

DEBORAH LEDESMA TAIRA

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA E SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE *Candida*
spp. ISOLADAS DE PACIENTES COM CANDIDEMIA EM HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO DE CAMPO GRANDE-MS, 1998-2010**

**CAMPO GRANDE
2011**

DEBORAH LEDESMA TAIRA

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA E SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE *Candida*
spp. ISOLADAS DE PACIENTES COM CANDIDEMIA EM HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO DE CAMPO GRANDE-MS, 1998-2010**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, curso de Mestrado, da Faculdade de Medicina “Doutor Hélio Mandetta”, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas e Parasitárias, sob a orientação da Prof.^a Dra. Marilene Rodrigues Chang.

**CAMPO GRANDE
2011**

AOS MEUS PAIS IRACILDA E ALFREDO

agradeço pela paciência, carinho e amor incondicional, por terem acreditado em minha capacidade e sempre terem me apoiado.

AOS MEUS IRMÃOS CLEISON E TIAGO

que sempre me encorajaram e confiaram em mim. Obrigada pelo incentivo, apoio, companherismo, carinho e conselhos.

A MINHA ORIENTADORA DRA. MARILENE,

que desde o primeiro ano de faculdade me acolheu de braços abertos, agradeço pela dedicação e paciência de me ensinar. Obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por se fazer sempre presente em minha vida, mostrando-me o melhor caminho a seguir.

Aos meus pais e irmãos, alicerces da minha vida, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e incentivando. Amo vocês!

A minha orientadora Prof. Dra. Marilene Rodrigues Chang pelo constante incentivo e confiança. Agradeço pela amizade e paciência.

Ao meu irmão Cleison L. Taira, responsável pela idéia do tema desse trabalho, pelo primeiro treinamento com fatores de virulência e também pela constante ajuda, sempre disponibilizando seu tempo para me enviar as referências que precisei, até mesmo às vezes deixando de seus afazeres para discutir comigo sobre a importância do meu estudo.

Aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário e do Departamento de Farmácia e Bioquímica – UFMS, em especial a Maína Oliveira Nunes, Floriano Campoçano, Elizabeth Sanches, Sandra Aguenta e Fernanda Esposito, que sempre me trataram com carinho e respeito. Obrigada por me acolherem.

A professora Dra. Claudete Rodrigues de Paula pelo treinamento em seu laboratório e pela sua disponibilidade de sempre ajudar. Agradeço pelo carinho com que fui recebida todas às vezes que estive em São Paulo.

Aos alunos e funcionários do laboratório de micologia do Instituto de Ciências Biomédicas (USP) por sempre me receberem com carinho e atenção dispensada, em especial a Débora Moreira, Vanessa Kummer Perinazzo, Eriques da Silva, Satiko Uehara e Carolina Procópio.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós Graduação, em especial as professoras doutoras Inês Aparecida Tozetti, Sônia Maria Fernandes, Sônia Andrade e Ana Maria Paniago.

A Gabriela Dorn Nóbrega, amiga para todas as horas, que esteve ao meu lado tanto nas horas alegres quanto nas difíceis. Obrigada pela amizade verdadeira e pelos maravilhosos anos de convívio.

A Maína, que sempre ajudou no meu crescimento científico e profissional, dando conselhos e compartilhando seu conhecimento comigo. Obrigada pelo carinho!

Aos meus amigos Mayara, Suelen, Marcel, Erick e Hernane que me apoiaram e torceram por mim quando decidi trilhar o caminho da pesquisa.

A Roberta, amiga de longa data. Obrigada pela amizade e apoio com a dissertação!

Aos colegas e amigos do laboratório de microbiologia Mariê, Chrystiane, Gabriela, Débora, Ana Cláudia, Kalinca, Ana Carolina, Dênio e Luiz Carlos Tesini.

A Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pela oportunidade da realização do presente trabalho.

Muito obrigada!

Não acredite em algo simplesmente porque ouviu. Não acredite em algo simplesmente porque todos falam a respeito. Não acredite em algo simplesmente porque esta escrito em seus livros religiosos. Não acredite em algo só porque seus professores e mestres dizem que é verdade. Não acredite em tradições só porque foram passadas de geração em geração. Mas depois de muita análise e observação, se você vê que algo concorda com a razão, e que conduz ao bem e benefício de todos, aceite-o e viva-o.

Buda

RESUMO

Enquanto a produção de enzimas em amostras oral e vaginal tem sido extensivamente estudada, houve poucas investigações com amostras de sangue e aspectos clínicos. O objetivo do presente trabalho foi estudar os aspectos epidemiológicos e clínicos de candidemia em pacientes internados em Hospital Público do Mato Grosso do Sul e investigar fatores de virulência nos agentes etiológicos. Um total de 137 *Candida* spp., incluiu 61 *C. albicans*, 45 *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* 19, 9 *C. glabrata*, 2 *C. krusei* e 1 *C. guilhermondii* foram isoladas de pacientes do Hospital Universitário de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. Houve diferença significativa nos níveis de expressão de fosfolipase entre *Candida albicans* e não-*C. albicans* isolados. A maioria dos pacientes foram internados na Unidade de Terapia Intensiva (62,0%). Nenhuma correlação significativa foi observada entre as enzimas estudadas e desfecho fatal do paciente. Nenhuma amostra apresentou resistência *in vitro* contra o fluconazol, itraconazol e anfotericina B.

ABSTRACT

While *Candida* enzymes production in oral and vaginal samples has been extensively studied, there have been very few investigations with blood samples and clinical aspects. The aim of this work to study the epidemiological and clinical aspects of candidemia in patients admitted to Government Hospital of Mato Grosso do Sul and investigate virulence factors in the etiologic agents. A total of 137 *Candida* , included 61 *C. albicans*, 45 *C. parapsilosis*, 19 *C. tropicalis*, 9 *C. glabrata*, 2 *C. krusei* and 1 *C. guilhermondii* were recovered from patients at University Hospital in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. There was significant difference in the expression levels of phospholipase among *Candida albicans* and non-*C. albicans* *Candida* isolates. Most patients were admitted to the Intensive Care Unit (62.0%). No significant correlation was observed between the enzymes activities studied and the patient's fatal outcome. No samples showed resistance *in vitro* against fluconazole, itraconazole and amphotericin B.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 Aspectos gerais.....	12
2.1 <i>Candida</i> e candidemia.....	12
2.2 Mecanismos relacionados a virulência de <i>Candida spp</i>.....	15
2.2.1 <u>Proteinase</u>.....	16
2.2.2 <u>Fosfolipase</u>.....	18
2.2.3 <u>Hemolisina</u>.....	19
2.3 Tratamento e susceptibilidade aos antifúngicos.....	20
3 OBJETIVOS.....	22
3.1 Objetivo geral.....	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
4 METODOLOGIA.....	23
4.1 Tipo de pesquisa.....	23
4.2 Local e período.....	23
4.3 Sujeitos da pesquisa.....	23
4.7.1 <u>Critérios de inclusão</u>.....	23
4.7.2 <u>Critérios de exclusão</u>.....	23
4.4 Conceitos e definições.....	24
4.5 Variáveis clinico-epidemiológicas estudadas.....	24
4.6 Identificação e manutenção dos isolados.....	25
4.7 Determinação de mecanismos de virulência.....	25
4.7.1 <u>Pesquisa de proteinase</u>.....	25
4.7.2 <u>Pesquisa de fosfolipase</u>.....	26
4.7.3 <u>Pesquisa de hemolisina</u>.....	27
4.8 Sensibilidade frente aos antifúngicos.....	27
4.8.1 <u>Disco difusão</u>.....	27

4.9 Estratégias para análise de dados.....	28
4.9 Aspectos éticos.....	29
5 RESULTADOS.....	30
6 DISCUSSÃO	37
7 CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
APÊNDICE A – FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS.....	58
ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	51

1 INTRODUÇÃO

Espécies de *Candida* têm sido descritas como um dos principais agentes de infecção de corrente sanguínea, de difícil diagnóstico e associadas a alta morbidade e mortalidade. Em pacientes hospitalizados, essas leveduras são responsabilizadas por 80% das fungemias. Tal condição apresenta como consequência aumento no tempo de internação e elevado custo adicional para o tratamento dos pacientes.

A patogenicidade de um dado microrganismo é definida como a sua capacidade em aderir, infectar e causar a doença no hospedeiro. Nas infecções hematogênicas causadas por *Candida*, a virulência desses microrganismos pode estar diretamente ligada com a atividade de enzimas como proteinase, fosfolipase e hemolisina. Os fatores de virulência produzidos por *Candida* spp. têm sido amplamente estudados a fim de elucidar sua relação na patogenicidade. A produção de adesinas, hemolisinas, enzimas proteolíticas e lipolíticas, capacidade de formação de pseudo-hifas e variabilidade fenotípica são fatores de virulência atribuídos a essas leveduras.

As proteinases são responsáveis pela adesão e lesão tecidual no hospedeiro e capazes de degradar diversas proteínas humanas em sítios lesionados, como a albumina, hemoglobina, queratina e imunoglobulina da classe IgA. As fosfolipases são enzimas especializadas na hidrólise dos fosfolípídeos, componentes esses essenciais para a estrutura e função das membranas celulares e vesiculares. A habilidade de *Candida* spp. adquirir o ferro da hemoglobina através da produção de hemolisina é essencial para sua sobrevivência e para estabelecer infecções no hospedeiro. Os fatores de virulência de *Candida* spp. têm despertado interesse também para o desenvolvimento de novas terapêuticas antifúngicas contra candidíase.

Apesar de ainda ser observada pouca resistência antifúngica em *Candida* spp. provenientes de ambiente hospitalar, sabe-se que é importante a constante vigilância para correta prevenção e controle de infecções hospitalares causadas por fungos.

Considerando a escassez de dados sobre o tema em nossa região, faz-se necessário o estudo para o conhecimento do perfil epidemiológico, fenotípico e de susceptibilidade aos antifúngicos para correto controle e tratamento de infecções sistêmicas por *Candida* spp.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos gerais

As leveduras do gênero *Candida* pertencem ao reino *Fungi*, divisão *Eumycota*, subdivisão *Deuteromycotina*, filo *Ascomycota*, classe *Deuteromycetes*, ordem *Cryptococcales* e família *Cryptococcaceae*. São microrganismos unicelulares, eucarióticos, pleomórficos, abrangendo mais 150 espécies. Sua distribuição é muito ampla e pode ser encontrada na natureza (como em solo, água e plantas) assim como colonizar humanos e animais (KURTZMAN; FELL, 1998; LACAZ *et al.*, 2002; SILVA; DÍAZ; FEBRÉ, 2002).

Algumas espécies, em particular *Candida albicans* pode fazer parte da microbiota normal ou residente de humanos. Dados da literatura revelam que 20 a 80% dos indivíduos sadios possuem essa levedura na cavidade oral, no trato gastrointestinal e no sistema genitourinário (LACAZ *et al.*, 2002; ODDS, 1988).

São reconhecidas como microrganismos oportunistas. Normalmente, tornam-se patogênicas quando há alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou comprometimento de barreiras anatômicas como queimaduras ou procedimentos médicos invasivos (FRANÇA; RIBEIRO; QUEIROZ-TELLES, 2008; PFALLER; DIEKEMA, 2007). As alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro estão relacionadas a mudanças fisiológicas características da infância (prematuridade) ou envelhecimento e mais freqüentemente, associadas a doenças degenerativas, neoplasias, imunodeficiências congênitas ou adquirida e imunodepressão (ALMIRANTE *et al.*, 2005; CHANG *et al.*, 2008; CHENG *et al.*, 2005, DIGNANI; SOLOMKIN; ANAISSIE, 2003; FRANÇA; RIBEIRO; QUEIROZ-TELLES, 2008).

2.1 *Candida* e candidemia

As infecções causadas pela *Candida* podem variar de candidíase superficial de pele e mucosas até formas invasivas, comprometendo diversos órgãos após disseminação hematogênica (LACAZ *et al.*, 2002; ODDS, 1988).

Candidemia tem sido definida como a presença de *Candida* spp. na corrente sangüínea, enquanto que candidíase hematogênica engloba um amplo espectro de situações clínicas, incluindo desde episódios isolados de candidemia até casos onde

o fungo está presente na corrente sanguínea e dissemina-se para um ou vários órgãos do hospedeiro.

A maioria dos casos de infecção na corrente sanguínea por *Candida* é de origem endógena e acredita-se que seja principalmente decorrente da translocação da levedura através do trato gastrointestinal. Pode também ser adquirida a partir de origem exógena, por meio do contato das mãos dos profissionais de saúde com o paciente portador de cateter vascular central, implante de prótese contaminada, consequência da quebra da integridade da pele e por meio da administração parenteral de soluções contaminadas (BRITO *et al.*, 2006; HINRICHSEN *et al.*, 2008; ODDS, 1988).

A frequência de infecções em corrente sanguínea por fungos oportunistas cresce proporcionalmente ao número de pacientes em estado crítico. Procedimentos cirúrgicos, terapias citotóxicas com neutropenia prolongada, outras terapias imunossupressoras, uso de antibióticos de amplo espectro, implantação de aparelhos invasivos e a permanência em unidades de tratamento intensivo (UTI) são considerados fatores predisponentes (BECK-SAGUÉ, JARVIS, 1993; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; JARVIS, 1995).

Segundo dados do *National Nosocomial Infections Surveillance System* - NNISS nos primeiros anos da década de 80, nos Estados Unidos da América, *Candida* spp. já aparecia como sétimo patógeno mais comumente relacionado a infecção hospitalar, correspondendo a um aumento de 400% na incidência de candidemia (BECK-SAGUÉ; JARVIS; 1993).

Edmond *et al.*, (1999), em estudo realizado em 49 hospitais por 3 anos, observaram que *Candida* spp. foi o quarto microrganismo mais isolado de infecção de corrente sanguínea. A incidência de candidemia nos EUA encontrada por Hajjeh *et al.* (2004) foi de 1,5 episódio/10.000 pacientes-dia. *Candida* spp. tem sido descrita como a quarta causa de infecção da corrente sanguínea relacionada a assistência a saúde (IRAS). Espécies do gênero *Candida* têm sido responsabilizadas por 80% das fungemias (COLOMBO *et al.*, 2006; JARVIS, 1995; ST-GERMAN *et al.*, 2001).

Estudos Europeus mostram menor incidência de infecção de corrente sanguínea quando comparado a outras casuísticas, geralmente inferior a 0,7 episódio/10.000 pacientes-dia (ALMIRANTE *et al.*, 2005; ARENDRUP *et al.*, 2005; RICHET *et al.*, 2002; TORTORANO *et al.*, 2004).

No Brasil, um estudo realizado por Colombo *et al.* (2006) em 11 hospitais, revelou que *Candida* spp. foi também o quarto patógeno mais isolado de hemoculturas, precedido apenas por *Staphylococcus* coagulase-negativa, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*. A incidência descrita foi de 3,7 episódios/10.000 pacientes-dia, considerada alta quando comparada com os estudos anteriormente citados.

Em recente estudo realizado em São Paulo por Motta *et al.*, (2010), a incidência de fungemia por *Candida* foi de 2,7 episódios/10.000 pacientes-dia, dado semelhante ao relatado em publicações anteriores (COLOMBO *et al.*, 2006; COLOMBO *et al.*, 2007; HINRICHSEN *et al.*, 2008).

É importante ressaltar que dentre as mais de 150 espécies conhecidas de leveduras do gênero *Candida*, cerca de 20 são reconhecidas como patogênicas ao seres humanos. As principais espécies de interesse médico são: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilhermondii* e *Candida lusitanae*. Entre as menos freqüentes, mas que vem sendo consideradas patógenos emergentes cita-se: *Candida dubliniensis*, *Candida kefyr*, *Candida rugosa*, *Candida famata* e outras (LACAZ *et al.*, 2002; PFALLER, DIEKEMA, 2007).

Candida albicans – é a espécie mais frequentemente isolada de infecções na corrente sanguínea, variando de 40 a 80% nos EUA, de 60 a 70% Europa, de 12,5 a 53% na América Latina e aproximadamente 60% no Canadá (SANDVEN, 2000). É considerada a levedura com maior potencial de virulência devido à produção enzimas como de proteinases e fosfolipases, bem como a capacidade de invasão dos tecidos através da formação de pseudo-hifas para escape do sistema imune do hospedeiro. Está relacionada a maior de letalidade quando comparada com outras espécies não-albicans (ALMIRANTE *et al.*, 2006; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; HAYNES, 2001; MOTTA *et al.*, 2010).

Candida parapsilosis – é responsável por 10 a 20% dos casos de candidemia nos EUA, e nos países da América Latina tem sido descrita como a segunda espécie mais isolada (SANDVEN, 2000). Alguns estudos sugerem associação com prematuridade, ao uso de cateter vascular e nutrição parenteral (COLOMBO *et al.*, 2006; PFALLER, DIEKEMA, 2007). Caracteristicamente, é capaz de colonizar a pele humana e frequentemente as mãos de profissionais da saúde. Além disso, possui

ainda grande capacidade de formar biofilme em superfícies de cateter (ANTUNES *et al.*, 2004; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; PFALLER, DIEKEMA, 2007).

Candida tropicalis – nos EUA, cerca de 10% dos casos de infecções de corrente sanguínea são causados por *C. tropicalis*, enquanto que em países da América Latina, especialmente no Brasil essa espécie é frequentemente isolada, descrita como a segunda ou terceira causa de candidemia. De acordo com alguns estudos, sua incidência vem decrescendo juntamente com o aumento do uso profilático de antifúngicos azólicos (ANTUNES *et al.*, 2004; COLOMBO *et al.*, 2006; MOTTA *et al.*, 2010). Tem sido descrita principalmente em pacientes com tumor sólido e que apresentam neutropenia (PFALLER, DIEKEMA, 2007). Recente estudo desenvolvido por Motta *et al.* (2010) revelou que essa espécie foi a mais isolada em pacientes pediátricos de idade superior a um ano de vida.

Candida glabrata – Nos EUA, *C. glabrata* é o segundo agente mais isolado em infecções da corrente sanguínea entre as espécies de *Candida*, com frequência em torno de 20 a 25%, enquanto que na América Latina esse índice varia de 4 a 7% (PFALLER, DIEKEMA, 2007; SANDVEN, 2000).

Candida krusei – Assim como a *C. glabrata*, infecções hematogênicas por essa espécie parece estar relacionada com a exposição prévia do paciente aos antifúngicos azólicos (COLOMBO *et al.*, 2006). É isolada com certa frequência de pacientes com doenças hematológicas malignas e seu isolamento é relativamente baixo, em torno de 4%. Essa levedura é intrinsecamente resistente ao fluconazol, por outro lado, os demais fármacos azólicos tem demonstrado eficácia contra essa espécie (COLOMBO *et al.*, 2006; PFALLER, DIEKEMA, 2007).

Demais espécies – *Candida guilhermondii* é uma espécie pouco isolada de infecções sistêmicas, mas vem sendo considerada como importante patógeno emergente e parece estar relacionada com pacientes com tumor sólido. *C. lusitaniae* tem sido relatada com candidemia em pacientes imunocomprometidos e raramente está associada a infecções sistêmicas (COLOMBO *et al.*, 2006).

2.2 Mecanismos relacionados a virulência de *Candida* spp.

Patogenicidade é a capacidade do microrganismo em aderir, infectar e causar doença e a virulência é medida pela capacidade deste em levar o hospedeiro a

morte. Estes fatores são determinados geneticamente, mas somente expressos quando esses microrganismos são submetidos a certas condições, tais como o tipo e local da infecção e a resposta imune do hospedeiro (MADERGAN; FOGGIO; GONÇALVES, HOFLING, 2006; TAMURA *et al.*, 2007, VIANI, 2007).

Para que microrganismos oportunistas como leveduras do gênero *Candida* possam estabelecer uma infecção, é necessário que haja fuga do sistema imune, sobrevivência e multiplicação no organismo do hospedeiro e disseminação para novos tecidos (YANG, 2003).

Os principais fatores de virulência encontrados em *Candida* spp. incluem: produção de enzimas extracelulares tais como proteinase e fosfolipase, hemolisina, o fenômeno da aderência (adesinas), capacidade de formação de pseudo-hifas, variabilidade fenotípica e produção de toxinas (KUMAR *et al.*, 2009; VIANI, 2007; VIDOTTO *et al.*, 1999).

2.2.1 Proteinase

Nas últimas décadas diversos estudos sobre leveduras que secretam quantidades significativas de proteinases têm sido realizados. Essas enzimas são consideradas como principais fatores de virulência entre espécies de *Candida* (LACAZ *et al.*, 2002; OGRYDZIAK, 1993; TAMURA *et al.*, 2007).

A atividade proteolítica por *Candida albicans* foi primeiramente descrita em estudo realizado por Staib em 1965, que demonstrou a degradação de proteínas humanas por tais enzimas e sua análise estrutural (MADERGAN *et al.*, 2006). Três anos mais tarde Remond, Fasold e Staib (1968) encontraram tal atividade em espécies patogênicas. Em 1969, a associação entre a habilidade proteolítica de *C. albicans* e a patogenicidade foi demonstrada por Staib e apoiada por outros autores que também encontraram tal relação (ODDS, 1988).

Em estudo realizado por Know-Chung *et al.* (1985) foi demonstrado que *Candida albicans* que secretam proteinases invadem o tecido do hospedeiro com maior efetividade devido a maior facilidade de adesão às células epiteliais.

A partir do início da década de 90, diversas pesquisas foram realizadas incluindo a purificação das proteinases e a influência das propriedades como pH e temperatura na atividade dessas enzimas. Muitos trabalhos foram desenvolvidos na

tentativa de elucidar a relação da produção de exoenzimas por *Candida* spp e sua patogenicidade (CHAKRABARTI; NAYAK; TALWAR, 1991; IBRAHIM *et al.*, 1995; MADERGAN *et al.*, 2006).

Segundo a nomenclatura de enzimas, há quatro classes de proteinases encontradas em *Candida* spp.: serina proteinase, cisteína proteinase, metaloproteinases e aspartil proteinase. As três primeiras não têm sido associadas a espécies patogênicas de *Candida*. Por outro lado, muitos estudos têm documentado a presença de aspartil proteinases em leveduras patogênicas de *C. albicans* e outras espécies incluindo *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (MARDEGAN *et al.*, 2006; NAGLIK *et al.*, 2004).

A atividade proteolítica de *C. albicans* está relacionada com uma família de dez isoenzimas aspartil proteinases (SAPs), com peso molecular variando entre 35 e 50 kDa codificadas pelos genes SAP1-10. A expressão fenotípica de SAPs pode ser detectada em meios de albumina bovina como única fonte de nitrogênio (HUBE; NAGLIK, 2001; NAGLIK, 2004). Tais isoenzimas estão envolvidas em inúmeros processos bioquímicos e são capazes de degradar diversas proteínas humanas em sítios lesionados, como a albumina, hemoglobina, queratina e imunoglobulina da classe IgA e têm sido associadas a invasão tecidual (YANG, 2003).

Estudos *in vitro* mostraram que SAP1, 2 e 3 estão associadas com a forma leveduriforme e que as SAP4, 5 e 6 têm sido relacionadas com a formação de pseudo-hifas em pH neutro (YANG, 2003).

Ollert *et al.*, 1995, observaram que *C. albicans* isoladas de pacientes HIV positivos com candidíase em orofaringe tiveram maior expressão de proteinases do que o grupo controle que não era portador do vírus HIV. Encontraram ainda que leveduras com maiores níveis de produção dessas enzimas tinham menor sensibilidade aos antifúngicos cetoconazol e fluconazol.

Na tentativa de correlacionar a produção das aspartil proteinases e virulência, alguns estudos tem sido realizados com amostras de *C. albicans* isoladas de cavidade oral e de secreção vaginal. Tais estudos mostram relação positiva entre o nível de produção *in vitro* de aspartil proteinases e virulência de *C. albicans* (MADERGAN *et al.*, 2006).

Fallon *et al.* (1997) mostraram que candidíase disseminada em camundongos com administração de pepstatina A, um inibidor de proteinase, tiveram menores

índices de mortalidade quando comparados com o grupo controle, fortalecendo a idéia de que as aspartil proteinases desempenham importante papel na patogenicidade de *C. albicans*.

2.2.2 Fosfolipase

Os primeiros pesquisadores que descreveram a atividade lipolítica em *Candida* foram Werner (1966) e Costa (1967). Dez anos depois Pugh e Cawson (1977) demonstraram atividade lipolítica *in vivo* através da invasão da membrana cório-alantóide de ovos de galinha. A partir de então, muitos estudos vêm sendo realizados para estudar a participação dessas fosfolipases nos processos de patogenicidade das leveduras do gênero *Candida*.

Em estudo experimental utilizando murinos com candidíase disseminada, Ibrahim *et al.* (1995) demonstraram que *C. albicans* com maiores níveis de expressão de fosfolipase B estavam associadas com maior virulência (NIEWERTH; KORTING, 2001). De acordo com Yang (2003) leveduras de *Candida albicans* isoladas de infecção de corrente sanguínea têm demonstrado maior produção de fosfolipase do que em leveduras comensais.

As fosfolipases são enzimas especializadas na quebra dos fosfolipídeos, componentes esses essenciais para a estrutura e função das membranas celulares e vesiculares encontrados em quase todos os tecidos vivos (LEHNINGER *et al.*, 2011; PRICE; WILKINSON; GENTRY, 1982).

Diversos tipos de fosfolipases produzidas por *Candida albicans* já foram descritas, entre elas as fosfolipases A, B, C e D, lisofosfolipases e a lisofosfolipase transacilase. Agem na clivagem deste causando dano na estrutura da membrana celular com conseqüente lise celular e lesão tecidual (IBRAHIM *et al.*, 1995; NIEWERTH; KORTING, 2001).

A fosfolipase A age como catalisador na remoção de uma das duas porções de ácido graxo esterificadas do glicerol e seu produto é a lisolecitina que tem potencial para destruir membranas eritrocitárias levando à hemólise. A fosfolipase B lisa a molécula de glicerol e tem como produto de degradação a glicerilfosforilcolina e duas moléculas de ácidos graxos livres e tem sido considerada com maior

atividade em leveduras do gênero *Candida*. As fosfolipase C e D são menos estudadas, mas ainda assim participam ativamente da quebra de fosfolipídeos. A lisofosfolipase e a lisofosfolipase transacilase são responsáveis pela metabolização da lisolecitina produzida pela ação da fosfolipase A (NIEWERTH; KORTING, 2001; SAMARANAYAKE *et al.*, 2005).

A atividade fosfolipídica de amostras de *Candida* spp. produtoras de fosfolipasas pode ser observada através de um meio de cultura a base de gema de ovo, que contém grande quantidade de fosfatidietanolamina e fosfodilcolina, substratos para a ação da fosfolipase (PRICE; WILKINSON; GENTRY, 1982).

2.2.3 Hemolisina

Em 1994, Manns, Mosser e Buckley demonstraram a capacidade de *C. albicans* secretar hemolisinas, utilizando o ferro da hemoglobina para seu crescimento com conseqüente lise dos eritrócitos, mesmo assim, ainda hoje pouco se conhece sobre a atividade hemolítica em leveduras.

A fim de avaliar esse tipo de atividade, Luo, Samaranayake e Yau (2001) propuseram um método utilizando o meio de Ágar Sabouraud Dextrose suplementado com sangue de carneiro e glicose, que possibilitou a diferenciação das espécies pelo tipo de hemólise produzida. Os autores referiram ainda que espécies mais virulentas como *C. albicans* e *C. dubliniensis* apresentaram maior potencial de hemólise (ALMEIDA, 2009; LUO; SAMARANAYAKE; YAU, 2001).

Já está bem estabelecido na literatura que nos processos infecciosos, o ferro tem importância na instalação da infecção. Além disso, o ele é co-fator para uma grande variedade de enzimas e proteínas essenciais envolvidas no metabolismo e crescimento dos microrganismos, no transporte de elétrons e regulação da expressão de genes de virulência. Como forma de diminuir a disponibilidade de ferro livre nos fluidos do organismo, quase todo o ferro encontra-se ligado a hemoglobina nos eritrócitos, à transferrina no plasma ou à lactoferrina (TRABULSI; ALTERTHUM, 2002; ALMEIDA; WILSON; HUBE, 2009).

Sabe-se ainda que *Candida albicans* é capaz de obter ferro dentro do hospedeiro através de sideróforos produzidos por outros microrganismos da

microbiota e da ferritina intracelular (ALMEIDA; WILSON; HUBE, 2009; LUO; SAMARANAYAKE; YAU, 2001).

Assim, de acordo com dados da literatura a atividade hemolítica é um fator de virulência e patogenicidade exibido por microrganismos patogênicos. (LINARES *et al.*, 2007; LUO; SAMARANAYAKE; YAU, 2001; TANAKA *et al.*, 1997).

2.3 Susceptibilidade aos antifúngicos

De acordo com o consenso Internacional sobre as diretrizes de tratamento de infecções causadas por *Candida*, os fármacos disponíveis e de escolha para o tratamento das candidemias são os antifúngicos azólicos (Triazóis), as equinocandinas, a anfotericina B e a 5- fluorocitosina (PAPPAS *et al.*, 2009).

O fluconazol, o itraconazol e o voriconazol pertencem à classe dos azólicos e são drogas fungistáticas que agem na inibição da biossíntese dos lipídeos fúngicos. Em especial essas drogas atuam no ergosterol presente das membranas celulares dos fungos inibindo assim a sua divisão e multiplicação (KATZUNG, 2010; LACAZ *et al.*, 2008).

A anfotericina B é um antifúngico fungicida obtido pelo *Streptomyces nodosus*, que foi descoberto em 1956. É um macrolídeo poliênico, liga-se a molécula de ergosterol da membrana do fungo, altera sua permeabilidade formando “poros” com conseqüente lise celular. A sua toxicidade está relacionada a possíveis ligações com moléculas do colesterol humano (KATZUNG, 2010; LACAZ *et al.*, 2008;).

A 5-fluorocitosina é um fluorado sintético, tem ação tanto fungicida como fungistática. Dentro da célula fúngica é transformada em 5-fluoruracil e posteriormente em 5-fluordesoxiuridina interferindo na biossíntese dos ácidos nucléicos e nucleotídeos para o crescimento do fungo. Parece ser relativamente atóxica para as células de mamíferos e seu uso combinado com anfotericina B tem mostrado-se eficaz tendo permitido uma redução na dose de anfotericina (GÓMEZ *et al.*, 2010; KATZUNG, 2010).

Caspofungina, anidulafungina e micafungina são equinocandinas que inibem a síntese do $\beta(1,3)$ -D-glucana, componente essencial da parede celular de muitos fungos filamentosos e leveduras (GÓMEZ *et al.*, 2010; KATZUNG, 2010; LACAZ *et al.*, 2008).

No que diz respeito a resistência antifúngica, tem-se observado pouca resistência frente aos principais antifúngicos. Mesmo frente a anfotericina B, que é um dos fármacos com atividade antifúngica mais antiga, raros relatos de resistência de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* tem sido documentados. Alguns estudos mostraram que anfotericina B possui menor atividade *in vitro* frente às *Candida* não-albicans quando comparadas com *Candida albicans* (DONOWITZ, 2001; GÓMEZ *et al.*, 2010; TAPIA *et al.*, 2003). *Candida krusei* é intrinsecamente resistente ao fluconazol e *C. glabrata* pode apresentar sensibilidade reduzida tanto a anfotericina B quanto ao fluconazol, fato esse que justifica a emergência desses patógenos em infecções invasivas (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; PAPPAS *et al.*, 2009).

Dentre as principais causas apontadas como responsáveis pelo surgimento de resistência aos antifúngicos estão o uso prolongado de fluconazol de forma empírica ou profilática, uso de outras substâncias quimioterápicas e a resistência intrínseca ou diminuída de espécies de *Candida* não-albicans. No Brasil, os dados da literatura demonstram baixos índices de resistência ao fluconazol e a anfotericina B, em torno de 5% para o fluconazol e nenhum MIC superior a 2µg/mL para anfotericina B (COLOMBO *et al.*, 2006; ANTUNES *et al.*, 2004).

Leveduras resistentes a antifúngicos que se encontram no ambiente hospitalar representam um sério problema a pacientes com sistema imunológico debilitado, em especial pacientes imunocomprometidos (OKSUZ *et al.*, 2007).

A transmissão horizontal, de paciente para paciente, de profissionais da saúde para paciente ou ainda a transmissão endógena pode ocorrer. Tais condições acarretam em maior tempo de internação e custos com o tratamento do paciente e piora em seu prognóstico. Dessa forma, faz-se necessário a monitoração da susceptibilidade dessas leveduras frente aos antifúngicos (VIANI, 2007).

A emergência de leveduras de *Candida* spp. resistentes representam um sério desafio terapêutico. Estudos sobre os fatores de virulência e susceptibilidade antifúngica são importantes o desenvolvimento de novos antifúngicos menos tóxicos e também para o conhecimento da relação entre os fatores de virulência e a patogenicidade.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar aspectos epidemiológicos e clínicos de candidemia em pacientes internados em Hospital Público do Mato Grosso do Sul e investigar fatores de virulência nos agentes etiológicos.

3.2 Objetivos específicos

- a) descrever os dados demográficos e clínicos dos pacientes;
- b) estimar a frequência de *Candida* spp. isoladas de infecção em corrente sanguínea no Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul;
- b) caracterizar a atividade enzimática das leveduras estudadas (proteínase, fosfolipase e hemolisina); e
- c) avaliar a susceptibilidade antifúngica *in vitro* de *Candida* frente aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e itraconazol.

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo descritivo, seccional, fundamentada em pesquisa de laboratório.

4.2 Local e período

A presente investigação foi realizada no *Laboratório de pesquisas microbiológicas* do Departamento de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande – MS.

Foram incluídas no estudo *Candida* spp. provenientes de pacientes internados no Hospital Universitário “Maria Aparecida Pedrossian” da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (HU-UFMS), isoladas da corrente sanguínea no período de janeiro de 1998 a dezembro de 2010 e armazenadas em micoteca.

O Hospital Universitário “Maria Aparecida Pedrossian” da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, trata-se de um hospital geral de alta complexidade, possui 256 leitos, é credenciado pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e centro de referência estadual e regional para diversas especialidades médicas (BRASIL, 2010).

4.3 Sujeitos da pesquisa

4.3.1 Critério de inclusão

- a) Casos de candidemia de pacientes internados no Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (HU-UFMS), ocorridos no período de 1998 a 2010.

4.3.2 Critério de exclusão

- a) *Candida* spp. isolada de hemocultura inviabilizada após estocagem.
- b) Isolados de um mesmo paciente dentro de um período de 30 dias.

4.4 Conceitos e definições

Os pacientes foram classificados como prematuros com idade gestacional menor ou igual a 37 semanas, recém-nascidos com idade igual ou inferior a 28 dias, adultos com idade superior a 13 anos e idosos com idade igual ou superior 65 anos.

Leucopenia foi considerada quando o hemograma revelou um valor igual ou inferior a 4000 leucócitos/mm³, leucocitose quando o valor foi igual ou superior a 11000 leucócitos/mm³, neutropenia para valor absoluto menor ou igual a 500 células/mm³ e plaquetopenia quando a contagem foi igual ou inferior a 150.000 plaquetas.

4.5 Variáveis clínico-epidemiológicas

Os dados coletados a partir de prontuários médicos foram registrados em um formulário apropriado (apêndice A) para análise das seguintes variáveis:

- a) Dados demográficos: sexo e idade.
- b) Informação sobre a internação: tempo entre admissão e coleta da amostra positiva para *Candida* spp., setor e período de internação.
- c) Condições de risco anteriores a candidemia: uso de corticóide, neutropenia, plaquetopenia, diálise, internação em setores críticos (UTI/CTI), ventilação mecânica, sonda vesical ou nasogástrica/orogástrica, cateter venoso central, colonização prévia por *Candida*, nutrição parenteral total, dreno, cirurgia abdominal, uso de vancomicina, cateter umbilical, uso de antibióticos carbapenêmicos, uso de cefalosporinas de 3^a ou 4^a geração, uso de fármacos imunossupressores, uso de bloqueadores H2 ou omeprazol.
- d) Doença de base: Leucemia, tumor sólido, diabetes.
- e) Evolução: alta hospitalar ou óbito, dias entre internação e candidemia.

4.6 Identificação e manutenção dos isolados

As hemoculturas foram coletadas para fins de diagnóstico por solicitação médica. A coleta foi realizada em dois sítios diferentes após rigorosa anti-sepsia e encaminhada ao Setor de Bacteriologia do Laboratório de Análises Clínicas do NHU-UFMS. Para pacientes pediátricos foi realizada coleta de 1,5 a 3,0 mL de sangue e para pacientes adultos duas coletas de 8,0 a 10,0 mL de sangue em frasco de hemocultura do sistema automatizado BactAlert® série 9120 (BBL, Becton Dickinson, USA) conforme normas do fabricante.

Os frascos de cultura foram incubados no equipamento automatizado a temperatura de 35°. A partir das hemoculturas positivas foram feitas colorações pela técnica de Gram do material obtido. Com a confirmação de presença de leveduras, os frascos foram encaminhados ao Laboratório de Micologia do Laboratório de Análises Clínicas do NHU-UFMS para isolamento e identificação. Inicialmente as amostras de hemocultura foram semeadas em agar Sabouraud dextrose (ASD) e incubados a 25 °C e 35°C por até 48 horas.

A identificação do microrganismo foi realizada segundo técnicas convencionais, que incluíram: produção de tubo germinativo, microcultivo em ágar fubá suplementado com 1% de *tween* 80, teste de assimilação de carboidrato (auxanograma) e crescimento a 42°C (LACAZ *et al.*, 2008; LARONE, 2002; SIDRIM, 1999).

As leveduras foram mantidas a -20°C em Skim Milk (Difco®) e em caldo Brain Heart Infusion (BHI, Difco®) com glicerol a 50% no *Laboratório de pesquisas microbiológicas* do DFB/UFMS.

4.7 Determinação de mecanismos de virulência

4.7.1 Pesquisa de proteinase

A detecção de proteinase foi realizada utilizando uma modificação do método descrito por Rüchel, Tegeler e Trost (1982). A partir de uma cultura de 24h em ASD, fez-se uma suspensão da levedura em salina (NaCl 0,9%) estéril com turbidez equivalente a escala 0,5 de McFarland. Desta foi retirada uma alíquota (5µL)

contendo aproximadamente $7,5 \times 10^5$ UFC de *Candida* e inoculada em um disco de papel estéril (6mm de diâmetro) sobre a superfície do meio de albumina bovina [1,17% de Yeast Carbon Base (Difco, USA), 0,01% de extrato de levedura (Difco, USA) e 0,2% de soro de albumina bovina (SAB, fraction V, USA) e 2,0% de ágar (Oxoid, USA)] pH 5,0. As placas contendo 20mL de meio foram incubadas por 5 dias a 37°C. O teste foi realizado em triplicata em duas ocasiões e dos resultados encontrados foi calculada a média. Em todos os testes foi utilizado como controle positivo a cepa de *Candida albicans* ATCC 90028 . A atividade da proteinase foi determinada como descrito por Chakrabarti, Nayak e Talwar (1991). A zona de degradação enzimática foi mensurada contra a luz comum e classificada de acordo com o grau de produção de proteinase: Grau 1 quando observado de 1-2 mm de degradação ao redor do disco e Grau 2 quando a zona proteolítica foi maior do que 2 mm da margem do disco. O teste foi considerado negativo quando não observado clareamento visível ao redor do disco.

4.7.2 Pesquisa de fosfolipase

Para a pesquisa de fosfolipase foi utilizado o meio agar gema de ovo [2% Agar (Oxoid, USA), 1% de peptona (Oxoid, USA), 2% de glicose (Oxoid, USA), 1 M de NaCl (Synth,), 5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Synth, USA) e 8% de gema de ovo] descrito por Price, Wilkinson e Gentry (1982). Uma alíquota (5 μ l) de uma suspensão equivalente a escala 0,5 de McFarland contendo aproximadamente $7,5 \times 10^5$ UFC de *Candida* preparada em solução salina (NaCl 0,9%) foi inoculada em um disco estéril de papel (6mm de diâmetro) sobre a superfície do meio de fosfolipase e incubado por 5 dias a 37°C. A cepa ATCC 90028 (*Candida albicans*) foi utilizada como controle positivo e o teste foi realizado em triplicata em diferentes ocasiões e dos resultados encontrados foi calculado a média. A atividade da fosfolipase foi determinada como descrito por Chakrabarti, Nayak e Talwar (1991). A zona de degradação foi mensurada contra a luz comum e classificada de acordo com o grau de produção de fosfolipase, como negativa onde não houve clareamento visível ou muito limitado ao redor do disco, grau para 1-2 mm de degradação ao redor do disco e grau 2 quando a zona proteolítica foi maior do que 2 mm da margem do disco.

4.7.3 Pesquisa de hemolisina

A produção de hemolisina foi avaliada utilizando uma modificação da técnica descrita por Luo; Samaranayake; Yau (2001). Uma alíquota (5µl) de uma suspensão equivalente a escala 0,5 de McFarland contendo aproximadamente $7,5 \times 10^5$ UFC de *Candida* preparada em solução salina (NaCl 0,9%) foi inoculada em um disco estéril de papel (6mm de diâmetro) sobre uma placa contendo 20mL de ágar Sabouraud dextrose (Oxoid, England) suplementado com 3% de glicose (Oxoid, Spain) e 7% de sangue de carneiro. Após 48h de incubação em estufa a 37°C. O experimento foi realizado em quadruplicata em diferentes momentos e para controle positivo foi utilizada a cepa padrão ATCC 90028 (*Candida albicans*). A atividade da hemolisina foi determinada como descrito por França *et al.* (2009). A zona de degradação foi mensurada e classificada como: atividade fraca (+) quando observada de 1,5-2,7 mm de degradação ao redor do disco, média quando observada de 2,8 a 5,3 mm e forte para valores acima de 5,3 mm. O teste foi considerado negativo quando não houve zona de degradação ao redor do disco.

4.8 Teste de susceptibilidade aos antifúngicos

4.8.1 Disco difusão

Os testes de susceptibilidade antifúngica foram realizados utilizando discos dos antifúngicos anfotericina B 100 µg (CECON, Brasil), fluconazol 25 µg (CECON, Brasil) e itraconazol 10 µg (CECON, Brasil).

O meio de cultura utilizado para o teste de difusão em ágar foi o meio Mueller-Hinton (Oxoid, Spain) acrescido de 2% de glicose e $0,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de azul de metileno (Vetec, Brasil). O meio foi preparado conforme instruções do fabricante e armazenado em geladeira a 2-8°C por um período máximo de 30 dias até a sua utilização.

A partir de cultura de 24 h em ágar Sabouraud dextrose (Oxoid, England) foi feita uma suspensão da levedura em salina estéril com turbidez semelhante a escala 0,5 de McFarland. Uma alíquota do inóculo foi obtida através da introdução de um *swab* no tubo de ensaio contendo a suspensão e o excesso retirado pressionando-o

contra a parede do tubo. A inoculação foi realizada através do rolamento do *swab* por toda a placa de petri em pelo menos três sentidos diferentes. Em seguida, os discos contendo os antifúngicos foram dispostos sobre o ágar com o auxílio de uma pinça de metal estéril e após 15 min as placas foram incubadas por 24-48 horas em estufa a 35°C.

A leitura dos testes foi realizada através da mensuração dos halos de inibição de crescimento da levedura visualizados sob iluminação e fundo escuro. A interpretação do resultado para o fluconazol foi definido conforme o documento M 44-A do Clinical Laboratory Standarts Institute (Figura 1).

Uma vez que não há padronização para a interpretação da susceptibilidade dos isolados de *Candida* spp. frente ao itraconazol e à anfotericina B pela técnica de difusão em ágar, para a interpretação dos resultados, utilizou-se as recomendações do fabricante dos discos contendo os antifúngicos (CECON, Brasil), conforme figura 1. A leitura dos testes foi procedida da mesma maneira do que para o antifúngico fluconazol.

ANTIFÚNGICO	ZONA DE INIBIÇÃO (mm)		
	R	S-DD	S
Fluconazol 25 µg	≤ 14	15 - 18	≥ 19
Itraconazol 10 µg	≤ 11	12 - 19	≥ 20
Anfotericina B 100 µg	≤ 10	-	> 10

R: Resistente; S-DD: Sensível Dose Dependente; S: Sensível.

Figura 1 - Interpretação do teste de susceptibilidade *in vitro* de *Candida* spp. pelo método de difusão em ágar.

4.9 Estratégias para análise de dados

Os dados experimentais obtidos foram tabulados em planilha no software Excel® 2007 (MICROSOFT, 2007) e analisados juntamente com dados demográficos e clínicos dos pacientes em programa Epi-info® 3.5.1 (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2008). Utilizou-se, ainda, o programa SPSS versão 11.0 (STATISTICAL PACKAGE FOR THE SOCIAL SCIENCES S.L.,).

Qui-quadrado e teste exato de Fisher foram usados. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4.10 Aspectos éticos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e aprovado sob o protocolo de N.º 1619/09 (anexo A).

5 RESULTADOS

Na presente investigação foram estudados 137 casos de candidemia com diagnóstico laboratorial que atenderam os critérios de inclusão.

Sessenta e oito (68/137; 49,6%) pacientes eram do sexo masculino e pacientes femininos. A idade no dia da coleta da hemocultura positiva variou de 6 dias a 92 anos. Entre os pacientes pediátricos a mediana encontrada foi de 37 dias e entre os adultos foi de 57 anos. Entre todos os pacientes com diagnóstico de candidemia, 73 (73/137; 53,3%) eram adultos e 64 (64/137; 46,7%) crianças. Trinta e oito pacientes eram recém-nascidos, destes 31 (31/38; 81,6%) eram prematuros e 25 (25/38; 65,8%) tinham peso ao nascimento igual ou inferior a 1500g.

A média de dias entre a admissão hospitalar e a coleta da hemocultura positiva, foi de 21 dias \pm 15 dias e mediana de 18 com variação de 0 a 85 dias.

A distribuição dos casos de candidemia de acordo com a unidade de internação do paciente foi: 38 (38/137; 27,7%) no CTI adulto; 37 (37/137; 27%) na UTI neonatal, 17 (17/137; 12,4%) no CTI pediátrico, 15 (15/137; 10,9%) na clínica médica, 10 (10/137; 7,3%) na clínica cirúrgica I, 7 (7/137; 5,0%) na clínica pediátrica, 3 (3/137; 2,2%) na clínica cirúrgica II. No setor de oncologia, recuperação pós operatório e unidade renal foram registrados 2 (2/137; 1,5%) casos e no berçário, enfermaria de doenças infecciosas-parasitárias, setor de pneumologia e unidade coronariana 1 (1/137; 0,7%) caso.

Na tabela 1, estão elencadas condições de risco e as doenças de base que podem ter favorecido a colonização e/ou infecção sistêmica por leveduras do gênero *Candida*.

Tabela 1 – Fatores de risco e doenças de base avaliados em pacientes com candidemia segundo a frequência de *Candida* spp. isoladas de hemoculturas HU-UFMS – 1998 a 2010

Variável	<i>Candida albicans</i> n= 61	<i>Candida</i> não-albicans n= 76	<i>p</i>
Fatores de risco			
Cateter venoso central	56 (91,8)	60 (78,9)	0,038
Sonda vesical	27 (44,3)	35 (46,1)	
Sonda naso/orogástrica	50 (82,0)	51 (67,1)	
Dreno cirúrgico	14 (23,0)	17 (22,4)	
Nutrição parenteral total	33 (54,1)	38 (50,0)	
Internação UTI/CTI	45 (73,8)	53 (69,7)	
Colonização prévia	39 (63,9)	37 (48,7)	
Cirurgia	25 (41,0)	30 (39,5)	
Diálise	5 (8,2)	13 (17,1)	
Corticóide	26 (42,6)	20 (26,3)	
Antifúngico prévio	12 (19,7)	25 (32,9)	
Vancomicina	37 (60,7)	44 (57,9)	
Cefalosporina 3 ^a ou 4 ^a geração	53 (86,9)	55 (72,4)	0,039
Carbapenêmico	30 (49,2)	33 (43,4)	
Leucopenia	3 (4,9)	10 (13,2)	
Doença de base			
Diabetes	7 (11,5)	5 (6,6)	
Câncer			
Tumor sólido	5 (8,2)	6 (7,9)	
Leucemia	2 (3,3)	5 (6,6%)	

Obs: um paciente poderia apresentar mais de uma condição de risco.

A letalidade encontrada foi de 36 (36/64; 56,3%) pacientes pediátricos e 42 (42/73; 57,5%) adultos.

A figura 2 ilustra a distribuição de casos de candidemia segundo o ano de isolamento de leveduras do gênero *Candida*.

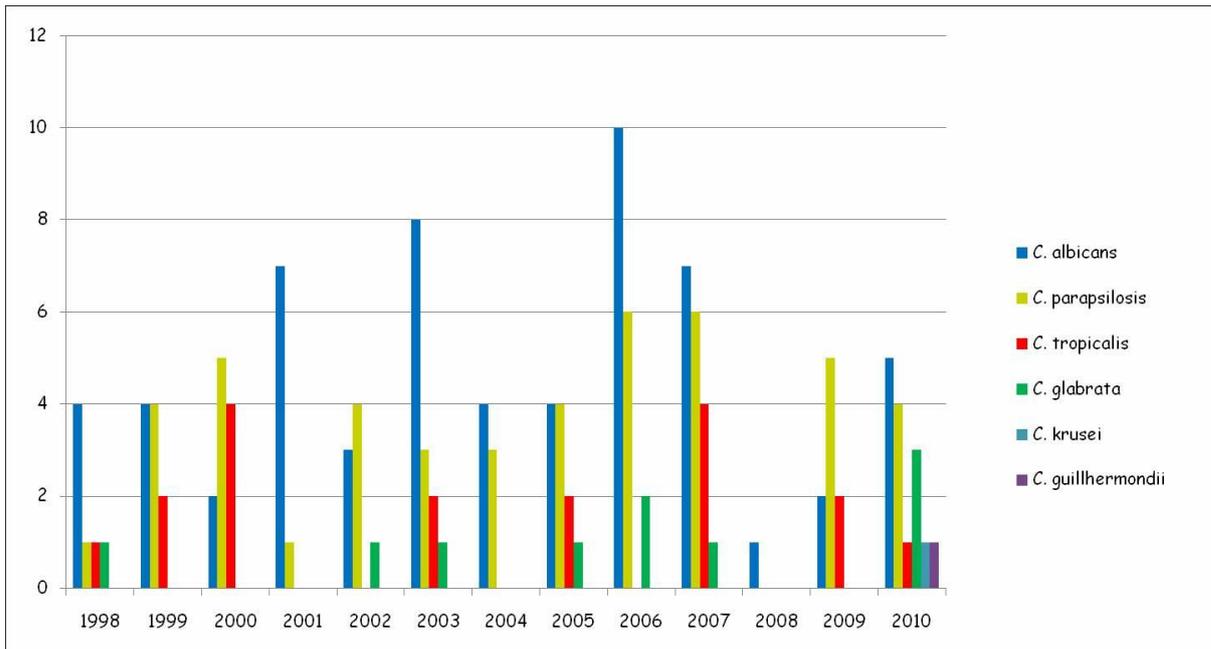


Figura 2: Distribuição de espécies de *Candida*, agentes de candidemia, de acordo com o ano de isolamento – HU-UFMS, 1998 a 2010.

As principais espécies de *Candida* isoladas de pacientes com candidemia no HU-UFMS no período de janeiro de 1998 a dezembro de 2010 foram *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (Tabela 2). *Candida albicans* representou 44,5% (61/137; 44,5%) e as espécies de *Candida* não-albicans representaram 55,5% (76/137; 55,5%).

Tabela 2 – Número e porcentagem das amostras de *Candida* spp. isoladas de pacientes internados no HU-UFMS – 1998 a 2010 (n=137).

Espécie	N	%
<i>Candida albicans</i>	61	44,5
<i>Candida parapsilosis</i>	45	32,8
<i>Candida tropicalis</i>	19	13,9
<i>Candida glabrata</i>	9	6,6
<i>Candida krusei</i>	2	1,5
<i>Candida guillhermondii</i>	1	0,7
Total	137	100,0

Na tabela 3 observa-se o perfil enzimático (proteínase, fosfolipase e hemolisina) das leveduras estudadas. Dentre todas, 123 (89,8%) leveduras apresentaram produção de proteína, 62 (45,2%) de fosfolipase e 135 (98,5%) hemolisina.

Tabela 3 – Produção de proteína, fosfolipase e hemolisina segundo as espécies de *Candida* spp. isoladas de hemocultura de pacientes internados no HU-UFMS – 1998 a 2010 (n=137).

Candida spp. (n)	Proteínase	Fosfolipase	Hemolisina
	N (%)	N (%)	N (%)
<i>Candida albicans</i> (61)	57 (93,4)	42 (68,8)	61 (100)
<i>Candida parapsilosis</i> (45)	41 (91,1)	6 (15,0)	43 (95,5)
<i>Candida tropicalis</i> (19)	17 (89,4)	5 (26,3)	19 (100,0)
<i>Candida glabrata</i> (9)	7 (77,8)	6 (66,7)	9 (100,0)
<i>Candida krusei</i> (2)	1 (50,0)	1 (50,0)	2 (100,0)
<i>Candida guilhermondii</i> (1)	1 (100,0)	1 (100,0)	1 (100,0)
Total (137)	124 (90,5)	62 (44,5)	135 (98,5)

N= número de isolados produtoras de fator de virulência

Os resultados apresentados na tabela 4 demonstram a atividade das enzimas proteína, fosfolipase e hemolisina das 61 *Candida albicans* e 76 *Candida* não-*albicans* isoladas de pacientes com candidemia. Cinquenta e sete (57/61; 93,4%) *C. albicans* e 67 (67/76; 88,1%) *Candida* não-*albicans* foram produtoras de proteína. A atividade de fosfolipase foi detectada em 42 (42/61; 68,8%) *Candida albicans* e 19 (19/76; 25,0%) *Candida* não-*albicans* (Tabela 4).

Tabela 4: Comparação dos fatores de virulência de *Candida albicans* e *Candida* não-*albicans* isoladas de hemocultura de pacientes internados no HU-UFMS.

Fator de virulência	<i>C. albicans</i> (n:61/137) n (%)	<i>Candida</i> não- <i>albicans</i> (n:76/137) n (%)	<i>p</i>
Proteinase	57 (93,4)	67 (86,8)	0,202
Fosfolipase	42 (68,8)	19 (25,0)	< 0,05
Hemolisina	61 (100)	74 (97,4)	0,202

Entre as amostras produtoras de proteinase, 96,5% (55/57) de *C. albicans* e 79,1% (53/67) de *Candida* não-*albicans* foram classificadas como Grau 2.

Das amostras produtoras de fosfolipase, uma grande porcentagem apresentou maiores níveis de atividade fosfolipídica, isto é, Grau 2 (Tabela 5).

Tabela 5 – Classificação da produção de proteinase e fosfolipase segundo as espécies de *Candida* spp. isoladas de hemocultura de pacientes internados no HU-UFMS – 1998 a 2010.

Espécie	Proteinase		Phosfolipase	
	Grau 1 (%)	Grau 2 (%)	Grau 1 (%)	Grau 2 (%)
<i>C. albicans</i>	2/57 (3,5)	55/57 (96,5)	6/42 (14,3)	36/42 (85,7)
<i>C. parapsilosis</i>	9/41 (21,9)	32/41 (78,1)		6/6 (100,0)
<i>C. tropicalis</i>	3/17 (17,6)	14/17 (82,4)		5/5 (100,0)
<i>C. glabrata</i>	2/7 (28,6)	5/7 (71,4)		6/6 (100)
<i>C. krusei</i>	-	1/1 (100)		1/1 (100,0)
<i>C. guilhermondii</i>	-	1/1 (100)	1/1 (100)	-
Total	16/124 (12,9)	108/124 (87,1)		55/61 (90,2)

Classificação segundo Chakrabarti, Nayak, e Talwar (1991)

A classificação quanto ao nível de hemólise pode ser observado na tabela 6. Com exceção de 5 isolados, todas as amostras de *Candida* spp. isoladas de infecção de corrente sanguínea foram indutoras de hemólise média ou forte.

Tabela 6 – Classificação da produção de hemolisina segundo as espécies de *Candida* spp. de amostras isoladas de candidemia no HU-UFMS – 1998 a 2010.

Espécie	Hemolisina		
	Fraca (%)	Média (%)	Forte (%)
<i>Candida albicans</i> (n=61)	-	4 (6,6)	57 (93,4)
<i>Candida</i> não- <i>albicans</i> (n=74)	5 (6,8)	13 (17,6)	56 (75,6)
<i>Candida parapsilosis</i> (n=43)	5 (11,6)	9 (20,9)	29 (67,5)
<i>Candida tropicalis</i> (n=19)	-	2 (10,5)	17 (89,5)
<i>Candida glabrata</i> (n=9)	-	2 (22,2)	7 (77,8)
<i>Candida krusei</i> (n=2)	-	-	2 (100)
<i>Candida guilhermondii</i> (n=1)	-	-	1 (100)
Total (n=135)	5 (3,7)	17 (12,6)	113 (83,7)

Classificação segundo França *et al.*, 2009

A avaliação da susceptibilidade antifúngica *in vitro* de *Candida* spp. revelou que todas as leveduras estudadas foram sensíveis a anfotericina B. Seis (4,4%) isolados tinham halo de inibição classificados como intermediário frente ao fluconazol. Quanto ao itraconazol, 2 amostras (1,5%) mostraram-se resistentes e 12,4% (n=17) foram classificadas como intermediário (tabela 7).

Tabela 7 – Susceptibilidade de *Candida* spp. isoladas de candidemia no HU-UFMS frente aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e itraconazol – 1998 a 2010.

Espécie	Anfotericina B			Fluconazol			Itraconazol		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
<i>Candida albicans</i> (n=61)	61	0	0	60	1	0	54	6	1
<i>Candida parapsilosis</i> (n=43)	43	0	0	0	1	0	0	5	0
<i>Candida tropicalis</i> (n=19)	19	0	0	0	1	0	0	2	0
<i>Candida glabrata</i> (n=9)	9	0	0	0	2	0	0	3	1
<i>Candida krusei</i> (n=2)	2	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Candida guilhermondii</i> (n=1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	137	0	0	130	5	0	117	17	2

5 DISCUSSÃO

Candidemia tem sido reconhecida como importante problema relacionado à assistência a saúde. Dados epidemiológicos têm enfatizado sua alta prevalência em pacientes com alterações nos mecanismos de defesa imunológica ou com comprometimento de barreiras anatômicas como queimaduras ou procedimentos médicos invasivos (LACAZ *et al.*, 2002; ODDS, 1988).

O objeto de estudo constituiu-se de 137 casos de candidemia diagnosticados no HU-UFMS, o qual foi responsável pelo isolamento e identificação das leveduras do gênero *Candida*.

Do ponto de vista demográfico, a distribuição do acometimento de candidemia em torno de 50% encontrado no presente estudo em relação ao sexo, está de acordo com relatos da literatura (CELEBI *et al.*, 2007; COLOMBO *et al.*, 2006; PAPPAS *et al.*, 2003). Por outro lado, Chi *et al.* (2011), encontraram em estudo realizado em Taiwan, que dos 108 pacientes, 68,5% eram do sexo masculino.

A mediana de idade dos pacientes pediátricos foi de 37 dias e dos pacientes adultos 57 anos, dado semelhante ao encontrado em estudo também brasileiro COLOMBO *et al.* (2006). Na presente casuística, observou-se significativa proporção de pacientes pediátricos (46,7%), resultado similar ao de FRANÇA *et al.* (2008) em hospital terciário da Universidade Federal do Paraná. Esta proporção encontrada se difere dos EUA, onde a porcentagem de crianças foi de 9% (PAPPAS *et al.*, 2003). Tal diferença na frequência provavelmente está relacionada com a variação de especialidades atendidas nos hospitais onde foram realizados os estudos.

Dentre os 38 recém-nascidos com candidemia, 31 (31/38; 81,6%) eram prematuros e 25 (25/38; 65,8%) tinham peso inferior a 1500g. Altos índices de infecção da corrente sanguínea causada por leveduras do gênero *Candida* em pacientes recém-nascidos prematuros e com baixo peso ao nascimento vem sendo descritos por diversos autores (ALVAREZ, 2008; COLOMBO *et al.*, 2006; MOTTA *et al.*, 2010; TIRABOSCHI *et al.*, 2007).

Elevados índices de acometimento de candidemia em neonatos está possivelmente relacionado a imaturidade em seu sistema imunológico ou ainda deficiência nutricional. Além disso, esses pacientes geralmente são submetidos a fatores de risco tais como utilização de antibióticos de amplo espectro, uso de ventilação mecânica, cateterização central, administração de nutrição parenteral,

hospitalização prolongada em unidade de terapia intensiva (UTI) neonatal e terapia com glicocorticosteróides (CELEBI *et al.*, 2007).

O tempo de internação entre a admissão hospitalar e a candidemia foi em média de 3 semanas. Este trabalho corrobora com outras casuísticas, que também demonstram que infecção da corrente sanguínea por *Candida* spp. geralmente ocorre após longos períodos de internação, em torno de 20 dias (ALMIRANTE *et al.*, 2005; CHANG *et al.*, 2008; CHENG *et al.*, 2005).

No presente trabalho, 62% dos pacientes com candidemia foram hospitalizados em unidades de terapia intensiva, 36 (26,28%) no CTI adulto, 32 (23,37%) na UTI neonatal e 17 (12,41%) no CTI pediátrico. Estes dados corroboram com outros estudos, que encontraram que infecção de corrente sanguínea por *Candida* é mais comumente observada em pacientes internados em UTI e submetidos a procedimentos invasivos (MOHAN DAS; BALLAL, 2010, RICHARDSON; LASS-FLÖRL, 2008; SACRISTÁN *et al.*, 2010). A alta porcentagem encontrada neste e em outros estudos, deve-se provavelmente a maior exposição de fatores de risco predisponentes para desenvolvimento de candidemia em pacientes de UTI/CTI.

As condições de risco para o desenvolvimento de candidemia com maior significância na literatura, assim como no presente trabalho são: o uso de cateter venoso central, sonda vesical de demora ou naso/orogástrica, nutrição parenteral total, imunossupressão, uso prévio de terapia antibiótica com cefalosporinas de 3ª ou 4ª geração, carbapenênicos ou vancomicina, tempo de internação prolongado em UTI's, cirurgia gastrointestinal, ventilação mecânica e corticoideterapia (CHENG *et al.*, 2005; CHI *et al.*, 2011; COLOMBO, 2006; KUMAR *et al.*, 2011).

A letalidade geral nesse trabalho foi de 56,2% (77/137; 56,2%), dado semelhante ao encontrado por Colombo *et al.* (2007) ao estudar 262 casos de candidemia de hospitais terciários de São Paulo. Em estudo realizado por Gondim *et al.* (2009) em hospital público de Uberlândia encontraram taxa de letalidade inferior (33,33%) em de pacientes com candidemia, índice inferior quando comparado ao presente trabalho. No entanto a avaliação da letalidade atribuída à candidemia é de difícil avaliação em se tratando de pacientes hospitalizados, normalmente com pelo menos alguma condição predisponente a candidemia, é esperada letalidade em mais de 50% dos pacientes (GUDLAUGSSON *et al.*, 2003).

Na presente casuística, das 137 leveduras estudadas, *Candida albicans* foi a espécie mais frequentemente isolada (61/137; 44,5%). Entretanto as espécies não-albicans juntas foram encontradas em percentual superior a *C. albicans* (76/137; 55,5%). Apesar de *C. albicans* ainda aparecer como agente mais isolado de materiais clínicos, infecções por *Candida* não-albicans têm sido cada vez mais frequentemente relatadas, mostrando uma mudança mundial no perfil epidemiológico das leveduroses, o que corrobora com os achados deste e de outros estudos (ANUNNATSIRI; CHETCHOTISAKD; MOOTSIKAPUN, 2008; CELEBI *et al.*, 2007; COLOMBO *et al.*, 2006; FRANCO, *et al.*, 2008; PFALLER, 2007).

Em estudo realizado por Godoy *et al.* (2003) em quatro hospitais terciários da América Latina, foi demonstrado que *Candida albicans* foi a espécie mais isolada, mas *Candida* não-albicans foram responsáveis por 60% dos casos de candidemia. Entre a década de 1970 e 1990, espécies de *Candida* não-albicans eram responsáveis por 10-40% dos isolados de infecção de corrente sanguínea e entre 1991 e 1998 representaram 35-60% das candidemias, confirmando a mudança no padrão de distribuição das espécies. Dentre as espécies não-albicans, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata* estão entre as mais isoladas, o que ocorreu também na presente investigação (KRCMERY; BARNES, 2002).

Candida parapsilosis foi a espécie de *Candida* não-albicans mais frequentemente isolada, com 32,8%. Esta espécie tem sido descrita por diversos autores como segundo agente mais prevalente em casos de candidemia (HINRICHSEN *et al.*, 2008; MATSUMOTO *et al.*, 2001; MOTTA *et al.*, 2010; MEDRANO *et al.*, 2006). De acordo com a literatura, essa espécie está relacionada com pacientes pediátricos menores de um ano de vida e recém-nascidos prematuros com baixo peso internados em unidade de terapia intensiva (CHANG *et al.*, 2008; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; HINRICHSEN *et al.*, 2008). É considerada agente de infecções exógenas por ser capaz de colonizar a pele, principalmente as mãos de profissionais da saúde, assim como cateter venoso central e associada à nutrição parenteral total (ALMIRANTE *et al.*, 2006; PFALLER; DIEKEMA, 2007).

Em contraste com a realidade brasileira e com os dados deste estudo, nos EUA e Europa têm-se *Candida glabrata* como segundo agente mais frequente nas infecções na corrente sanguínea por leveduras do gênero *Candida* (HAJJEH *et al.*, 2004; PFALLER; DIEKEMA, 2007; TORTORANO *et al.*, 2004). Nesse estudo esta

espécie representou apenas 6,6%, resultado semelhante ao encontrado em São Paulo por Matsumoto (2006) e Combo *et al.* (2006), onde *C. glabrata* foi responsável por 5,5% e 5%.

No Brasil, tem sido raramente responsável por candidemias. Não se sabe o real motivo dessa diferença na epidemiologia brasileira, acredita-se que esteja não somente relacionada ao uso prévio de azólicos, mas também com variáveis demográficas (pacientes idosos) e o uso prévio de antibióticos de amplo espectro (COLOMBO *et al.*, 2006; MOTTA *et al.*, 2010; PFALLER, DIEKEMA, 2007).

Na presente casuística, *Candida tropicalis* foi a terceira espécie mais isolada, representando 13,9% dos casos. Tem sido relatada por diversos autores brasileiros como segunda espécie mais isolada em candidemia, estando relacionada em paciente com tumor sólido e neutropênicos (FRANÇA *et al.*, 2008; NUCCI; COLOMBO, 2007). Pfaller *et al.* (2001) relataram que nos hospitais latino-americanos participantes do SENTRY, *Candida tropicalis*, assim como em nosso estudo, foi a terceira espécie mais prevalente. Em recente estudo realizado por Motta *et al.* (2010), encontraram porcentagem dessa espécie em 14,7% dos isolados, dado que confirma a distribuição das espécies nos casos de infecção por leveduras do gênero *Candida*.

Candida krusei e *C. guilhermondii* foram as espécies menos frequentes na presente casuística, 1,5 e 0,7% respectivamente, mas são reconhecidas como importantes agentes emergentes. Relatos na literatura descrevem infecção por *C. krusei* em pacientes portadores de doenças hematológicas malignas e/ou submetidos a transplante de medula óssea e ainda em pacientes neutropênicos em uso prolongado de fluconazol (MARR *et al.*, 2000; WINGARD, 1995). Colombo *et al.* (2006), em estudo prospectivo em onze hospitais de nove estados brasileiros, encontraram porcentagem semelhante a esse estudo em se tratando de isolamento de *C. krusei* (1,1%) e índice superior quanto a *C. guilhermondii* (2,2%).

Numerosos estudos do perfil fenotípico das espécies de *Candida* têm sido realizados, a fim de elucidar a relação entre a produção de fatores de virulência e patogenicidade destes microrganismos (GALAN-LADERO *et al.*, 2010; KUMAR *et al.* 2009; MACÊDO, *et al.*, 2009; MATSUMOTO *et al.*, 2001, MOHAN DAS; BALLAL, 2010; NEGRI *et al.*, 2010; NAGLIK, 2004).

Know-Chung *et al.* (1985) mostraram que amostras mutantes de leveduras do gênero *Candida* deficientes em proteinases, apresentavam menor virulência. Tais isolados foram mais facilmente fagocitados por leucócitos polimorfonucleares de humanos e de camundongos, o que comprova a correlação entre a produção dessa exoenzima e a virulência.

Dentre , todas as leveduras isoladas, 124 (90,5%) leveduras apresentaram produção de proteinase, 61 (44,5%) de fosfolipase e 135 (98,5%) hemolisina. Estudos anteriores sugerem que na patogênese da infecção hematogênica causada por *Candida* spp. isoladas do sangue, a atividade de proteinase, fosfolipase e hemolisina parecem ser importantes fatores de virulência (MOHAN DAS; BALLAL, 2010; GOKCE; CERIKCIOGLU; YAGCI, 2007; TEE *et al.*, 2011). Macêdo *et al.* (2009), sugerem que a caracterização enzimática de isolados de *Candida* spp. pode ser útil como marcador de prognóstico, especialmente entre indivíduos imunocomprometidos.

C. albicans costuma ser a espécie mais isolada em infecções superficiais e invasivas, apresenta diversos fatores de patogenicidade já estabelecidos na literatura incluindo capacidade de aderência, dimorfismo e produção de enzimas como proteinase e fosfolipase (ODDS, 1988). Em estudo realizado por Matsumoto *et al.* (2001), 87,9% das amostras de *C. albicans* isoladas de sangue e cateter produziram proteinase fortemente positiva. Macêdo *et al.* (2009), mostraram que 100% de amostras isoladas de *Candida* spp. de diferentes sítios de infecção foram positivas para proteinase.

Em relação à produção de proteinase por *Candida* não-*albicans*, 88,9% das *C. parapsilosis* mostraram-se produtoras, dado em concordância com estudos realizados por alguns autores (BATISTA, 2009; MATSUMOTO *et al.*, 2001). Estudos sobre perfil fenotípico de *C. tropicalis* têm sido realizados a fim de se elucidar a relação entre a produção de fatores de virulência e a patogenicidade desta espécie (FRANÇA *et al.*, 2009; GALÁN-LADERO *et al.*, 2009; NEGRI *et al.*, 2010). Negri *et al.* (2010) encontraram baixo índice de produção de proteinase, em oposição a Kumar *et al.* (2009), que relataram produção de proteinase em 100% das amostras.

Todas as amostras de *Candida* spp. foram produtoras de hemólise em ágar sangue com exceção de duas amostras de *C. parapsilosis*. Luo, 2001 conseguiu diferenciar espécies de *Candida* spp. a partir da do tipo de hemólise produzida, onde

C. parapsilosis não se mostrou produtora de hemolisina, dado contrário ao encontrado no presente estudo e ao de outros pesquisadores (RORIG; COLACITE; ABEGG, 2009; VIANI, 2007).

A alta expressão de proteinases em leveduras isoladas da corrente sanguínea pode justificar o potencial de invasão desses microrganismos. Em um estudo realizado por Macêdo *et al.* (2009), demonstraram que a alta atividade de proteinase estava diretamente relacionada ao grau de agressividade das leveduras. Em oposição, Mohan das e Ballal (2008), relatou em estudo que não foram observadas diferenças significativas em relação à média de produção de proteinase e fosfolipase em espécies de *Candida* isoladas de amostras de sangue.

Os resultados apresentados na tabela 4 demonstram a atividade das enzimas proteinase, fosfolipase e hemolisina das *Candida albicans* e *Candida* não-*albicans* isoladas de pacientes com candidemia. Estudos anteriores de outros autores mostraram que *C. albicans* são mais virulentas do que as espécies de *Candida* não-*albicans* (NAGLIK, 2004, NAGLIK, 2008). A literatura tem documentado que *Candida albicans* podem produzir altos níveis de proteinase e fosfolipase, enquanto espécies *Candida* não-*albicans* produzem níveis mais baixos dessas enzimas (GOKCE; CERIKCIOGLU; YAGCI, 2007; KANTARCIOGLU, 2002).

Neste estudo, não houve diferença significativa na produção de proteinase e hemolisina entre *C. albicans* e *Candida* não-*albicans* ($p = 0,202$), sugerindo a importância desta enzima para ambos os grupos. Semelhante ao relatado por França *et al.* (2010) em um hospital universitário do sudeste do Brasil, todas as *C. tropicalis* isoladas de sangue mostraram atividade hemolítica.

Na presente casuística, os resultados mostraram que em *Candida albicans* foram detectados níveis mais elevados de fosfolipase do que em *Candida* não-*albicans* (68,8% vs 25,0%), semelhante ao observado por Mohan das e Ballal (2010) e Tee *et al.* (2011). Por outro lado, Gokce *et al.* (2007) não encontrou amostras de *Candida* não-*albicans* produtoras de fosfolipase. Este fato pode estar relacionado a diferença entre as leveduras ou diferença na preparação de meio de cultura e substrato utilizado para detectar atividade de fosfolipase (GHANNOUM, 2000).

Segundo Ibrahim *et al.* (1995) a maior atividade de fosfolipase em isolados de *Candida albicans* obtidos de ratos com candidíase disseminada foi considerado fator de virulência preditivo de mortalidade. Nesse estudo, não foi observada associação

estatisticamente significativa entre a produção de proteinase, fosfolipase e hemolisina com desfecho fatal em pacientes com candidemia ($p > 0,05$).

Em se tratando dos antifúngicos disponíveis, classicamente, anfotericina B e os derivados azólicos fluconazol e itraconazol têm sido as drogas mais utilizadas no tratamento de infecções fúngicas invasivas (CHANG, *et al.*, 2008; MOEN *et al.*, 2009). Devido ao uso indiscriminado de antifúngicos, houve a emergência de leveduras resistentes ou com susceptibilidade reduzida (LACAZ, 2008; SILVA, 2002). Em decorrência desse fato, organizações internacionais como *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, EUA) e *European Committee on antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, CE) têm proposto técnicas de padronização para testes de susceptibilidade antifúngica (CLSI, 2008a, 2008b; EUCAST, 2008a, 2008b).

O método de difusão em ágar para leveduras do gênero *Candida* é uma variação da técnica utilizada na bacteriologia (BAUER *et al.*, 1966). É uma técnica de fácil realização e custos reduzidos quando comparado com a técnica de microdiluição em caldo. Este método está somente padronizado para o antifúngico fluconazol e voriconazol, descrita no documento M44-A do CLSI e classifica a amostra em susceptível, susceptível dose dependente ou resistente (CLSI, 2004). A limitação dessa metodologia está em não permitir a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), mas tem-se mostrado eficaz na detecção de resistência ou confirmação de susceptibilidade de leveduras frente ao fluconazol (PFALLER *et al.*, 2000; PFALLER, 2007).

Neste estudo, empregando a técnica de difusão em ágar, não foi demonstrado resistência frente ao fluconazol, compatível com resultados publicados por outros autores (MOTTA *et al.*, 2010). Seis (4,4%) amostras mostraram-se susceptíveis dose dependentes (SDD), o que está de acordo com dados encontrados na literatura (COLOMBO *et al.*, 2006; MOTTA *et al.*, 2010). Em contraste, estudo realizado na Espanha por Almirante *et al.* (2005), revelou susceptibilidade reduzida ao fluconazol em 7% das amostras isoladas de infecção na corrente sanguínea por *Candida* spp.. Resistência de *Candida krusei* frente ao fluconazol é um achado comum, essa espécie é considerada intrinsecamente resistente ao fluconazol (LACAZ *et al.*, 2008; ODDS, 1988).

Quanto a Anfotericina B e o Itraconazol, não há padronização para sua utilização na técnica de difusão em ágar devido a baixa reprodutibilidade de resultados e a limitação do poder preditivo positivo na identificação de leveduras resistentes (CLSI, 2004). Alguns estudos vêm sendo realizados na tentativa de padronizar a metodologia para esses antifúngicos (MESSER *et al.*, 2009; SINGH *et al.*, 2007).

Em relação à anfotericina B, todas as amostras apresentaram halo de inibição superior a 10 mm, equivalente a concentração inibitória mínima inferior a 1,0 µg/mL, sendo consideradas sensíveis, fato que está bem descrito na literatura (GIUSIANO *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2004). Raros relatos têm sido descritos quanto a resistência a este antifúngico (KUMAR *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2002).

Das 137 amostras estudadas, 2 amostras apresentaram-se resistentes e 17 (12,4%) das amostras demonstraram susceptibilidade dependente da dose (SDD) ao itraconazol. *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida albicans* foram as espécies que exibiram os menores halos de inibição de crescimento. Esses dados corroboram com outros estudos, onde há relato da emergência de leveduras resistentes ao azólicos (COLOMBO *et al.*, 2006; KUMAR *et al.*, 2011; MOTTA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2002).

Em conclusão, os resultados apresentados sugerem que a patogenicidade da *Candida* spp. é multifatorial, incluindo as características do microorganismo, o estado imunológico do hospedeiro e dos locais de infecção. A observação de níveis elevados de produção de enzimas por leveduras estudados sugere que estes fatores de virulência podem ter contribuído para a ocorrência de infecção na corrente sanguínea de pacientes.

5 CONCLUSÕES

Infecção de corrente sanguínea causada por leveduras do gênero *Candida* apresentadas pelo presente estudo acometeu pacientes do sexo masculino e feminino e pacientes pediátricos e adultos em proporções semelhantes (50%).

As condições de risco e doenças de base associadas a candidemia encontradas na presente casuística mostraram-se semelhantes a outros hospitais terciários do Brasil e de outros países.

A análise da evolução clínica mostrou alta taxa de letalidade, com índices maiores em pacientes com candidemia causada por *Candida albicans*, fator que pode estar relacionado a maior patogenicidade desse espécie.

Candida albicans foi o agente mais isolado quando comparada isoladamente por espécies, mas sua frequência foi menor quando comparada com o grupo de espécies de *Candida* não-*albicans*. Dentre as não-*albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* foram as espécies mais isoladas.

As leveduras estudadas demonstraram altos índices de proteinase, fosfolipase e hemolisina. Estas enzimas relacionadas à virulência de *Candida* spp. têm sido amplamente estudadas a fim de elucidar suas relações na instalação da infecção.

Neste estudo, não houve diferença significativa na produção de proteinase e hemolisina entre *C. albicans* e *Candida* não-*albicans* ($p = 0,202$) e que em *Candida albicans* foram detectados níveis mais elevados de fosfolipase do que em *Candida* não-*albicans* ($p < 0,05$).

Não foi observada associação estatisticamente significativa entre a produção de proteinase, fosfolipase e hemolisina com desfecho fatal em pacientes com candidemia ($p > 0,05$).

O teste de susceptibilidade frente aos antifúngicos testados mostrou que a maioria das amostras são sensíveis ao fluconazol e itraconazol. Todos os isolados foram sensíveis a anfotericina B.

Os resultados apresentados sugerem que a patogenicidade da *Candida* spp. é multifatorial, incluindo as características do microrganismo, o estado imunológico do hospedeiro e dos locais de infecção. A observação de níveis elevados de produção de enzimas por leveduras estudados sugerem que esses fatores de

virulência podem ter contribuído para a ocorrência de infecção da corrente sanguínea nos pacientes estudados.

Por fim acredita-se que o presente estudo poderá servir para documentar o perfil epidemiológico e fenotípico das leveduras do gênero *Candida* isoladas de corrente sanguínea, e utilizado como parâmetro para comparações em estudos futuros de vigilância epidemiológica nos hospitais de Mato Grosso do Sul, bem como de outras regiões do Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELSON, J. A.; MOORE, T.; BRUCKNER, D.; DEVILLE, J.; NIELSEN, K. Frequency of fungemia in hospitalized pediatric inpatients over 11 years at a tertiary care institution. **Pediatrics**, Houston, v. 116, n. 1, p. 61-67, July 2005.
- ALMEIDA R. S.; WILSON D., HUBE B. *Candida albicans* iron acquisition within the host. **FEMS Yeast Research**, England, v. 7, n. 9, p. 1000-1012, Aug. 2009.
- ALMIRANTE, B.; RODRIGUES, D.; PARK, B. J.; CUENCA-ESTRELLA, M.; PLANES, A. M.; ALMELA, M.; MENSA, J.; SANCHEZ, F.; AYATS, J.; GIMENEZ, M.; SABALLS, P.; FRIDKIN, S. K.; MORGAN, J.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; WARNOCK, D. W.; PAHISSA, A.; BARCELONA CANDIDEMIA PROJECT STUDY GROUP. Epidemiology and predictor of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 4, p. 1829-1835, Apr. 2005.
- ÁLVAREZ, T. R. Infecção por espécies de *Candida* durante los cuidados intensivos neonatales. **Revista Cubana de pediatria**, La Habana, v. 80, n.3, jul./sept. 2008.
- ANTUNES, A. G. V.; PASQUALOTTO, A. C.; DIAZ, M. C.; D'AZEVEDO, P. A.; SEVERO, L. C. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 46, n. 5, p. 239-241, Sept./Oct. 2004.
- ANUNNATSIRI, S.; CHETCHOTISAKD, P.; MOOTSIKAPUN, P. Fungemia in non-HIV-infected patients: a five-year review. **International Journal of Infectious Diseases**, Brookline, v. 13, n. 1, p. 90-96, Jan. 2008.
- ARENDRUP, M. C.; FUURSTED, K.; GAHRN-HANSEN, B.; MÜLLER, J.; KNUDSEN, J. D.; LUNDGREN, B.; SCHÜNHEYDER, H. C.; TVEDE, M. Seminal surveillance of fungemia in Denmark: notably high rates of fungemia and numbers of isolates with reduced azoles susceptibility. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.43, n.9, p. 4434-4440, Sept. 2005.
- AYRES, M.; AYRES JUNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. A. **BioEstat versão 4.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas**. Belém: UFPA, 2005.
- BATISTA, G. C. T. **perfil fenotípico e genotípico de leveduras isoladas da cavidade oral, sangue e cateter de neonatos internados em unidade de terapia intensiva neonatal de hospital terciário de São Paulo**. 2009. 108 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo/USP, São Paulo, 2009.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, Birmingham, V. 45, n. 4, p. 493-496, Apr. 1966.

BECK-SAGUÉ C., JARVIS W. R. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. **Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 167, n.5, p. 1247-1251, May 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde. **CnesWeb – cadastro nacional de estabelecimento de saúde**. Brasília, 2008a. Disponível em: <http://cnes.datasus.gov.br/cabecalho_reduzido.asp?VCod_Unidade=5002700009709>. Acesso em: 03 maio 2011.

BRITO, L. R.; GUIMARÃES, T.; NUCCI, M.; ROSAS, R. C.; ALMEIDA, L. P.; MATTA, D. A.; COLOMBO A. L. Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *C. parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. **Medical Mycology**, London, v. 44, n. 3, p. 261-266, May. 2006.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Epi Info 2008, versão 3.5.1: programs for use by public health professionals**. Atlanta: CDC, 2008.

CELEBI, S.; HACIMUSTAFAOGLU, M.; OZDEMIR, O.; OZKAYA G. Nosocomial candidaemia in children: results of a 9-year study. **Mycoses**, Hoboken, v. 51, v. 3, p. 248-257, May 2008.

CHAKRABARTI, A.; NAVAK, N.; TALWAR P. In vitro proteinases production by *Candida* species. **Mycopathologia**, Albany, v. 114, n. 3, p. 163-168, June 1991.

CHANG, M. R.; CORREIA, F. P.; COSTA, L. C.; XAVIER, P. C. N.; PALHARES, D.B.; TAIRA, D. L.; PANIAGO, A. N. N.; PONTES, E. R. J. C.; MACHADO, V. E. *Candida* bloodstream infection: data from a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 50, n. 5, p. 265-268, Sept./Oct. 2008.

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 Infectious Diseases**, London, v. 5, n.22, p. 1-5, Apr., 2005.

CHI H. W.; YANG Y. S.; SHANG S. T.; CHEN K. H.; YEH K. M.; CHANG F. Y.; LIN J. C. *Candida albicans* versus non-*albicans* bloodstream infections: The comparison of risk factors and outcome. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, Taipei, p. 1-7, Mar. 2011.

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, 2008a.

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, 2008b.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Guideline, M44-A**. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2004.

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

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUER, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816-1823, Aug. 2006.

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. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Chicago, v. 28, n.5, p. 570-576, Apr. 2007.

CORTÉS J. A.; REYES P., GÓMEZ C.; BUITRAGO G.; LEAL A. L.; GREBO. Fungal bloodstream infections in tertiary care hospitals in Colombia. **Revista Iberoamericana de Micología**, Bilbao, v. 28, n. 2, p. 74-78, June. 2011.

COSTA, A. L.; MISEFARI A.; AMATO A. Enzymatic activities of mycetes. Enzymatic activity of *Candida albicans* in egg yolk-containing media. **Atti. XIV Congresso Nazionale di Microbiologia**, Messina Taorina, Italy. 1967.

DIGNANI M. C.; SOLOMKIN J. S.; ANAISSIE E. *Candida*. In: ANAISSIE, E.; MCGINNIS, M. R., PFALLER, M. A. (Org.). **Medical Mycology**. 1. ed. Filadélfia: Churchill Livingstone, 2003, p. 195-239.

DONOWITZ G. R.; MAKI D. G.; CRNICH C. J.; PAPPAS P. G.; ROLSTON K. W. Infections in the neutropenic patient-new views of an old problem. **Hematology**, Washington, v. 1, n.1, p. 112-139, 2001.

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 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.

FALLON, K.; BAUSCH, K.; NOONAN, J.; HUGUENEL, E.; TAMBURINI, P. Role of aspartic proteases in disseminated *Candida albicans* infection in mice. **Infection and Immunity**, Washington, v. 65, n. 2, p. 551-556, Feb. 1997.

FRANÇA, J. C. B.; RIBEIRO, C. E. L.; QUEIROZ-TELLES, F. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: incidence, frequency of different species, risk factors and antifungal susceptibility. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 41, n. 1, p. 23-28, jan./feb. 2008.

FRANÇA, E. J. G.; FÁVERO, D.; SCREMIN, H.; OLIVEIRA, M. T.; FURLANETO-MAIA, L.; QUESADA, R. M. B.; FURLANETO, M. C. Hemólise produzida por *Candida tropicalis* isoladas de amostras clínicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 43, n. 3, p. 318-321, maio./jun. 2008.

GALÁN-LADERO, M. A.; BLANCO, M. T.; SACRISTÁN, B.; FERNÁNDEZ-CALDERÓN, M. C.; PÉREZ-GIRALDO, C.; GÓMEZ-GARCÍA A. C. Enzymatic activities of *Candida tropicalis* isolated from hospitalized patients. **Medical Mycology**, Edinburgh, v. 48, n. 1, p. 207-210, Feb. 2010.

GHANNOUM, M.A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 13, n.1, p. 122-143, Jan. 2000.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 3, p. 225-234, jun. 2010.

GIUSIANO, G.; MANGIATERRA, M.; SAITO, V. G.; ROJAS, F.; GOMEZ, V.; DIAZ, M. C. Etiology of fungaemia and catheter colonisation in Argentinean paediatric patients. **Mycoses**, Hoboken, v. 49, n. 1, p. 49-54, Jan. 2006.

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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.98, n.3, p.401-5, Apr. 2003.

GOKCE, G.; CERIKCIOGLU, N.; YAGCI, A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. **Mycopathologia**, Albany, v. 164, n. 6, p. 265-269, 2007.

GÓMEZ J.; GARCÍA-VÁZQUEZ E.; HERNÁNDEZ A.; ESPINOSA C.; RUIZ J. Candidemias nosocomiales: nuevos retos de um problema emergente. **Revista Espanola De Quimioterapia**, Barcelona, v. 23, n. 4, p. 158-168, dic. 2010.

GONDIM, B. A.; BRITO, D. D.; BRITO, C. S.; VON DOLINGER, E. J. O.; ABDALLAH, V. O. S.; GONTIJO FILHO, P. P. Fatores de risco para colonização e sepse por *Candida albicans* e *Candida* não albicans em neonatos críticos. **Revista Arquivos de Ciências da Saúde**, Umuarama, v. 16, n. 3, p. 105-109, jul-set 2009.

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. *Clinical Infectious Diseases*, Oxford, v.37, n.9, p.1172-7, Nov. 2003.

HAIJEH, R. A.; SOFAIR, A. N.; HARRISON, L. H.; LYON, G. M.; RTHINGTONSKAGGS, B. A.; MIRZA, S. A.; PHELAN, M.; MORGAN, J.; LEE-YANG, W.; CIBLAK, M. A.; BENJAMIN, L. E.; SANZA, L. T.; HUIE, S.; YEO, S. F.; BRANDT, M. E.; WARNOCK, D. W. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.42, n.4, p.1519-27, Apr. 2004.

HAYNES K. Virulence in *Candida* species. **TRENDS in Microbiology**, Oxford, v. 9, n. 12, p. 591-596, Dec. 2001.

HUBE, B.; NAGLIK, J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiology**, Reading, v. 147, n. 1, p. 1997-2005, Aug. 2001.

HINRICHSEN, S. M. L.; FALCÃO, E.; VILELLA, T. A. S.; COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; MOURA, L.; REGO, L.; LIRA, C.; ALMEIDA L. Candidemia em hospital terciário do nordeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 41, n. 4, p. 394-398, jul./ago. 2008.

IBRAHIM, A. S.; MIRBOD, F.; FILLER, S. G.; BANNO, Y.; COLE, G. T.; KITAJIMA, Y.; EDWARDS, J. E.; NOZAWA JÚNIOR, Y.; GHANNOUM, M. A. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 63, n. 5, p. 1993–1998, May. 1995.

JARVIS, W. R. Epidemiology of nosocomial fungal infections with emphasis on *Candida* species. **Clinical Infectious Diseases**, Boston, v. 20, n. 6, p. 1526-1530, June, 1995.

KANTARCIOGLU, A. S.; YUCEL, A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the source of strains. **Mycoses**, Hoboken, v. 45, n. 5-6, p. 160-165, June 2002.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 10. ed. Porto Alegre: AMGH, 2010.

KRCMERY, V.; BARNES, A. J. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **Journal of Hospital Infection**, Glasgow, v. 50, n. 4, p. 243-60, Apr. 2002.

KWON-CHUNG, K. J.; LEHMAN, D.; GOOD, C.; MAGEE, P. T. Genetic evidence for role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 49, n. 3, p. 571-575, Sep. 1985.

KUMAR, V. G.; LATHA, R.; VEDHAGIRI K.; SATHIAMOORTHY T.; JAYARANI G.; SASIKALA R.; SELVIN J., NATARAJASEENIVASAN K. Phospholipase C, proteinase

and hemolytic activities of *Candida* spp. isolated from pulmonary tuberculosis patients. *Journal de Mycologie Médicale*, Paris, v. 19, n. 1, p. 3-10, Mar, 2009.

KURTZMAN C. P.; FELL, J. W. The yeasts. **A taxonomic study**. 4. ed. Amsterdam: Elsevier, 1998.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LARONE, D.H. **Medically Important Fungi, a Guide to Identification**, 4. ed. Washington: American Society for Microbiology Press, 2002.

LINARES, C. E. B.; LORETO E. S.; SILVEIRA, C. P.; POZZATTI, P.; SCHEID, L. A.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. Enzymatic and hemolytic activities of *Candida dubliniensis* strains. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 49, n. 4, p. 203-206, July/Aug. 2007.

LUO, G.; SAMARANAYAKE, L. P.; YAU, J. Y. Y. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 8, p. 2971-2974, Aug. 2001.

MACÊDO, D. P. C.; FARIAS, A. M. A.; LIMA NETO, R. G.; SILVA, V. K. A.; LEAL, A. F. G.; NEVES, R. P. Infecções oportunistas por leveduras e perfil enzimático dos agentes etiológicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 42, n. 2, p. 188-191, mar./abr. 2009.

MANNS, J. M.; MOSSER D. M.; BUCKLEY, H. R. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 62, n. 11, p. 5154-5156, Nov. 1994.

MARDEGAN, R. C.; FOGLIO, M. A.; GONÇALVES, R. B.; HÖFLING, J. F. *Candida albicans* proteinases. **Brazilian Journal Of Oral Sciences**, Piracicaba, v. 5, n. 16, p. 944-952, Jan.-Mar. 2006.

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**, Albany, v. 154, n. 2, p. 62-69, 2001.

MATSUMOTO, F. E. **Candidemia em hospital público infantil de São Paulo: caracterização genotípica das leveduras em associação e sensibilidade aos antifúngicos**. 2006. 136 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo/USP, São Paulo, 2006.

MARR, K. A.; SEIDEL; T. C. WHITE; R. A. BOWDEN. Candidemia in allogeneic blood and marrow transplant recipients: evolution of risk factors after the adoption of

prophylactic fluconazole. **Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 181, n. 1, p.309–316, Jan. 2000.

MEDRANO, D. J.; BRILHANTE, R. S.; CORDEIRO RDE, A.; ROCHA, M. F.; RABENHORST, S. H.; SIDRIM, J. J. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, São Paulo, v.48, n.1, p.17- 20, jan/fev. 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). **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.1, n.1, p. 1-14, Apr. 2009.

MICROSOFT Office Enterprise 2007: **Office Excel®**. [s.1.]: Microsoft Corporation, 2006.

MOHAN DAS, V.; BALLAL, M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. **Revista Iberoamericana de Micologia**, Bilbao, v. 25, n. 4, p. 208-10, Dec. 2008.

MOTTA A. L.; ALMEIDA, G. M. D.; ALMEIDA JÚNIOR, J. N.; BURATTINI, M. N.; ROSSI, F. Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. **Brazilian Journal of Infect Diseases**, Salvador, v. 14, n. 5, p. 441-448, Oct. 2010.

NAGLIK, J.; ALBRECHT, A.; BADER, O.; HUBE, B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. **Cellular Microbiology**, Hoboken, v. 6, n. 10, p. 915-926, Oct. 2004.

NEGRI, M.; MARTINS, M.; HENRIQUES, M.; SVIDZINSKI, T.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. **Mycopathologia**, Albany, v. 169, n. 3, p. 175-182, Mar. 2010.

NIWERTH M.; KORTING H. C. Phospholipases of *Candida albicans*. **Mycoses**, Hoboken, v. 44, n. 9, p. 361-367, Nov. 2001.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, North Liberty, v. 58, n. 1, p.77-82, May 2007.

ODDS, F. C. **Candida e Candidosis: a review and bibliography**. Ed. Ballière Tindall. London United Kingdom. 2ed., 468p. 1988.

OKSUZ, S.; SAHIN, I. YILDIRIM, M.; GULCAN, A.; YAVUZ, T.; KAYA, D.; KOC, A. N. Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, Tokyo, v. 60, n. 5, p. 280-283, Sept. 2007.

OLLERT M. W.; WENDE C.; GÖRLICH M.; MCMULLAN-VOGEL C. G.; BORG-VON ZEPELIN M.; VOGEL C. W.; KORTINGINCREASED W. C. Expression of *Candida albicans* Secretory Proteinase, a Putative Virulence Factor, in Isolates from Human Immunodeficiency Virus-Positive Patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 10, p. 2543-2549, Oct. 1995.

OGRYDZIAK, D. M. Yeast extracellular proteases. Critical reviews in biotechnology, London, v. 13, n. 1, p. 1-55, 1993.

OKSUZ, S.; SAHIN, I. YILDIRIM, M.; GULCAN, A.; YAVUZ, T.; KAYA, D.; KOC, A. N. Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, Tokyo, v. 60, n. 5, p. 280-283, Sept. 2007.

PAPPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D.; BENJAMIN, D. K., JR.; CALANDRA, T. F.; EDWARDS, J. E., JR.; FILLER, S. G.; FISHER, J. F.; KULLBERG, B. J.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI, A. C.; REX, J. H.; WALSH, T. J.; SOBEL, J. D. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 48, n. 5, p. 503-35, Mar. 2009.

PFALLER, M. A. Antifungal susceptibility testing: progress and future developments. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 4, p. 2, p. 55-60, 2000a.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; JONES, R. N.; SADER, H. S.; FLUIT, A. C.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A. 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. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.39, n.9, p.3254-9, Sep. 2001.

PFALLER M. A.; DIEKEMA D. J. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 20, n. 1, p. 133-163, Jan. 2007.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, Edinburgh, v. 20, n. 1, p. 7-14, Mar. 1982.

PUGH D.; CAWSON R. A. The cytochemical localization of phospholipase in *Candida albicans* infecting the chick chorio-allantoic membrane. **Sabouraudia**, Edinburgh, v. 15, n. 1, p. 29, Mar. 1977.

REMOLD, H.; FASOLD, H.; STAIB F. Purification and characterization of a proteolytic enzyme from *Candida albicans*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Oxford, v. 167, n. 2, p. 399-406, 1968.

RENTZ, A. M.; HALPERN, M. T.; BOWDEN, R. The impact of candidemia on length of hospital stay, outcome and overall cost of illness. **Clinical Infectious Diseases**, Boston, v. 27, n. 4, p. 781-788, Oct. 1998.

RICHARDSON, M.; LASS-FLOR, L. C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. **Clinical Microbiology and Infection**, Hoboken, v. 14, n. 4, p.5-24, May 2008.

RICHET H.; ROUX P.; DES CHAMPS C.; ESNAULT Y.; ANDREMONT A.; FRENCH CANDIDEMIA STUDY GROUP. Candidemia in French hospitals: incidence rates and characteristics. **Clinical Microbiology and Infection**, Hoboken, v.8, n. 7, p. 405-412, Jul. 2008.

RÖRIG, K. C. O.; COLACITE, J.; ABEGG, M. A. Produção de fatores de virulência in vitro por espécies patogênicas do gênero *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 42, n. 2, p. 225-227, mar./abr. 2009

RÜCHEL, R.; TEGELER, R.; TROST, M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 20, n. 3, p. 233-244, Sept. 1982.

SACRISTÁN, B.; BLANCO, M.T.; GALÁN-LADERO, M.A.; BLANCO, J.; PÉREZ-GIRALDO, C.; GÓMEZ-GARCÍA, A.C. Aspartyl proteinase, phospholipase, hemolytic activities and biofilm production of *Candida albicans* isolated from bronchial aspirates of ICU patients. **Medical Mycology**, London, v.49, n. 1, p. 94-97, May 2010.

SAMARANAYAKE, Y. H.; DASSANAYAKE, R. S.; JAYATILAKE, J. A. M. S.; CHEUNG, B. P. K.; YAU, J. Y. Y.; YEUNG, K. W. S. ; SAMARANAYAKE L. P. Phospholipase B enzyme expression is not associated with other virulence attributes in *Candida albicans* isolates from patients with human immunodeficiency virus infection. **Journal of Medical Microbiology**, Reading, v. 54, n. 6, p. 583–593, June 2005.

SANDVEN, P. Epidemiology of candidemia. **Revista Iberoamericana de Micología**, Bilbao, v. 17, n. 3, p. 73-81, Sept. 2000.

SIDRIM, J. J. C. Micoses oportunistas. In: SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. M. (Ed.). **Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 15, p. 171-190, 1999.

SILVA, V.; DÍAZ, M. C.; FEBRÉ, N. Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. **Revista Chilena de Infectología**, Providencia, v. 19, v. 2, p. 149-156, 2002.

SINGH, J.; ZAMAN, M.; GUPTA, A. K. Evaluation of microdilution and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. **Medical Mycology**, Edinburgh, v. 45, n. 7, p. 595-602, Nov. 2007.

STAIB, F. Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi. **Sabouraudia**, Edinburgh, v. 4, n. 3, p. 687, Oct. 1965.

ST-GERMAIN, G.; LAVERDIERE, M.; PELLETIER, R.; BOURGAULT, A. M.; LIBMAN, M.; LEMIEUX, C.; NOEL, 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. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 3, p. 949-953, Mar. 2001.

TAMURA, N. K.; NEGRI, M. F. N.; BONASSOLI, L. A.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fatores de virulência de *Candida* spp isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 40, n. 1, p. 91-93, jan./fev. 2007.

TANAKA, W. T. H.; NAKAO, N.; MIKAMI, T.; MATSUMOTO, T. Hemoglobin is utilized by *Candida albicans* in the hyphal form but not yeast form. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, London, v. 232, n. 2, p. 350-353, Mar. 1997.

TAPIA, C.; LEON, E.; PALAVECINO, E. Antifungal susceptibility of yeasts by Etest. Comparison of 3 media. **Revista médica de Chile**, Santiago, v. 131, n. 3, p. 299-302, Mar. 2003.

TAY, S.T.; ABIDIN, I.A.; HASSAN, H.; NG, K. Proteinase, phospholipase, biofilm forming abilities and antifungal susceptibilities of Malaysian *Candida* isolates from blood cultures. **Medical Mycology**, London, v.49, n. 5, p. 556-560, Jan. 2011.

TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F., **Microbiologia**, 5a ed., Ed. Atheneu, Sao Paulo, 760 p., 2008.

TORTORANO A. M.; PAMAN J.; BERNHARDT H.; KLINGSPOR L.; KIBBLER C. C.; FAURE O.; BIRAGHI E.; CANTON E.; ZIMMERMANN K.; SEATON S.; GRILLOT R.; ECMM. Epidemiology of *Candidaemia* in Europe: results of 28 month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Hospital based surveillance study. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Basel, v.23, n.4, p. 317-322, Apr., 2004.

VIANI, P. R. C. **Infecção hospitalar por *Candida* isoladas de pacientes internados, profissionais da saúde e ambiente hospitalar em hospital infantil do Estado de São Paulo e avaliada por marcadores fenotípicos.** 2007. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo/USP, São Paulo, 2007.

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*. **Revista Iberoamericana de Micología**, Bilbao, v. 16, n. 4, p. 208-10, Dec. 1999.

WERNER, H. Untersuchungen über die lipase-aktivitat bei hefen und hefeähnlichen Pilzen. **Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hygiene Ser A** v. 200, n. 1, p. 113-124, 1967.

WINGARD J. R. Importance of Candida species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 115-125, Jan. 1995.

YANG, Y. L. Virulence factors of Candida species. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, New York, v. 36, n. 4, p. 223-228, Dec. 2003

APÊNDICE A – FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS DO PRONTUÁRIO MÉDICO

Projeto Candidemia HU-UFMS

Cepa: _____ Espécie: _____ Setor de internação: _____

Data coleta (micro): ___/___/___ Data da hemocultura + : ___/___/___

RG –

--	--	--	--	--	--	--

 HU: _____

Nome: _____

Sexo: () Masc () Fem Idade(época da coleta): _____

Data nascimento: ___/___/___ Data Internação: ___/___/___

APGAR: ___/___ Idade gestacional: ___ semanas Peso: _____

Procedência: _____ Naturalidade: _____

Causa/diagnóstico na internação:

Doença/infecção atual:

Dias entre internação e hemocultura +: _____

Evolução: () alta: _____ dias de internação () óbito: _____ dias de internação

Dias entre hemocultura + e óbito: _____

Doença de base (que pode ter contribuído para ocorrer a candidemia):

- () HIV positivo () Câncer (tumor sólido) () Leucemia () Diabetes
 () Doença cardíaca: _____ () Doença Membrana Hialina
 () Doença pulmonar: _____ () Doença hepática: _____
 () Doença neurológica: _____ () Insuficiência renal: _____
 () Transplante: _____ () Doença auto-imune: _____
 () Outra: _____

Condições clínicas na ocasião do episódio da candidemia:

- () Febre ($\geq 37,8^{\circ}\text{C}$) () Dispnéia () Diarréia () Convulsão () Mialgia
 () Taquicardia () Pneumonia () Anasarca () Hipotensão (sistólica $\leq 90\text{mm}$)
 () Infecção urinária por *Candida* () Lesão de pele (envolvendo *Candida*)
 () Candidíase oral
 () Outro tipo de infecção por *Candida* (retinite, meningite, osteomielite):

Condições de risco anteriores a candidemia:

- () Uso de corticóide(dexametasona e outros) () Neutropenia (≤ 500 neutrófilos)
- ()Plaquetopenia () Leucocitose () Leucopenia ()Internado em UTI/CTI
- ()Diálise () Ventilação mecânica () Sonda vesical
- () Colonização prévia por levedura/*Candida* () Cateter venoso central
- () Nutrição Parenteral total ()Sonda nasogástrica/orogástrica ()Dreno
- () Cirurgia (até 30 dias antes da hemo +) ()Cirurgia abdominal ()Vancomicina
- ()Cateter umbilical () Carbapenêmicos (imipenem, meropenem)
- () Oclusão intestinal ()Quimioterapia () Prótese ()Traqueostomia
- () Cefalosporinas 3ª e 4ª geração (ceftriaxona, ceftazidima, cefepime)
- () Hospitalização prévia ()Imunossupressão ()Colostomia ()Anti-retrovirais
- ()Transfusão ()Bloqueadores H2(cimetidina, ranitidina) ()Omeprazol

Tratamento antifúngico: () SIM () NÃO, () Óbito antes ou no dia da hemocultura +
() Óbito até 3 dias da hemocultura

Tratamento sistêmico PRÉVIO (48 h antes) a candidemia: () SIM () NÃO

Antifúngico prévio	Início	Término	Dose (mg/dia)	Dias de tratamento

Uso de Micostatin e/ou Nistatina: () NÃO () SIM,
Início:_____Término:_____

Tratamento antifúngico APÓS a coleta:

Antifúngico	Início	Término	Dose (mg/dia)	Dias de tratamento

Antifúngico de primeira escolha: () Fluconazol () Anfotericina B () Intraconazol
() Outro:_____

Troca de antifúngico: () Fluco por AnB () AnB por Fluco () Outra:_____

Combinação de antifúngicos sistêmicos: () SIM _____ () NÃO

Dias entre hemocultura positiva e tratamento:_____

Antifungigrama:

Antifúngico	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Resultado
Anfotericina B		
Fluconazol		
Itraconazol		

Antibióticos utilizados antes da coleta da hemocultura: Número de antibióticos: _____

- 1) _____ Início: _____ Término: _____
- 2) _____ Início: _____ Término: _____
- 3) _____ Início: _____ Término: _____
- 4) _____ Início: _____ Término: _____
- 5) _____ Início: _____ Término: _____
- 6) _____ Início: _____ Término: _____
- 7) _____ Início: _____ Término: _____

Provável fonte de infecção (Candidemia):

() Cateter Venoso Central () Trato gastrointestinal () Outro: _____

Justificativa: _____

Hemograma (mais próximo do dia da coleta da hemocultura):

Hemácias: _____ Hemoglobina: _____ Hematócrito: _____ ()

Anemia

Leucócitos totais: _____ () Leucopenia () Leucocitose

Metamielócitos: _____ Bastonetes: _____ Segmentados: _____ % _____ totais

Eosinófilos: _____

Linfócitos: _____ Monócitos: _____ Plaquetas: _____

Obs: _____

