suppl. 1), p. S8-13, 1994.

PFALLER, M. A. Epidemiology of fungal infections: the promise of molecular typing. **Clin. Infect. Dis.**, v. 20, p. 1535-1539, 1995b.

PFALLER, M. A. Epidemiology of nosocomial candidiasis: the importance of molecular typing. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 4, n. 4, p. 161-167, 2000b.

PFALLER, M. A. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. **Clin. Infect. Dis.**, v. 22 (Suppl. 2), p. S89-S94, 1996.

PFALLER, M. A.; BOYKEN, L.; MESSER, S. A.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R. J.; DIEKEMA, D. J. Comparison of results of voriconazole disk diffusion testing for *Candida* species with results from a central reference laboratory in the ARTEMIS global antifungal surveillance program. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 10, p. 5208-5213, oct. 2005a.

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

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 20, n. 1, p. 133-163, jan. 2007.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Role of Sentinel Surveillance of Candidemia: Trends in Species Distribution and Antifungal Susceptibility. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 10, p. 3551-3557, oct. 2002.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; GIBBS, D. L.; NEWELL, V. A.; MEIS, J. F.; GOULD, I. M.; FU, W.; COLOMBO, A. L.; RODRÍGUEZ-NORIEGA, E; and the global antifungal

surveillance group. Results from the ARTEMIS disk global antifungal surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 1735-1745, 2007.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; GIBBS, D. L.; NEWELL, V. A.; NAGY, E.; DOBIASOVA, S.; RINALDI, M.; BARTON, R.; VESELOV, A.; GLOBAL ANTIFUNGAL SURVEILLANCE GROUP. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, n. 2, p. 515-521, feb. 2008a.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; GIBBS, D. L.; NEWELL, V. A.; NG, K. P.; COLOMBO A.; FINQUELIEVICH, J.; BARNES, R.; WADULA, J.; GLOBAL ANTIFUNGAL SURVEILLANCE GROUP. Geographic and temporal trends in isolation and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*: a global assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, n. 3, p. 842-849, mar. 2008b.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; JONES, R. N.; SADER, H. S.; FLUIT, A. C.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A.; SENTRY PARTICIPANT GROUP. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 9, p. 3254-3259, 2001.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; MENDEZ, M.; KIBBLER, C.; ERZSEBET, P.; CHANG, S. C.; GIBBS, D. L. *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n 10, p. 3551-3556, oct. 2006.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J. Activities of fluconazole and voriconazole against 1,586 recent clinical isolates of *Candida* species determined by Broth microdilution, disk diffusion, and Etest methods:

report from the ARTEMIS Global Antifungal Susceptibility Program, 2001. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 4, p. 1440-1446, apr. 2003.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; RINALDI, M. G.; BARNES, R.; HU, B.; VESELOV, A. V.; TIRABOSCHI, N.; NAGY, E.; GIBBS, D. L. 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. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 12, p. 5848-5859, dec. 2005b.

PFALLER, M. A.; HAZEN, K. C.; MESSER, S. A.; BOYKEN, L.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R. J.; DIEKEMA, D. J. Comparison of results of fluconazole disk diffusion testing for *Candida* species with results from a central reference laboratory in the ARTEMIS global antifungal surveillance program. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 3607-3612, 2004a

PFALLER, M. A.; HOUSTON, A.; COFFMANN, S. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 1, p. 58-61, jan. 1996.

PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; DOERN, G. V.; FLUIT, A. C.; VERHOEF, J.; SADER, H. S.; MESSER, S. A.; HOUSTON, A.; COFFMAN, S.; HOLLIS, R. J. International surveillance of blood stream infections due to *Candida* species in the European SENTRY Program: species distribution and antifungal susceptibility including the investigational triazole and echinocandin agents. SENTRY Participant Group (Europe). **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 35, n. 1, p. 19-25, sep. 1999.

PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; DOERN, G. V.; SADER, H. S.; HOLLIS, R. J. & MESSER S. A. International surveillance of bloodstream infections due to *candida* species: frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the united states, canada, and south america for the SENTRY program. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 7, p. 1886-1889, 1998a.

PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; DOERN, G. V.; SADER, H. S.; MESSER, S. A.; HOUSTON, A.; COFFMAN, S.; HOLLIS, R. J. Bloodstream infections due to *Candida*

species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, n. 3, p. 747-751, mar. 2000.

PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; MESSER, S. A.; EDMOND, M. B.; WENZEL, R. P. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 30, p. 121-129, 1998b.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; BOYKEN, L.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R. J.; DIEKEMA, D. J. Geographic variation in the susceptibilities of invasive isolates of *Candida glabrata* to seven systemically active antifungal agents: a global assessment from the ARTEMIS Antifungal Surveillance Program conducted in 2001 and 2002. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 7, p. 3142-3146, jul. 2004a.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; HOLLIS, R. J. Strain delineation and antifungal susceptibilities of epidemiologically related and unrelated isolates of *Candida lusitanae*. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 20, n. 3, p. 27-133, 1994.

PFALLER, M. A.; PRESTON, T.; BALE, M.; KOONTZ, F. P.; BODY, B. A. Comparison of the Quantum II, API Yeast Ident, and AutoMicrobic systems for identification of clinical yeast isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 26, n. 10, p. 2054-2058, oct. 1988.

PICAZO, J. J. Management of the febrile neutropenic patient: a consensus conference. **Clin. Infect. Dis.**, v. 39, Suppl. 1, p. S1-S6, jul. 2004.

PINCUS, D. H.; ORENGA, S.; CHATELLIER, S. Yeast identification-past, present, and future methods. **Med. Mycol.**, v. 45, n. 2, p. 97-121, mar. 2007.

PITTET, D.; LI, N.; WOOLSON, R. F.; WENZEL, R. Microbiological factors influencing the outcome of nosocomial bloodstream infections: a 6-year validated, population-based model. **Clin. Infect. Dis.**, v. 24, p. 1068-1078, 1997.

PIZZO, P. A. Fever in immunocompromised patients. **N. Eng. J. Med.**, v. 341, p. 893-900, 1999.

PLAYFORD, E. G.; EGGIMANN, P.; CALANDRA, T. Antifungals in the ICU. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 21, n. 6, p. 610-619, dec. 2008.

POLAK, A. Antifungal therapy-state of the art at the beginning of the 21st century. **Prog. Drug Res.**, spec no, p. 59-190, 2003.

PONTÓN, J.; DEL PALACIO, A. [Advances and limitations in the early diagnosis of invasive yeast infections] **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 24, n. 3, p. 181-186, sep. 2007.

POUND, C. M.; JOHNSTON, D. L.; ARMSTRONG, R.; GABOURY, I.; MENON, K. The morbidity and mortality of pediatric oncology patients presenting to the intensive care unit with septic shock. **Pediatr. Blood Cancer**, v. 51, n. 5, p. 584-588, nov. 2008.

POWELL, H. L.; SAND, C. A.; RENNIE, R. P. Evaluation of CHROMagar Candida for presumptive identification of clinically important *Candida* species. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 32, n. 3, p. 201-204, nov. 1998.

POWDER, E. G. M. RAPD typing in microbiology: a technical review. **J. Hosp. Infect.**, v. 34, p. 245-265, 1996.

PRADE, S. S.; OLIVEIRA, S. T.; RODRIGUES, R.; NUNES, F. A.; MARTINS-NETTO, E.; FELIX, J. Q.; PEREIRA, M.; WAGNER, M. B.; GADELHA, M. Z.; BORBA, E. A.; MENDES, A. Estudo brasileiro da magnitude das infecções hospitalares em hospitais terciários. **Rev. Control. Infec. Hosp.**, v. MS 2, p. 11-24, 1995.

PRASAD, R.; KAPOOR, K. Multidrug resistance in yeast *Candida*. **Int. Rev. Cytol.**, v. 242, p. 215-248, 2005.

PRATT, G.; GOODYEAR, O.; MOSS, P. Immunodeficiency and immunotherapy in multiple myeloma. **Br. J. Haematol.**, v. 138, n. 5, p. 563-579, sep. 2007.

PUTIGNANI, L.; PAGLIA, M. G.; BORDI, E.; NEBULOSO, E.; PUCILLO, L. P.; VISCA, P. Identification of clinically relevant yeast species by DNA sequence analysis of the D2 variable region of the 25-28S rRNA gene. **Mycoses**, v. 51, n. 3, 209-227, may 2008.

QUINDÓS, G.; ABARCA, L.; CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; ARÉVALO, M. P.; BORNAY, F. J.; CASALS, J. B.; HERNÁNDEZ-MOLINA, J. M.; IGLESIAS, I.; LINARES, M. J.; MARTÍN-MAZUELOS, E.; PEREIRO FERREIRÓS, M.; REZUSTA, A.; RUBIO, M. C.; SALESA, R.; SAN MILLÁN, R.; TORRES-RODRÍGUEZ, J. M. Multicenter survey of in vitro antifungal resistance in yeasts of medical importance isolated from Spanish patients. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 16, n. 2, p. 97-100, jun. 1999.

RAMAN, T.; MARIK, P. E. Fungal infections in bone marrow transplant recipients. **Expert Opin. Pharmacother.**, v. 7, n. 3, p. 307-315, feb. 2006.

RAMASETHU, J. Complications of vascular catheters in the neonatal intensive care unit. **Clin. Perinatol.**, v. 35, n. 1, p. 199-222, mar. 2008.

RAMOS, J. P.; ROSA, C. A.; CARVALHO, E. M.; LEONCINI, O.; VALENTE, P. Heteroduplex mobility assay of the 26S rDNA D1/D2 region for differentiation of clinically relevant *Candida* species. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 89, n. 1, p. 39-44, jan. 2006.

RAPPLEYE, C. A.; GOLDMAN, W. E. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 60, p. 281-303, 2006.

REEDER, R. H. Regulatory elements of the generic ribosomal gene. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 1, p. 466-474, 1989.

RESENDE, J. C.; DE RESENDE, M. A.; SALIBA, J. L. Prevalence of *Candida* spp. in hospitalized patients and their risk factors. **Mycoses**, v. 45, n. 8, p. 306-312, oct. 2002.

REX, J. H.; COOPER, C. R. JR.; MERZ, W. G.; GALGANI, J. N.; ANAÏSSIE, E. J. Detection of amphotericin b-resistant *candida* isolates in a broth-based system. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, n. 4, p. 906-909, 1995.

REX, J. H.; PFALLER, M. A.; WALSH, T. J.; CHATURVEDI, V.; ESPINEL-INGROFF, A.; GHANNOUM, M. A.; GOSEY, L.; ODDS, F. C.; RINALD, M. G.; SHEEHAN, D. & WARNOCK, D. W. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 14, n. 4, p. 643-658, 2001.

RICHARDS, M.; THUSKY, K.; BUISING, K. Epidemiology, prevalence, and sites of infections in intensive care units. **Semin. Respir. Crit. Care Med.**, v. 24, n. 1, p. 3-22, 2003.

RICHARDSON, M. D. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 56 (Suppl. S1), p. i5-i11, 2005.

RICHARDSON, M.; LASS-FLÖRL, C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 14, Suppl. 4, p. 5-24, may 2008.

RICHET, H. M.; ANDREMONT, A.; TANCREDE, C.; PICO, J. L.; JARVIS, W. R. Risk factors for candidemia in patients with acute lymphocytic leukemia. **Rev. Infect. Dis.**, v. 13, p. 211-215, 1991.

RIDDLE, D. L.; GIGER, O.; MILLER, L.; HALL, G. S.; WOODS, G. L. Clinical comparison of the Baxter MicroScan Yeast Identification Panel and the Vitek Yeast Biochemical Card. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 101, n. 4, p. 438-442, apr. 1994.

RIJK, P.; Van de Peer, Y.; Van den Broeck, I.; De Wachter, R. Evolutionary according to large ribosomal subunit RNA. **J. Mol. Evol.**, v. 4. p. 366-375, 1995.

RIMEK, D.; FEHSE, B.; GÖPEL, P. Evaluation of Mueller-Hinton-ágar as a simple medium for the germ tube production of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. **Mycoses**, v. 3, 205-208, may 2008.

RODERO, L.; CÓRDOBA, S.; VIVOT, W.; CAMPO, M.; CORFIELD, P.; OLGUÍN, C.; CUIROLO, A.; SORIA, M.; GUELFAND, L.; CANTEROS, C. E.; DAVEL, G.; RED WHONET. [Disk diffusion method for fluconazole susceptibility testing of *Candida* spp. isolates]. **Rev. Argent. Microbiol.**, v. 38, n. 3, p.155-163, jul.-sep. 2006.

RODERO, L.; DAVEL, G.; SORIA, M.; VIVOT, W.; CÓRDOBA, S.; CANTEROS, C. E.; SAPORITI, A; EMIFN. [Multicenter study of fungemia due to yeasts in Argentina]. **Rev. Argent. Microbiol.**, v. 37, n. 4, p. 189-195, oct.-dec. 2005.

RODRÍGUEZ, L. J.; REX, J. H. ; ANAISSIE, E. J. Update on invasive candidiasis. **Adv. Pharmacol.**, v. 37, p. 349-401, 1997.

ROGERS, T. R. Antifungal drug resistance: limited data, dramatic impact? **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 27, Suppl. 1, p. 7-11, jun. 2006.

ROONGPISUTHIPONG, C.; GETUPOOK, V.; CHINDAVIJAK, B. Impact of a new guideline for central venous catheter care on sepsis in total parenteral nutrition: experience in Ramathibodi Hospital. **J. Med. Assoc. Thai.**, v. 90, n. 10, p. 2030-2038, oct. 2007.

ROSA, F. G.; GARAZZINO, S.; PASERO, D.; DI PERRI, G.; RANIERI, V. M. Invasive candidiasis and candidemia: new guidelines. **Minerva Anesthesiol.**, v. 75, p. 1-6, jan. 2008.

ROSENFELD, S. **Fundamentos da vigilância sanitária**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 1^a Ed. 2004, 301p.

ROSENTHAL, V. D.; MAKI, D. G.; GRAVES, N. The International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC): goals and objectives, description of surveillance methods, and operational activities. **Am. J. Infect. Control.**, v. 36, n. 9, p. e1-e12, nov. 2008a.

ROSENTHAL, V. D.; MAKI, D. G.; MEHTA, A.; ALVAREZ-MORENO, C.; LEBLEBICIOGLU, H.; HIGUERA, F.; CUELLAR, L. E.; MADANI, N.; MITREV, Z.; DUEÑAS, L.; NAVOA-NG. J. A.; GARCELL, H. G.; RAKA, L.; HIDALGO, R. F.; MEDEIROS, E. A.; KANJ, S. S.; ABUBAKAR, S.; NERCELLES, P.; PRATESI, R. D.; INTERNATIONAL NOSOCOMIAL INFECTION CONTROL CONSORTIUM MEMBERS. International Nosocomial Infection Control Consortium report, data summary for 2002-2007, issued January 2008. **Am. J. Infect. Control.**, v. 36, n. 9, p. 627-637, nov. 2008a

ROSSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 25, n. 1, p. 39-67, jan. 2001.

RUHNKE, M.; MASCHMEYER, G. Management of mycosis in patients with hematologic disease and cancer – review of the literature. **Eur. J. Med. Res.**, v. 7, p. 227-235, 2002.

RÜPING, M. J.; VEHRESCHILD, J. J.; CORNELLY, O. A. Patients at high risk of invasive fungal infections: when and how to treat. **Drugs**, v. 68, n. 14, p. 1941-1962, 2008.

SAFDAR, A.; BANNISTER, T. W.; SAFDAR, Z. The predictors of outcome in immunocompetent patients with hematogenous candidiasis. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 8, n. 3, p. 180-186, may 2004.

SAFDAR, N.; MAKI, D. G. Risk of catheter-related bloodstream infection with peripherally inserted central venous catheters used in hospitalized patients. **Chest**, v. 128, n. 2, p. 489-495, aug. 2005.

SAFDAR, N.; SLATTERY, W. R.; KNASINSKI, V.; GANGNON, R. E.; LI, Z.; PIRSCH, J. D.; ANDES, D. Predictors and outcomes of candiduria in renal transplant recipients. **Clin. Infect. Dis.**, v. 40, n. 10, p. 1413-1421, may 2005.

SAITOH, T.; MATSUSHIMA, T.; SHIMIZU, H.; OSAKI, Y.; YAMANE, A.; IRISAWA, H.; YOKOHAMA, A.; UCHIUMI, H.; HANDA, H.; TSUKAMOTO, N.; KARASAWA, M.; NOJIMA, Y.; MURAKAMI, H. [Successful treatment of azole-refractory *Candida guilliermondii* fungemia with a combination therapy of micafungin and liposomal amphotericin B]. **Rinsho Ketsueki.**, v. 49, n. 2, p. 94-98, feb. 2008

SAMONIS, G.; GIKAS, A.; ANAISSIE, E. J.; VRENZOS, G.; MARAKI, S.; TSELENTIS, Y.; BODEY G. P. Prospective evaluation of effects of broad-spectrum antibiotics on gastrointestinal yeast colonization of humans. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 37, p. 51-53, 1993.

SAMRA, Z.; YARDENI, M.; PELED, N.; BISHARA, J. Species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* bloodstream isolates in a tertiary medical center in Israel. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 24, n. 9, p. 592-595, sep. 2005.

SAND, C.; RENNIE, R. P. Comparison of three commercial systems for the identification of germ-tube negative yeast species isolated from clinical specimens. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 33, n. 4, p.223-229, apr. 1999.

SANDFORD, G. R.; MERZ, W. G.; WINGARD, J. R.; CHARACHE, P.; SARA, R. The value of fungal surveillance cultures as predictors of systemic fungal infections. **J. Infect. Dis.**, v. 142, n. 4, p. 503-509, oct. 1980.

SANDHU, G. S.; KLINE, B. C.; STOCKMAN, L.; ROBERTS, G. D. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 11, p. 2913-2919, nov. 1995.

SANGLARD, D. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeast. **Enferm. Infecç. Microbiol. Clin.**, v. 20, n. 9, p. 462-470, 2002.

SANGLARD D.; ODDS, F. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **Lancet Infect. Dis.**, v. 2, p. 73-85, 2002.

SAN-MILLÁN, R.; RIBACOBA, L.; PONTÓN, J.; QUINDÓS, G. Evaluation of a commercial medium for identification of *Candida* species. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 15, n. 2, p. 153-158, feb. 1996.

SANTOS, A. A. M.; LOPES, F. F. P.; CARDOSO, M. R. A.; SERUFO, J. C. **Diagnóstico do controle da infecção hospitalar no Brasil**. Brasília: ANVISA. 2005. 19 p. Programa de pesquisas hospitalares - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde, Brasília.

SATANNI, L.; CORSETTI, A. The use *multiplex* PCR to detect and differentiate food- and beverage-associated microorganism: a review. **J. Microbiol. Methods**, v. 69, p. 1-22, 2007.

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**, v. 48, n. 6, p.378-381, nov. 2005.

SCHELENZ, S. Management of candidiasis in the intensive care unit. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 61, Suppl. 1, p. i31-i34, jan. 2008.

SEGAL, B. H.; FREIFELD, A. G. Antibacterial prophylaxis in patients with neutropenia. **J. Natl. Compr. Canc. Netw.**, v. 5, n. 2, p. 235-242, feb. 2007.

SELWYN, S. Hospital infection: the first 250 years. **J. Hosp. Infect.**, v. 18, p. 5-64, 1991.

SENET, J. M. Risk Factors and physiopathology of candidiasis. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 14, p. 6-13, 1997.

SETTANNI, L.; CORSETTI, A. The use of multiplex PCR to detect and differentiate food- and beverage-associated microorganisms: a review. **J. Microbiol. Methods**, v. 69, n. 1, p.1-22, apr. 2007.

SETTANNI, L.; VAN SINDEREN, D.; ROSSI, J.; CORSETTI, A. Rapid differentiation and in situ detection of 16 sourdough lactobacillus species by multiplex PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 6, p. 3049-3059, jun. 2005.

SHAW, M. T.; SPECTOR, M. H.; LADMAN, A. J. Effects of cancer, radiotherapy and cytotoxic drugs on intestinal structure and function. **Cancer Treat. Rev.**, v. 6, p. 141-151, 1979.

SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; SIBLEY, C. M. Current and emerging azole antifungal agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, n. 1, p. 40-79, 1999.

SHEN, Y. Z.; QI, T. K.; MA, J. X.; JIANG, X. Y.; WANG, J. R.; XU, Q. N.; HUANG, Q.; LIU, X. N.; SUN, H. Q.; LU, H. Z. Invasive fungal infections among inpatients with acquired immune deficiency syndrome at a Chinese university hospital. **Mycoses**, v. 50, n. 6, p. 475-480, nov. 2007.

SHEPPARD, D. C.; LOCAS, M. C.; RESTIERI, C.; LAVERDIERE, M. Utility of the germ tube test for direct identification of *Candida albicans* from positive blood culture bottles. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, n. 10, p. 3508-3509, oct. 2008.

SILVA E SOUZA, A. C.; TIPPLE, A. F. V.; PEREIRA, M. S. & PRADO, M. A. Desafios para o controle de infecção nas instituições de saúde: percepção dos enfermeiros. **Cien. Enferm.**, v. 8, n. 1, p. 19-30, 2002.

SILVA, M. F. I.; SANTOS, B. M. O. Estudo histórico-organizacional da comissão de controle de infecção hospitalar de um hospital universitário. **Medicina**, v. 34, p. 170-174, ab./jun. 2001.

SILVA, R. F. A infecção hospitalar no contexto das políticas relativas à saúde em Santa Catarina. **Rev. Lat. Am. Enferm.**, v. 11, n. 1, p. 108-114, jan.-fev. 2003.

SILVEIRA, F. P.; HUSAIN, S. Fungal infections in solid organ transplantation. **Med. Mycol.**, v. 45, n. 4, p. 305-320, jun. 2007.

SIMS, C. R.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REX, J. H. Invasive candidiasis in immunocompromised hospitalized patients. **Arch. Med. Res.**, v. 36, n. 6, p. 660-671, nov.-dec. 2005.

SINGER, A. L.; KUCIRKA, L. M.; NAMUYINGA, R.; HANRAHAN, C.; SUBRAMANIAN, A. K.; SEGEV, D. L. The high-risk donor: viral infections in solid organ transplantation. **Curr. Opin. Organ Transplant.**, v. 13, n. 4, p. 400-404, aug. 2008.

SINGH, J.; ZAMAN, M.; GUPTA, A. K. Evaluation of microdilution and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. **Med. Mycol.**, v. 45, n. 7, p. 595-602, nov. 2007.

SIVAKUMAR, V. G.; SHANKAR, P.; NALINA, K.; MENON, T. Use of CHROMagar in the differentiation of common species of *Candida*. **Mycopathologia**, v. 167, n. 1, p. 47-49, jan. 2009.

SLAVIN, M. A; AUSTRALIAN MYCOLOGY INTEREST GROUP. The epidemiology of candidaemia and mould infections in Australia. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 49, Suppl. 1, p. 3-6, feb. 2002.

SLAVIN, R. E.; DIAS, M. A.; SARAL, R. Cytosine arabinoside induced gastrointestinal toxic alterations in sequential chemotherapeutic protocols: a clinical-pathologic study of 33 patients. **Cancer**, v. 42, p. 1747-1759, 1978.

SONI, L. M.; BURATTINI, M. N.; PIGNATARI, A. C.; GOMPERTZ, O. F.; COLOMBO, A. L. Comparative study of ágar diffusion test and the NCCLS macrobroth method for in vitro susceptibility testing of *Candida* spp. **Mycopathologia**, v. 145, n. 3, p.131-135, 1999.

SOOD, P.; MISHRA, B.; DOGRA, V.; MANDAL, A. Comparison of Vitek Yeast Biochemical Card with conventional methods for speciation of *Candida*. **Indian J. Pathol. Microbiol.**, v. 43, n. 2, p. 143-145, apr. 2000.

SPIRO, S. G.; DOUSE, J.; READ, C.; JANES, S. Complications of lung cancer treatment. **Semin. Respir. Crit. Care Med.**, v. 29, n. 3, p. :302-317, jun. 2008.

STAGER, C. E.; DAVIS, J. R. Automated systems for identification of microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 5, n. 3, p. 302-327, jul. 1992.

STEFANIAK, M. J.; ZAUCHA-PRAZMO, A.; KACZANOWSKA, K.; KOWALCZYK, J. R. The problem of mycotic infections in children with onco-haematological diseases. **Case Rep. Clin. Pract. Rev.**, v. 2, n. 2, p. 135-139, 2001.

STEVENS, D. A. Diagnosis of fungal infections: current status. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 49 (Suppl. S1), p. 11-19, 2002.

ST-GERMAIN, G.; LAVERDIÈRE, M.; PELLETIER, R.; BOURGAULT, A. M.; LIBMAN, M.; LEMIEUX, C.; NOËL, G. Prevalence and antifungal susceptibility of 442 *Candida* isolates from blood and other normally sterile sites: results of a 2-year (1996 to 1998) multicenter surveillance study in Quebec, Canada. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 3, p. 949-953, mar. 2001.

ST-GERMAIN, G.; LAVERDIÈRE, M.; PELLETIER, R.; RENÉ, P.; BOURGAULT, A. M.; LEMIEUX, C.; LIBMAN, M. Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream *Candida* isolates in Quebec: Report on 453 cases between 2003 and 2005. **Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.**, v. 19, n. 1, p. 55-62, jan. 2008.

SUGIZAKI, M. F.; RHODEN, C. R.; BOMBONATTI, D. M.; MONTELLI, A. C.; MARTINSON, M. E.; DE MAGALHÃES LOPES, C. A. Prevalence and in vitro antifungal susceptibility of *Candida* spp isolated from clinical specimens in São Paulo, Brazil. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 15, n. 1, p. 16-18, mar. 1998.

SWINNE, D.; NOLARD, N.; VAN ROOIJ, P.; DETANDT, M. Bloodstream yeast infections: a 15-month survey. **Epidemiol. Infect.**, v. 12, p. 1-4, jan. 2009.

TACCONELLI, E.; TUMBARELLO, M.; PITTIRUTI, M.; LEONE, F.; LUCIA, M. B. & CAUDA, R.; ORTONA, L. Central venous catheter-related sepsis in cohort of 366 hospitalised patients. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 16, p. 203-209, 1997.

TAMBELLINI, A. T.; CÂMARA, V. M. Vigilância ambiental em saúde: conceitos, caminhos e interfaces com outros tipos de vigilância. **Cad. Saude Colet.**, v. 10, n. 1, p. 77-93, 2002.

TASCHDJIAN, C. L.; BURCHALL, J. J.; KOZINN, P. J. Rapid identification of *Candida albicans* by filamentation on serum and serum substitutes. **Am. J. Dis. Child.**, v. 99, p. 212-215, 1960.

TERLECKA, J. A.; DU CROS, P. A.; ORLA MORRISSEY, C.; SPELMAN, D. Rapid differentiation of *Candida albicans* from non-*albicans* species by germ tube test directly from BacTAlert blood culture bottles. **Mycoses**, v. 50, n. 1, p. 48-51, jan. 2007.

TESTORE, G. P.; DORI, L.; BUONOMINI, A. R.; SCHITO, G. C.; SORO, O.; FORTINA, G.; ANDREONI, S.; CARLONE, N.; TULLIO, V.; ANDREONI, M. In vitro fluconazole susceptibility of 1565 clinical isolates of *Candida* species evaluated by the disk diffusion method performed using NCCLS M44-A guidelines. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 50, n. 3, p.187-192, nov. 2004.

THAWEBOON, S.; THAWEBOON, B.; SRITHAVAJ, T.; CHOONHARUANGDEJ, S. Oral colonization of *Candida* species in patients receiving radiotherapy in the head and neck area. **Quintessence Int.**, v. 39, n. 2, p. e52-e57, feb. 2008.

TIKHOMIROV, E. WHO Programme for the control of hospital infection. **Chemiotherapia**, v. 3, p. 148-151, 1987.

TING, P. C.; WALKER, S. S. New agents to treat life-threatening fungal infections. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 8, n. 7, p. 592-602, 2008.

TIRABOSCHI, I. N.; BENNETT, J. E.; KAUFFMAN, C. A.; REX, J. H.; GIRMENIA, C.; SOBEL, J. D.; MENICHETTI, F. Deep Candida infections in the neutropenic and non-neutropenic host: an ISHAM symposium. **Med. Mycol.**, v. 38, Suppl. 1, p. 199-204, 2000.

TORRES-RODRÍGUEZ, J. M. Nuevos hongos patógenos oportunistas emergentes. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 13, p. S30-S38, 1996.

TORTORANO, A. M.; KIBBLER, C.; PEMÁN, J.; BERNHARDT, H.; KLINGSPOR, L.; GRILLOT, R. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 27, n. 5, p. 359-366, may 2006.

TORTORANO, A. M.; PEMÁN, J.; BERNHARDT, H.; KLINGSPOR, L.; KIBBLER, C. C.; FAURE, O.; BIRAGHI, E.; CANTON, E.; ZIMMERMANN, K.; SEATON, S.; GRILLOT, R.; ECMM Working Group on Candidaemia. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 23, n. 4, p. 317-322, apr. 2004.

TRABOULSI, R.; KANAFANI, Z. A.; KANJ, S. S. Fungal infections of the genitourinary tract. **J. Med. Liban.**, v. 52, n. 4, p. 202-209, oct.-dec. 2004.

TRICK, W. E.; FRIDKIN, S. K.; EDWARDS, J. R.; HAJJEH, R. A.; GAYNES, R. P.; NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE SYSTEM HOSPITALS. Secular trend of hospital acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. **Clin. Infect. Dis.**, v. 35, n. 5, p. 627-630, sep. 2002.

TROST, A.; GRAF, B.; EUCKER, J.; SEZER, O.; POSSINGER, K.; GÖBEL, U. B.; ADAM, T. Identification of clinically relevant yeasts by PCR/RFLP. **J. Microbiol. Methods**, v. 56, n. 2, p. :201-211, feb. 2004.

UZUN, O.; ASCIOGLU, S.; ANAISSIE, E.J.; REX, J. H. Risk factors and predictors of outcome in patients with cancer and breakthrough candidemia. **Clin. Infect. Dis.**, v. 32, p. 1713-1717, 2001.

VAN ASBECK, E. C.; HUANG, Y. C.; MARKHAM, A. N.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A. *Candida parapsilosis* fungemia in neonates: genotyping results suggest healthcare workers hands as source, and review of published studies. **Mycopathologia**, v. 164, n. 6, p. 287-293, dec. 2007.

VAN DER BIJ, W.; SPEICH, R. Management of cytomegalovirus infection and disease after solid-organ transplantation. **Clin. Infect. Dis.**, v. 33, p. S32-S37, 2001.

VANDEN BOSSCHE, H. Mechanisms of antifungal resistance. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 14, p. 44-49, 1997.

VARTIVARIAN, S. E. Virulence properties and nonimmune pathogenic mechanisms of fungi. **Clin. Infect. Dis.**, v. 14 (Suppl.1), p. S30-36, 1992.

VASQUEZ, J. A. Options for the management of mucosal candidiasis in patients with AIDS and HIV infection. **Pharmacotherapy**, v. 19, n. 1, p. 76-87, 1999.

VASQUEZ, J. A.; SOBEL, D. Mucosal candidiasis. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 16, p. 793-820, 2002.

VELASCO, E.; BIGNI, R. A prospective cohort study evaluating the prognostic impact of clinical characteristics and comorbid conditions of hospitalized adult and pediatric cancer patients with candidemia. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 27, n. 11, p. 1071-1078, nov. 2008.

VERDUYN-LUNEL, F. M.; MEIS, J. F.; VOSS, A. Nosocomial fungal infections: candidemia. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 34, n. 3, p. 213-220, jul. 1999.

VERVAEKE, S.; VANDAMME, K.; BOONE, E.; DE LAERE, E.; SWINNE, D.; SURMONT, I. A case of *Candida lambica* fungemia misidentified as *Candida krusei* in an intravenous drug abuser. **Med. Mycol.**, v. 46, n. 8, p. 853-856, dec. 2008.

VIDOTTO, V.; YUMI KOGA-ITO, C.; MILANO, R.; FIANCHINO, B.; PONTÓN, J. Correlation between germ tube production, phospholipase activity and serotype distribution in *Candida albicans*. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 16, n. 4, p. 208-210, dec. 1999.

VILANOVA, M.; CORREIA, A. Host defense mechanisms in invasive candidiasis originating in the GI tract. **Expert Rev. Anti. Infect. Ther.**, v. 6, n. 4, p. 441-445, aug. 2008.

VILLASÍS-KEEVER, A.; MOSQUEDA, J. L. {infections in bone marrow transplantation}. **Rev. Invest. Clin.**, v. 57, n. 2, p. 381-386, mar-apr. 2005.

VINCENT, J. L.; ANAISSIE, E.; BRUINING, H.; DEMAJO, W.; EL-EBIARY, M.; HABER, J.; HIRAMATSU, Y.; NITENBERG, G.; NYSTROM, P. O.; PITTET, D.; ROGERS, T.; SANDVEN, P.; SGANGA, G.; SCHALLER, M. D.; SOLOMKIN, J. Epidemiology, diagnosis and treatment of systemic *candida* infection in surgical patients under intensive care. **Intensive Care Med.**, v. 24, n. 3, p. 206-16, 1998.

VISCOLI, C.; VARNIER, O.; MACHETTI, M. Infections in patients with febrile neutropenia: epidemiology, microbiology, and risk stratification. **Clin. Infect. Dis.**, v. 40, Suppl. 4, p. S240-S245, apr. 2005.

VIUDES, A.; PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; LÓPEZ-RIBOT, J.; GOBERNADO, M. Actividad de las asociaciones de antifúngicos sistémicos. **Rev. Esp. Quimioter.**, v. 14, n. 1, p. 1-14, 2001.

VIUDES, A.; PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; ÚBEDA, P.; GOBERNADO, M. Actualización de las interacciones farmacológicas de los antifúngicos sistémicos. **Rev. Esp. Quimioter.**, v. 12, n. 2, p. 1-10, 1999.

VIUDES, A.; PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; UBEDA, P.; LÓPEZ-RIBOT, J. L.; GOBERNADO, M. Candidemia at a tertiary-care hospital: epidemiology, treatment, clinical outcome and risk factors for death. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 21, n. 11, p. 767-74, nov. 2002.

VOLLMER, T.; STÖRMER, M.; KLEESIEK, K.; DREIER, J. Evaluation of novel broad-range real-time PCR assay for rapid detection of human pathogenic fungi in various clinical specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, n. 6, p. 1919-1926, jun. 2008.

VOLPATO, L. E.; SILVA, T. C.; OLIVEIRA, T. M.; SAKAI, V. T.; MACHADO, M. A. Radiation therapy and chemotherapy-induced oral mucositis. **Braz. J. Otorhinolaryngol.**, v. 73, n. 4, p. 562-568, jul-aug. 2007.

WADLIN, J. K.; HANKO, G.; STEWART, R.; PAPE, J.; NACHAMKIN, I. Comparison of three commercial systems for identification of yeasts commonly isolated in the clinical microbiology laboratory. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 6, p.1967-1970, jun. 1999.

WAKAYAMA, M.; SHIBYA, K.; ANDO, T.; OHARASEKI, K.; TAKAHASHI, K.; NAOE, S.; COULSON, W. F. Deep-seated mycosis as a complication in bone marrow transplantation patients. **Mycoses**, v. 45, p. 146-151, 2002.

WALSH, T. J.; HIEMENZ, J. W.; ANAISSIE, E. Recent progress and current problems in treatment of invasive fungal infections in neutropenic patients. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 10, n. 2, p. 365-400, 1996.

WALSH, T. J.; HIEMENZ, J.; PIZZO, P. A. Evolving risk factors for invasive fungal infections: all neutropenic patients are not the same. **Clin. Infect. Dis.**, v. 18, p. 793-798, 1994.

WANG, J. L.; CHANG, S. C.; HSUEH, P. R.; CHEN, Y. C. Species distribution and fluconazole susceptibility of *Candida* clinical isolates in a medical center in 2002. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 37, n. 4, p. 236-241 apr. 2004.

WANG, Q. M.; LI, J.; WANG, S. A.; BAI, F. Y. Rapid differentiation of phenotypically similar yeast species by single-strand conformation polymorphism analysis of ribosomal DNA. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 74, n. 9, p. 2604-2611, may 2008.

WANGER, A.; MILLS, K.; NELSON, P. W. & REX, J. H. Comparison of etest and national committee for clinical laboratory standards broth macrodilution method for

antifungal susceptibility testing: enhanced ability to detect amphotericin b-resistant *Candida* isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, n. 11, p. 2520-2522, 1995.

WANKE, B.; LAZÉRA, M. S.; NUCCI, M. Fungal infections in immunocompromised host. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95 (Suppl. 1), p. 153-158, 2000.

WENZEL, R. Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality. **Clin. Infect. Dis.**, v. 20, p. 1531-1534, 1995.

WHITE, P. L.; ARCHER, A. E.; BARNES, R. A. Comparison of non-culture-based methods for detection of systemic fungal infections, with an emphasis on invasive *Candida* infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 5, p. 2181-2187, may 2005.

WHITE, T. C.; MARR, K. A.; BOWDEN, R. A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n. 2, p. 382-402, 1998.

WICKEHAM, L. J. Taxonomy of yeasts. **Tech. Bull. no. 1029** - US Department of Agriculture, 1975.

WICKEHAM, L. J.; BURTON, K. A. Carbohydrate assimilation tests for the classification of yeasts. **J. Bacteriol.**, v. 56, p. 363-371, 1948.

WILCOX, C. M.; SCHWARTZ, D. A. Endoscopic-pathologic correlates of candida esophagitis in acquired immunodeficiency syndrome. **Dig. Dis. Sci.**, v. 41, p. 1337-1345, 1996.

WILLINGER, B.; MANAFI, M.; Evaluation of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida* species. *Mycoses*. 1999 Apr;42(1-2):61-5.

WINGARD, J. R. Fungal infection after bone marrow transplant. **Biol. Blood Marrow Transplant**, v. 5, n. 2, p. 55-68, 1999.

WINGARD, J. R. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. **Clin Infect Dis.**, v. 20, n. 1, p. 115-125, jan. 1995.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S. M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R. P.; EDMOND, M. B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clin. Infect. Dis.**, v. 39, n. 3, p. 309-317, aug. 2004.

WORNOCK, D. W. Fungal diseases: an evolving public health challenge. **Med. Mycol.** v. 44, p. 697-705, dec. 2006.

WRIGHT, W. L.; WENZEL, R. P. Nosocomial *Candida*. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 11, n. 2, p. 411-425, 1997.

WU, H. J.; WANG, A. H.; JENNINGS, M. P. Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 12, n. 1, p. 93-101, feb. 2008.

YAN, L.; ZHANG, J.; LI, M.; CAO, Y.; XU, Z.; CAO, Y.; GAO, P.; WANG, Y.; JIANG, Y. DNA microarray analysis of fluconazole resistance in a laboratory *Candida albicans* strain. **Acta Biochim. Biophys. Sin.** (Shanghai), v. 40, n. 12, p. 1048-1060, dec. 2008.

YEH, T. C.; LIU, H. C.; WANG, L. Y.; CHEN, S. H.; LIANG, D. C. Invasive fungal infection in children undergoing chemotherapy for cancer. **Ann. Trop. Paediatr.**, v. 27, n. 2, p. 141-147, jun. 2007.

YEO, S. F.; HUIE, S.; SOFAIR, A. N.; CAMPBELL, S.; DURANTE, A.; WONG, B. Measurement of serum D-arabinitol/creatinine ratios for initial diagnosis and for predicting outcome in an unselected, population-based sample of patients with *Candida* fungemia. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 11, p. 3894-3899, nov. 2006.

YEO, F. S.; WONG, B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, n. 3, p. 465-484, 2002.

8. ANEXOS

8.1. ANEXO 1

IDENTIFICAÇÃO CROMOGÊNICA, MORFOLÓGICA, BIOQUÍMICA E MOLECULAR DOS ISOLADOS FÚNGICOS.

ORDEM SEQUENCIAL	LMC NO.	ESPÉCIES FÚNGICAS	IDENTIFICAÇÃO CROMOGÊNICA E MORFOLÓGICA			IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA PROBABILIDADE (%) / TESTE SUPLEMENTAR (TS)	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR MULTIPLEX-PCR
			CH	TG	CL		
01	250T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
02	251T	<i>Candida parapsilosis</i>	Rosa	-	-	99	+
03	252T	<i>Candida parapsilosis</i>	Rosa	-	-	95	+
04	253T	<i>Candida parapsilosis</i>	Rosa	-	-	94	+
05	254T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
06	255T	<i>Cryptococcus humicolus</i>	Rosa	-	-	80/TS	-
07	256T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
08	257T	<i>Candida parapsilosis</i>	Branca	-	-	99	+
09	258T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
10	259T	<i>Candida parapsilosis</i>	Rosa	-	-	99	+
11	260T	<i>Candida parapsilosis</i>	Rosa	-	-	98	+
12	261T	<i>Candida parapsilosis</i>	Rosa	-	-	98	+
13	262T	<i>Candida parapsilosis</i>	Rosa	-	-	80/TS	+

CONTINUAÇÃO.

ORDEM SEQUENCIAL	LMC NO.	ESPÉCIES FÚNGICAS	IDENTIFICAÇÃO CROMOGÊNICA E MORFOLÓGICA			IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA PROBABILIDADE (%) / TESTE SUPLEMENTAR (TS)	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR MULTIPLEX-PCR
			CH	TG	CL		
14	263T	<i>Candida guilliermondii</i>	Rosa	–	–	74/TS	+
15	264T	<i>Candida parapsilosis</i>	Rosa	–	–	98	+
16	265T	<i>Candida parapsilosis</i>	Rosa	–	–	98	+
17	266T	<i>Candida parapsilosis</i>	Rosa	–	–	98	+
18	267T	<i>Candida parapsilosis</i>	Rosa	–	–	99	+
19	268T	<i>Candida tropicalis</i>	Azul-Cobalto	–	–	99	+
20	269T	<i>Candida tropicalis</i>	Azul-Cobalto	–	–	98	+
21	270T	<i>Candida parapsilosis</i>	Rosa	–	–	99	+
22	271T	<i>Candida parapsilosis</i>	Rosa	–	–	99	+
23	272T	<i>Candida albicans</i>	Verde	–	–	72/TS	+
24	273T	<i>Candida albicans</i>	Verde	–	–	72/TS	+
25	274T	<i>Candida albicans</i>	Verde	–	–	78/TS	+
26	275T	<i>Candida parapsilosis</i>	Branca	–	–	97	+
27	276T	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Laranja	–	–	70/TS	-
28	277T	<i>Candida parapsilosis</i>	Rosa	–	–	99	+

CONTINUAÇÃO.

ORDEM SEQUENCIAL	LMC NO.	ESPÉCIES FÚNGICAS	IDENTIFICAÇÃO CROMOGÊNICA E MORFOLÓGICA			IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA PROBABILIDADE (%) / TESTE SUPLEMENTAR (TS)	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR MULTIPLEX-PCR
			CH	TG	CL		
29	278T	<i>Candida parapsilosis</i>	Rosa	-	-	99	+
30	279T	<i>Candida tropicalis</i>	Azul-Cobalto	-	-	50/TS	+
31	280T	<i>Candida parapsilosis</i>	Rosa	-	-	99	+
32	281T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
33	282T	<i>Candida parapsilosis</i>	Rosa	-	-	99	+
34	283T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
35	284T	<i>Candida parapsilosis</i>	Rosa	-	-	92	+
36	285T	<i>Candida parapsilosis</i>	Rosa	-	-	99	+
37	286T	<i>Candida guilliermondii</i>	Rosa	-	-	79/TS	+
38	287T	<i>Candida krusei</i>	Rosa Fosco	-	-	99	+
39	288T	<i>Trichosporon</i> sp.	Azul	-	-	99/TS	-
40	289T	<i>Candida guilliermondii</i>	Rosa	-	-	88	+
41	290T	<i>Cryptococcus humicolus</i>	Rosa	-	-	57/TS	-
42	291T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
43	292T	<i>Candida guilliermondii</i>	Rosa	-	-	83/TS	+

CONTINUAÇÃO.

ORDEM SEQUENCIAL	LMC NO.	ESPÉCIES FÚNGICAS	IDENTIFICAÇÃO CROMOGÊNICA E MORFOLÓGICA			IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA PROBABILIDADE (%) / TESTE SUPLEMENTAR (TS)	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR MULTIPLEX-PCR
			CH	TG	CL		
44	293T	<i>Candida tropicalis</i>	Azul-Cobalto	-	-	55/TS	+
45	294T	<i>Candida guilliermondii</i>	Rosa	-	-	59/TS	+
46	295T	<i>Candida tropicalis</i>	Azul-Cobalto	-	-	98	+
47	296T	<i>Candida guilliermondii</i>	Rosa	-	-	53/TS	+
48	297T	<i>Candida guilliermondii</i>	Rosa	-	-	53/TS	+
49	298T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
50	299T	<i>Candida guilliermondii</i>	Rosa	-	-	52/TS	+
51	300T	<i>Candida parapsilosis</i>	Branca	-	-	99	+
52	301T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
53	302T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
54	303T	<i>Candida parapsilosis</i>	Branca	-	-	99	+
55	304T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
56	305T	<i>Candida parapsilosis</i>	Rosa	-	-	99	+
57	306T	<i>Candida guilliermondii</i>	Rosa	-	-	74/TS	+
58	307T	<i>Candida famata</i>	Rosa	-	-	52/TS	-

CONTINUAÇÃO.

ORDEM SEQUENCIAL	LMC NO.	ESPÉCIES FÚNGICAS	IDENTIFICAÇÃO CROMOGÊNICA E MORFOLÓGICA			IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA PROBABILIDADE (%) / TESTE SUPLEMENTAR (TS)	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR MULTIPLEX-PCR
			CH	TG	CL		
59	308T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
60	309T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
61	310T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
62	311T	<i>Candida parapsilosis</i>	Rosa	-	-	99	+
63	312T	<i>Candida parapsilosis</i>	Rosa	-	-	95	+
64	313T	<i>Candida guilliermondii</i>	Rosa	-	-	74/TS	+
65	314T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
66	315T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
67	316T	<i>Candida parapsilosis</i>	Branca	-	-	99	+
68	317T	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Laranja	-	-	80/TS	-
69	318T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
70	319T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
71	320T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
72	321T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
73	322T	<i>Candida albicans</i>	Verde	-	-	68/TS	+

CONTINUAÇÃO.

ORDEM SEQUENCIAL	LMC NO.	ESPÉCIES FÚNGICAS	IDENTIFICAÇÃO CROMOGÊNICA E MORFOLÓGICA			IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA PROBABILIDADE (%) / TESTE SUPLEMENTAR (TS)	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR MULTIPLEX-PCR
			CH	TG	CL		
74	323T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
75	324T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
76	325T	<i>Candida lambica</i>	Rosa	-	-	91	-
77	326T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
78	327T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
79	328T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
80	329T	<i>Candida parapsilosis</i>	Branca	-	-	93	+
81	330T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
82	331T	<i>Candida parapsilosis</i>	Rosa	-	-	99	+
83	332T	<i>Candida parapsilosis</i>	Rosa	-	-	99	+
84	333T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
85	334T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
86	335T	<i>Candida guilliermondii</i>	Rosa	-	-	99	+
87	336T	<i>Candida tropicalis</i>	Azul-Cobalto	-	-	98	+
88	337T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+

CONTINUAÇÃO.

ORDEM SEQUENCIAL	LMC NO.	ESPÉCIES FÚNGICAS	IDENTIFICAÇÃO CROMOGÊNICA E MORFOLÓGICA			IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA PROBABILIDADE (%) / TESTE SUPLEMENTAR (TS)	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR MULTIPLEX-PCR
			CH	TG	CL		
89	338T	<i>Candida tropicalis</i>	Azul	-	-	97	+
90	339T	<i>Candida parapsilosis</i>	Branca	-	-	92	+
91	340T	<i>Candida tropicalis</i>	Azul-Cobalto	-	-	97	+
92	341T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
93	342T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	98	+
94	343T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
95	344T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
96	345T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
97	346T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
98	347T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
99	348T	<i>Candida albicans</i>	Verde	-	-	72/TS	+
100	349T	<i>Candida tropicalis</i>	Azul-Cobalto	-	-	97	+
101	350T	<i>Candida guilliermondii</i>	Rosa	-	-	98	+
102	351T	<i>Candida parapsilosis</i>	Rosa	-	-	99	+
103	352T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+

CONTINUAÇÃO.

ORDEM SEQUENCIAL	LMC NO.	ESPÉCIES FÚNGICAS	IDENTIFICAÇÃO CROMOGENICA E MORFOLÓGICA			IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA PROBABILIDADE (%) / TESTE SUPLEMENTAR (TS)	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR MULTIPLEX-PCR
			CH	TG	CL		
104	353T	<i>Candida glabrata</i>	Rosa	-	-	99	+
105	354T	<i>Candida parapsilosis</i>	Branca	-	-	99	+
106	355T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
107	356T	<i>Candida tropicalis</i>	Azul-Cobalto	-	-	50/TS	+
108	357T	<i>Candida tropicalis</i>	Azul-Cobalto	-	-	99	+
109	358T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
110	359T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
111	360T	<i>Candida glabrata</i>	Rosa	-	-	99	+
112	361T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+
113	362T	<i>Candida albicans</i>	Verde	+	+	99	+

LMC, Laboratório de Micologia Clínica; CH, CHROMagar-*Candida*; TG, tubo germinativo; CL, clamidósporo; (+) positivo; (-) negativo..

8.2. ANEXO 2

RESULTADO DOS TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* DE 113 ISOLADOS FÚNGICOS FRENTA AO FLUCONAZOL, ITRACONAZOL E ANFOTERICINA B PELOS MÉTODOS DE DIFUSÃO EM ÁGAR E MICRODILUIÇÃO EM CALDO.

CEPAS	CLSI M44-A	CECON			CLSI M27-A2			EUCAST E.DIS-7.1		
		FCZ (mm)	ITZ (mm)	AMB (mm)	FCZ (µg/mL)	ITZ (µg/mL)	AMB (µg/mL)	FCZ (µg/mL)	ITZ (µg/mL)	AMB (µg/mL)
250T	46	23	25	0,25	0,015	0,5	0,5	0,03	0,25	
251T	39	35	27	0,25	0,03	0,25	0,5	0,03	0,5	
252T	35	38	27	0,5	0,03	0,25	0,25	0,03	0,5	
253T	35	30	30	1	0,015	0,25	0,5	0,06	0,5	
254T	42	24	23	0,25	0,015	0,5	0,5	0,03	0,25	
255T	32	25	30	1	0,12	0,12	0,5	0,06	0,06	
256T	36	29	25	1	0,06	0,25	0,5	0,03	0,25	
257T	48	30	25	0,25	0,015	1	0,5	0,015	0,5	
258T	46	25	23	0,25	0,03	0,5	1	0,06	0,25	
259T	33	30	27	0,5	0,06	0,25	0,5	0,12	0,5	
260T	40	33	27	0,25	0,015	0,25	0,25	0,03	0,5	
261T	34	35	28	0,25	0,015	0,25	0,5	0,03	0,5	
262T	38	32	23	0,25	0,06	0,25	0,25	0,12	0,5	
263T	36	24	21	0,25	0,06	0,06	0,5	0,06	0,06	

CONTINUAÇÃO.

CEPAS	CLSI M44-A	CECON			CLSI M27-A2			EUCAST E.DIS-7.1		
<i>LMC NO.</i>	<i>FCZ (mm)</i>	<i>ITZ (mm)</i>	<i>AMB (mm)</i>	<i>FCZ (µg/mL)</i>	<i>ITZ (µg/mL)</i>	<i>AMB (µg/mL)</i>	<i>FCZ (µg/mL)</i>	<i>ITZ (µg/mL)</i>	<i>AMB (µg/mL)</i>	
264T	50	38	26	0,25	0,015	1	0,5	0,015	1	
265T	30	33	24	0,12	0,06	0,06	0,25	0,06	0,25	
266T	39	37	29	0,5	0,03	0,5	0,5	0,015	0,25	
267T	35	33	27	0,12	0,015	0,5	0,25	0,015	0,25	
268T	38	29	25	0,5	0,06	1	0,5	0,06	1	
269T	33	27	24	0,5	0,06	0,25	1	0,06	0,5	
270T	35	41	29	1	0,015	0,25	0,5	0,015	0,25	
271T	30	31	25	0,5	0,06	0,5	0,5	0,03	0,5	
272T	48	34	31	0,25	0,03	0,12	0,12	0,03	0,06	
273T	48	34	32	0,25	0,03	0,5	0,25	0,015	0,25	
274T	48	35	32	0,25	0,03	0,5	0,25	0,015	0,5	
275T	36	29	26	0,25	0,06	0,12	0,5	0,06	0,25	
276T	0	16	21	0,25	0,06	0,25	0,25	0,015	0,25	
277T	34	31	26	1	0,03	0,5	1	0,03	0,25	
278T	33	31	25	0,5	0,03	0,5	0,12	0,03	0,06	
279T	26	24	27	0,25	0,12	0,5	0,5	0,06	0,25	

CONTINUAÇÃO.

CEPAS	CLSI M44-A	CECON			CLSI M27-A2			EUCAST E.DIS-7.1		
<i>LMC NO.</i>	<i>FCZ (mm)</i>	<i>ITZ (mm)</i>	<i>AMB (mm)</i>	<i>FCZ (µg/mL)</i>	<i>ITZ (µg/mL)</i>	<i>AMB (µg/mL)</i>	<i>FCZ (µg/mL)</i>	<i>ITZ (µg/mL)</i>	<i>AMB (µg/mL)</i>	
280T	30	32	28	0,5	0,06	0,5	0,5	0,06	0,25	
281T	36	29	21	0,25	0,06	0,5	0,12	0,015	0,25	
282T	30	33	27	0,5	0,12	0,5	0,25	0,015	0,25	
283T	50	32	23	0,12	0,015	0,5	0,25	0,03	0,5	
284T	40	31	28	1	0,12	0,5	1	0,03	1	
285T	48	34	29	1	0,03	0,5	0,5	0,03	0,5	
286T	32	22	24	0,25	0,03	0,25	0,5	0,12	0,25	
287T	08	24	26	64	0,03	0,25	64	0,25	0,5	
288T	25	25	25	1	0,25	0,5	2	0,25	0,5	
289T	36	21	21	0,5	0,03	0,25	0,5	0,06	0,5	
290T	20	25	25	0,5	0,12	0,5	1	0,03	0,25	
291T	28	25	25	0,5	0,03	0,5	0,25	0,03	0,5	
292T	26	23	29	1	0,25	0,25	2	0,12	0,5	
293T	37	29	27	1	0,03	0,25	0,5	0,03	0,25	
294T	38	25	22	2	0,12	0,5	0,5	0,03	0,5	
295T	29	27	24	0,5	0,12	0,5	0,25	0,12	0,5	

CONTINUAÇÃO.

CEPAS	CLSI M44-A	CECON			CLSI M27-A2			EUCAST E.DIS-7.1		
<i>LMC NO.</i>	<i>FCZ (mm)</i>	<i>ITZ (mm)</i>	<i>AMB (mm)</i>	<i>FCZ (µg/mL)</i>	<i>ITZ (µg/mL)</i>	<i>AMB (µg/mL)</i>	<i>FCZ (µg/mL)</i>	<i>ITZ (µg/mL)</i>	<i>AMB (µg/mL)</i>	
296T	30	23	25	1	0,12	0,5	0,5	0,03	0,5	
297T	25	20	25	1	0,06	0,5	1	0,25	0,5	
298T	32	26	25	1	0,12	0,25	0,25	0,03	0,5	
299T	34	22	25	0,5	0,06	0,25	1	0,06	0,5	
300T	38	31	23	0,5	0,12	0,5	0,25	0,12	0,5	
301T	32	22	29	0,5	0,12	0,5	0,12	0,03	0,25	
302T	33	21	24	0,5	0,12	0,5	0,25	0,03	0,25	
303T	34	31	23	0,5	0,06	0,5	0,5	0,06	0,25	
304T	32	24	25	0,25	0,12	0,5	0,25	0,12	0,5	
305T	35	29	21	0,5	0,06	0,25	0,5	0,03	0,5	
306T	30	26	25	0,25	0,06	1	1	0,06	0,5	
307T	32	27	29	1	0,12	0,5	1	0,06	0,5	
308T	40	28	27	0,25	0,03	0,5	0,12	0,03	0,5	
309T	32	24	25	0,5	0,12	0,25	0,25	0,03	0,5	
310T	32	26	26	1	0,12	0,5	0,25	0,03	0,25	
311T	35	25	27	0,5	0,06	0,5	0,5	0,06	0,25	

CONTINUAÇÃO.

CEPAS	CLSI M44-A	CECON			CLSI M27-A2			EUCAST E.DIS-7.1		
<i>LMC NO.</i>	<i>FCZ (mm)</i>	<i>ITZ (mm)</i>	<i>AMB (mm)</i>	<i>FCZ (µg/mL)</i>	<i>ITZ (µg/mL)</i>	<i>AMB (µg/mL)</i>	<i>FCZ (µg/mL)</i>	<i>ITZ (µg/mL)</i>	<i>AMB (µg/mL)</i>	
312T	36	26	28	0,5	0,12	0,5	0,5	0,03	0,25	
313T	33	28	24	1	0,06	0,5	0,25	0,015	0,25	
314T	30	25	22	0,5	0,12	0,5	0,5	0,06	0,5	
315T	40	23	25	1	0,03	0,25	1	0,03	0,25	
316T	22	28	21	0,25	0,03	0,25	0,5	0,06	0,5	
317T	0	14	23	16	0,12	0,25	16	0,12	0,5	
318T	40	24	24	0,25	0,03	0,12	1	0,03	0,25	
319T	35	26	24	0,5	0,06	0,25	0,25	0,015	0,12	
320T	35	24	25	1	0,015	0,5	0,25	0,015	0,5	
321T	30	26	24	0,25	0,015	0,25	0,5	0,015	0,25	
322T	48	24	23	0,12	0,015	0,06	0,12	0,03	0,12	
323T	40	24	25	0,25	0,03	0,25	0,12	0,03	0,5	
324T	34	21	21	0,25	0,015	0,25	0,25	0,015	0,25	
325T	24	16	18	16	0,25	0,5	16	0,12	1	
326T	44	22	16	0,25	0,015	0,5	0,5	0,12	0,5	
327T	30	21	24	0,12	0,015	0,25	0,5	0,015	0,5	

CONTINUAÇÃO.

CEPAS	CLSI M44-A	CECON			CLSI M27-A2			EUCAST E.DIS-7.1		
<i>LMC NO.</i>	<i>FCZ (mm)</i>	<i>ITZ (mm)</i>	<i>AMB (mm)</i>	<i>FCZ (µg/mL)</i>	<i>ITZ (µg/mL)</i>	<i>AMB (µg/mL)</i>	<i>FCZ (µg/mL)</i>	<i>ITZ (µg/mL)</i>	<i>AMB (µg/mL)</i>	
328T	35	21	24	0,25	0,12	0,25	0,25	0,25	0,25	
329T	38	25	26	0,5	0,12	0,25	0,12	0,03	0,12	
330T	40	20	23	0,5	0,06	0,5	0,25	0,015	0,25	
331T	44	27	25	0,5	0,06	0,5	0,5	0,03	0,25	
332T	44	28	26	0,5	0,06	0,25	0,25	0,015	0,25	
333T	44	23	22	0,25	0,015	0,5	0,25	0,015	0,5	
334T	30	23	24	1	0,06	0,25	2	0,12	0,5	
335T	28	18	27	1	0,12	0,25	4	0,12	0,5	
336T	30	25	27	1	0,12	0,25	0,5	0,06	0,25	
337T	34	23	23	0,5	0,06	0,5	0,5	0,03	0,25	
338T	28	21	25	0,5	0,015	0,25	0,25	0,03	0,25	
339T	48	22	21	0,25	0,015	0,25	0,25	0,03	0,25	
340T	33	23	24	1	0,12	0,25	0,5	0,06	0,5	
341T	40	22	23	0,25	0,06	0,25	0,5	0,015	0,25	

CONTINUAÇÃO.

CEPAS	CLSI M44-A	CECON			CLSI M27-A2			EUCAST E.DIS-7.1		
<i>LMC NO.</i>	<i>FCZ (mm)</i>	<i>ITZ (mm)</i>	<i>AMB (mm)</i>	<i>FCZ (µg/mL)</i>	<i>ITZ (µg/mL)</i>	<i>AMB (µg/mL)</i>	<i>FCZ (µg/mL)</i>	<i>ITZ (µg/mL)</i>	<i>AMB (µg/mL)</i>	
342T	36	18	25	0,25	0,015	0,25	0,5	0,03	0,5	
343T	46	21	27	1	0,12	0,5	1	0,03	0,5	
344T	35	21	27	1	0,06	0,5	0,5	0,015	0,25	
345T	35	22	17	0,25	0,015	0,25	0,25	0,015	0,25	
346T	38	23	22	0,5	0,06	0,5	0,25	0,015	0,12	
347T	35	21	22	0,12	0,015	0,12	0,12	0,03	0,12	
348T	39	25	27	0,5	0,12	0,25	0,12	0,12	0,06	
349T	30	21	25	0,25	0,03	0,25	0,25	0,06	0,25	
350T	20	22	21	1	0,12	0,12	2	0,12	0,25	
351T	30	21	25	1	0,03	0,25	2	0,12	0,5	
352T	28	21	23	0,5	0,06	0,25	0,5	0,12	0,12	
353T	35	19	23	8	0,25	0,12	16	0,5	0,12	
354T	25	25	27	0,5	0,015	0,25	1	0,12	0,5	
355T	35	20	22	0,5	0,12	0,5	0,25	0,03	0,25	
356T	35	27	24	0,25	0,12	0,5	0,12	0,06	0,25	
357T	15	16	25	4	0,12	0,5	4	0,25	1	

CONTINUAÇÃO.

CEPAS	CLSI M44-A	CECON			CLSI M27-A2			EUCAST E.DIS-7.1		
<i>LMC NO.</i>	<i>FCZ (mm)</i>	<i>ITZ (mm)</i>	<i>AMB (mm)</i>	<i>FCZ (µg/mL)</i>	<i>ITZ (µg/mL)</i>	<i>AMB (µg/mL)</i>	<i>FCZ (µg/mL)</i>	<i>ITZ (µg/mL)</i>	<i>AMB (µg/mL)</i>	
358T	30	23	24	0,5	0,06	0,5	1	0,06	0,5	
359T	38	27	22	1	0,12	0,5	0,25	0,12	0,5	
360T	20	34	25	8	0,12	0,12	16	0,12	0,25	
361T	22	23	20	8	0,12	0,25	8	0,12	0,25	
362T	16	19	20	8	0,12	0,25	16	0,12	0,25	

LMC, Laboratório de Micologia Clínica; CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute; EUCAST, European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing; FCZ, Fluconazol; ITZ, Itraconazol; AMB, Anfotericina B.

8.3. ANEXO 3

DIRETRIZES INTERPRETATIVAS PARA O TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* DAS ESPÉCIES DE *Candida* PELO MÉTODO DA DILUIÇÃO EM CALDO (CLSI, 2002; 2005).

Agentes Antifúngicos	Susceptibilidade (S)	Susceptibilidade-Dose-Dependente (SDD)	Intermediário (I)	Resistente (R)
Fluconazol	≤ 8	16-32	-	≥ 64
Itraconazol	≤ 0,125	0,25-0,5	-	≥ 1

O quadro apresenta os pontos de corte ($\mu\text{g/mL}$) contra os agentes indicados para as espécies de *Candida*. Quando as CIM's são mensuradas usando uma escala que produz resultados entre uma e outra categoria, a sensibilidade do isolado será classificada na categoria imediatamente superior. Assim, um isolado com uma CIM de fluconazol de $125\mu\text{g/mL}$, deve ser colocada na categoria de SDD.

8.4. ANEXO 4

ANTIMICROBIANOS PARA INFECÇÕES POR *Candida*: PONTOS DE CORTE PARA FLUCONAZOL (VERSÃO 1.0) (EUCAST, 2007).

ANTIFÚNGICO	PONTOS DE CORTE PARA ESPÉCIES RELACIONADAS (S _≤ /R _{>})					PONTOS DE CORTE PARA ESPÉCIES NÃO RELACIONADAS ¹ (S _≤ /R _{>})
	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	
FLUCONAZOL	2/4	IE	--	2/4	2/4	≤2 (S) / >4 (R)

S, Susceptível; R, Resistente; IE, insuficiente evidência (não está claro se a espécie em questão é um bom alvo para a terapia com a droga); -, pobre alvo para a terapia com a droga; 1, pontos de cortes têm sido determinados principalmente com base em informações de PK/PD e são independentes das distribuições de CIM espécie-específicas (utilizadas somente para organismos que não têm um ponto de corte específico).

8.5. ANEXO 5

DIRETRIZES DE INTERPRETAÇÃO DOS TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* DAS ESPÉCIES DE *Candida* PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR: DIÂMETRO DE INIBIÇÃO E CORRESPONDENTE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA [CIM] (CLSI, 2004; 2007).

AGENTE ANTIFÚNGICO	CONTEÚDO DO DISCO	ZONAS DE INIBIÇÃO (mm)			PONTOS DE CORTE [CIM] (µg)		
		R	SDD	S	R	SDD	S
FLUCONAZOL	25µg	≤14	15-18	≥19	≥ 64	16-32	≤ 8

R, Resistente; S-DD, Susceptível Dependente de Dose; S, susceptível.

8.6. ANEXO 6

DIRETRIZES DE INTERPRETAÇÃO DOS TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* DAS ESPÉCIES DE *Candida* PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR: DIÂMETRO DE INIBIÇÃO E CORRESPONDENTE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA [CIM] (CECON, SP, BRASIL).

AGENTE ANTIFÚNGICO	CONTEÚDO DO DISCO	ZONAS DE INIBIÇÃO (mm)			PONTOS DE CORTE [CIM] (µg)		
		R	INTERMEDIÁRIO	S	R	INTERMEDIÁRIO	S
ITRACONAZOL	10µg	≤11	12-19	≥ 20	-	-	-
ANFOTERICINA B	100µg	≤10		>10	≥1		<1

R, Resistente; S, Susceptível.