

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós Graduação em Ciências Pneumológicas

Antonella Souza Mattei

***Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: identificação, virulência, perfil de suscetibilidade antifúngica e epidemiologia dos casos clínicos de candidose sistêmica diagnosticados em um hospital de Porto Alegre - RS**

Porto Alegre, abril de 2013.

Antonella Souza Mattei

***Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: identificação, virulência, perfil de suscetibilidade antifúngica e epidemiologia dos casos clínicos de candidose sistêmica diagnosticados em um hospital de Porto Alegre - RS**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Pneumológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área do conhecimento: Ciências Pneumológicas).

Orientador: Prof^o. Dr. Luiz Carlos Severo

Co-orientador: Prof^o. Dr. Sydney Hartz Alves

Porto Alegre, abril de 2013.

CIP - Catalogação na Publicação

Souza Mattei, Antonella

Candida albicans versus Candida dubliniensis: identificação, virulência, perfil de suscetibilidade antifúngica e epidemiologia dos casos clínicos de candidose sistêmica diagnosticados em um hospital de Porto Alegre - RS / Antonella Souza Mattei. -- 2013. 123 f.

Orientador: Luiz Carlos Severo.

Coorientador: Sydney Hartz Alves.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. candidemia. 2. Candida albicans. 3. Candida dubliniensis. 4. suscetibilidade antifúngica. 5. testes fenotípicos. I. Severo, Luiz Carlos, orient. II. Hartz Alves, Sydney, coorient. III. Título.

Antonella Souza Mattei

***Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: identificação, virulência, perfil de suscetibilidade antifúngica e epidemiologia dos casos clínicos de candidose sistêmica diagnosticados em um hospital de Porto Alegre - RS**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Pneumológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área do conhecimento: Ciências Pneumológicas).

Porto Alegre, 12 de abril de 2013.

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese “***Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: identificação, virulência, perfil de suscetibilidade antifúngica e epidemiologia dos casos clínicos de candidose sistêmica diagnosticados em um hospital de Porto Alegre - RS**”, elaborada por Antonella Souza Mattei, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Pneumológicas.

Comissão Examinadora:

Prof. Dra. Melissa Orzechowski Xavier – FURG

Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Meireles – UFPel

Prof. Dr. Luciano Zubaran Goldani – UFRGS

Prof. Dr. Luiz Carlos Severo - UFRGS (Orientador)

“Dedico essa tese aos meus queridos e amados pais, José e Alice Mattei, que estiveram comigo em todos os momentos.”

Ao concluir esse trabalho, quero agradecer...

... aos meus pais Alice e José, por tantos anos de dedicação, amor, paciência, companheirismo, amizade e cuidados que os devo agradecer para sempre.

... às minhas irmãs, Caroline e Liara, que sempre estiveram ao meu lado, dando força.

... aos meus lindos cachorros Floppy e Bibica, que me deram muito carinho nas horas que não cabiam palavras.

... ao meu namorado, Bruno, que esteve ao meu lado durante o desenvolvimento dessa tese, me incentivando e dando apoio nas mais diferentes situações.

... ao meu orientador Prof. Luiz Carlos Severo pelo conhecimento, apoio e amizade dispensados a mim.

... ao meu co-orientador Prof. Sydney Hartz Alves pelo auxílio e a disponibilidade para o desenvolvimento dessa tese.

... aos meus companheiros do Laboratório de Micologia, Luciana, Cecília, Isabel, Aline, Jacque, Ilva e Flávio que tornaram meus dias mais felizes.

... à equipe do Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Santa Maria/RS pela realização da técnica de microdiluição, em especial a Débora Mario.

... às amigas Francine Dias, Juliana Plá, Rosema Santin e Isabel Madrid pela ajuda, amizade e carinho nas horas mais inoportunas que poderiam haver.

... à minha amiga, Profa. Melissa Xavier que me incentivou todos esses anos e me fez acreditar que era possível o desenvolvimento desse trabalho.

A todos o meu muito obrigada!

“Que a felicidade não dependa do tempo, nem da paisagem, nem da sorte e nem do dinheiro. Que ela possa vir com toda a simplicidade, de dentro para fora, de cada um para todos.”

Carlos Drummond de Andrade

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI.....	Caldo infusão cérebro-coração
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CBP.....	Ponto de corte clínico
CFM.....	Concentração fungicida mínima
CIM.....	Concentração inibitória mínima
CLSI.....	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DNA.....	Ácido desoxirribonucléico
ECV.....	Ponto de corte epidemiológico
FDA.....	<i>United States Food and Drug Administration</i>
HIV.....	Vírus da imunodeficiência adquirida
ISCMPA.....	Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre
KH ₂ PO ₄	Hidrogenofosfato de potássio
MALDI-TOF MS..	<i>Matrix-Assited Laser Desorption ionization-time of light mass spectrometry</i>
MC.....	Microdiluição em caldo
MH.....	Mueller-Hinton
NaCl.....	Cloreto de sódio
PCR.....	Reação em cadeia da Polimerase
Pz.....	Razão entre diâmetro da colônia/ diâmetro da colônia + zona de precipitação
Rpm.....	Rotação por minuto
RPMI.....	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
Sb.....	Sabouraud
TG.....	Tubo germinativo
TSI.....	<i>Tryptic soy broth</i>
UV.....	Ultra violeta
YEPD.....	<i>Yeast extract peptone dextrose</i>

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Presença de clamidosporos intercalares em isolado de <i>C. albicans</i> (A) e em formato de cacho em isolado de <i>C. dubliniensis</i> (B).....	21
FIGURA 2. Extensão não septada, sem (A) e com (B) constrição a partir dos blastoconídios.....	22
FIGURA 3. Caldo hipertônico (A) e ágar hipertônico (B).....	23
FIGURA 4. Colônias de <i>Candida albicans</i> (A) e <i>Candida dubliniensis</i> (B) em ágar Niger.....	24
FIGURA 5. Microscopia do cultivo de <i>Candida albicans</i> (A) e <i>Candida dubliniensis</i> (B) em caldo Niger.....	24
FIGURA 6. Microplacas com diluições de anfotericina B frente a um isolado de <i>Candida albicans</i> no teste de suscetibilidade realizado em duplicata. (+) controle de crescimento do isolado, (-) controle de esterilidade do meio de cultura.....	26
FIGURA 7. Presença da atividade da fosfolipase em isolado de <i>Candida albicans</i> (A) e ausência da atividade da fosfolipase em isolado de <i>C. glabrata</i> (B), teste realizado em duplicata.....	27
FIGURA 8. Presença da atividade da protease em um isolado de <i>Candida albicans</i> (A) e ausência dessa enzima em um isolado de <i>Candida glabrata</i> (B), teste realizado em duplicata.....	28

LISTA DE TABELAS

Artigo 4.1. Viabilidade de *Candida albicans* estocada em água destilada a - 20°C.

TABELA 1.	Relação do número de leveduras examinadas com o número de amostras viáveis, após o período de 6 meses a 8 anos.....	39
TABELA 2.	Métodos de preservação de fungos filamentosos e leveduriformes mais utilizados descritos na literatura.....	40

Artigo 4.2. Epidemiologia da candidemia no Rio Grande do Sul: suscetibilidade e fatores associados ao desenvolvimento dessa fungemia por *Candida albicans* durante 10 anos

TABELA 1.	Fatores associados aos 30 dias anteriores ao desfecho através da análise univariada em pacientes com candidemia por <i>Candida albicans</i>	46
TABELA 2.	Fatores associados aos 30 dias anteriores ao desfecho, através da análise multivariada em pacientes com candidemia por <i>Candida albicans</i>	47
TABELA 3.	Suscetibilidade antifúngica dos 112 isolados dos casos de candidemia por <i>C. albicans</i> durante o período de 10 anos (1999 a 2009).....	47

Artigo 4.3. Utilização do ágar e caldo Mueller-Hinton na identificação de *Candida albicans* através da emissão de tubo germinativo.

TABELA 1.	Comparação de quatro técnicas para a produção de tubo germinativo em isolados clínicos de <i>Candida</i> spp.....	60
------------------	---	----

Artigo 4.4. Virulence factors determination of bloodstream isolates of *Candida albicans*.

TABELA 1.	Distribucion of 153 bloodstream <i>C. albicans</i> isolates, according to phospholipase and proteinase production.....	69
------------------	--	----

Artigo 4.5. Diferenciação de *Candida albicans* de *Candida dubliniensis* através de testes fenotípicos: como utilizar e interpretar.

TABELA 1.	Testes fenotípicos utilizados na diferenciação de <i>Candida albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i> em 153 cepas provenientes de hemocultivos.....	75
------------------	---	----

Artigo 4.6. Sensibilidad de *Candida albicans* de hemocultivos frente a tres fármacos: estudio retrospectivo en Rio Grande do Sul, Brasil, 1999 a 2009.

TABELA 1.	Sensibilidad de <i>Candida albicans</i> de hemocultivos, frente la anfotericina B, anidulafungina y fluconazol, en el periodo de 1999 a 2009.....	92
TABELA 2.	Sensibilidad ($\mu\text{g/mL}$) <i>in vitro</i> de 153 aislamientos de <i>Candida albicans</i> frente la anfotericina B, anidulafungina y fluconazol.....	93
TABELA 3.	Comparación de los valores obtenidos de los fármacos de acuerdo con Pfaller et al. (A) y CLSI (B) clasificados con susceptibles, intermediario o susceptible dosis-dependiente y resistentes.....	94

RESUMO

Essa tese teve como objetivo avaliar todos os casos de candidose sistêmica por *Candida albicans* identificadas através de kit comercial ID 32C® (bioMérieux), diagnosticados no Laboratório de Micologia da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre/RS, durante o período de 1999 a 2009, buscando identificar a prevalência de *C. dubliniensis*, bem como avaliar os fatores de virulência e diferença de perfil de suscetibilidade antifúngica entre os isolados clínicos. Foi realizado um levantamento clínico-epidemiológico dos casos incluídos no estudo, avaliando sexo, idade, manifestações clínicas, evolução, região proveniente do paciente, doença de base, condições predisponentes, utilização de corticóides e antibióticos e resposta ao tratamento recebido. Para a diferenciação das duas espécies utilizou-se testes fenotípicos (arranjo dos clamidosporos, teste de termotolerância, formação do tubo germinativo, crescimento em meio hipertônico e niger), molecular (espectrometria de massa) e genotípico (reação em cadeia da polimerase - PCR). Em adição, foi avaliada a eficácia do método de conservação das leveduras estocadas a -20°C e comparamos quatro substratos (soro fresco, soro congelado, ágar e caldo Mueller-Hinton) para a prova do tubo germinativo. Determinou-se a produção da fosfolipase e proteinase em isolados incluídos no estudo. A atividade *in vitro* dos antifúngicos fluconazol, anfotericina B e anidulafungina frente aos isolados estudados foi determinada através da concentração inibitória mínima (CIM), a concentração fungicida mínima (CFM) e ponto de corte epidemiológico (ECV). Os casos de candidemia por *C. albicans* diagnosticados durante 10 anos ocorreram com maior frequência em pacientes adultos com presença de cateteres. Observamos que houve maior chance de ocorrência desta em pacientes oncológicos. O percentual de alta nos pacientes foi baixo. O método utilizado para a conservação de leveduras nesse estudo apresentou taxa de 70% de viabilidade. O ágar e o caldo Mueller-Hinton demonstraram sensibilidade de 90% e especificidade de 100%. Os isolados de *C. albicans* provenientes de hemocultivos apresentaram produção de fosfolipase em 78% e proteinase em 97% dos isolados. A espécie *C. dubliniensis* não foi identificada em isolados de hemocultivos, sendo todos os casos de candidemia por *C. albicans*. Os testes microcultivo em ágar fubá, espectrometria de massa, caldo niger e caldo hipertônico concordaram com o teste genotípico. Os isolados de *C. albicans* apresentaram maior suscetibilidade a anidulafungina, entretanto, os menores valores obtidos em 90% dos isolados (CIM₉₀) foi pela anfotericina B. E através do ECV, os isolados poderiam ser resistentes ao fluconazol, demonstrando a importância da associação desses dois parâmetros.

Palavras-chave: candidemia, *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, suscetibilidade, antifúngicos, epidemiologia, tubo germinativo, testes fenotípicos, fosfolipase e proteinase.

MATTEI, Antonella Souza. *Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: identificação, virulência, perfil de suscetibilidade antifúngica e epidemiologia dos casos clínicos de candidose sistêmica diagnosticados em um hospital de Porto Alegre – RS. 2013. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

ABSTRACT

The aim this thesis was to evaluate systemic candidiasis cases by *Candida albicans* through ID 32C[®] (bioMérieux), at Mycology Laboratory of the Santa Casa de Porto Alegre/RS, during 1999 to 2009, seeking to identify the *C. dubliniensis* prevalence, as well as evaluating the virulence factors and antifungal susceptibility profile difference of among isolates. The clinical and epidemiological survey was made through gender, age, clinical manifestations, evolution, patient's region, underlying disease, predisposing conditions, steroids and antibiotics use, and response to treatment. The phenotypic tests (thermotolerance, germ tube, hypertonic and Niger medium), molecular (mass spectrometry) and genotypic (polymerase chain reaction – PCR) was used for two species identification. We also assessed if the maintenance of *C. albicans* stored at - 20°C in a freezer with sterile distilled water was useful. The four substrate (fresh and frozen serum, agar and broth Mueller-Hinton[®]) were used for germ tube formation and the phospholipase and proteinase activity were evaluated. The *in vitro* activity of fluconazole, amphotericin B and anidulafungin were compared through the minimum inhibitory concentration (MIC), the minimum fungicidal concentration (MFC) and epidemiological cutoff value (ECV). The candidemia cases by *C. albicans* for ten years occurred more frequently in adult and catheters use. We observed the more chance this occurrence in cancer patients. The survival percentage was low. The used method in the study for yeast stored had 70% of viability. The agar and broth Mueller-Hinton were 90% sensitivity and 100% specificity. The bloodstream isolates of *C. albicans* produce virulence factors, such the germ tube production and hydrolytic enzymes (78% of phospholipase and 97% of protease) production. The *C. dubliniensis* was not identified in bloodstream isolates, thus all candidemia cases were by *C. albicans*. The mass spectrometry, cornmeal agar, Niger and hypertonic broth agreed with genotypic test. The isolates exhibited more susceptibility to anidulafungin, and 90% of them (MIC₉₀) exhibited the lowest values against amphotericin B. Based on ECV and Pfaller classification, isolates could be resistant to fluconazole, demonstrating the importance of the combination of these parameters.

Keywords: candidemia, *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, susceptibility, antifungal, epidemiology, germ tube, phenotypic test, phospholipase, proteinase

MATTEI, Antonella Souza. *Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: identificação, virulência, perfil de suscetibilidade antifúngica e epidemiologia dos casos clínicos de candidose sistêmica diagnosticados em um hospital de Porto Alegre – RS. 2013. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	6
LISTA DE ABREVIATURAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 DELINEAMENTO E PERÍODO DO ESTUDO.....	20
3.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	20
3.2.1 Critérios de exclusão	20
3.3 DIFERENCIAÇÃO DE <i>Candida albicans</i> DE <i>Candida dubliniensis</i>	20
3.3.1 Testes fenotípicos	21
3.3.1.1 Microcultivo em Ágar Fubá.....	21
3.3.1.2 Crescimento a 42° e 45°C.....	21
3.3.1.3 Formação do Tubo Germinativo.....	21
3.3.1.4 Repique em meio hipertônico líquido e sólido (NaCl 6,5%).....	22
3.3.1.5 Repique em meio Niger líquido e sólido (<i>Guizotia absyssaica</i>).....	23
3.3.1.6 Espectrometria de massa (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-time of light mass Spectrometry</i> , MALDI-TOF MS).....	24
3.3.2 Teste Genotípico	25
3.3.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	25
3.4 TESTE DE SUSCETIBILIDADE <i>in vitro</i>	25
3.4.1 Preparo dos inóculos	25
3.4.2 Diluições utilizadas	26

3.4.3 Leitura dos resultados	26
3.5 ATIVIDADE DA FOSFOLIPASE E PROTEINASE.....	27
3.5.1 Preparo dos inóculos	27
3.5.2 Determinação da atividade da fosfolipase	27
3.5.3 Determinação da atividade da proteinase	28
3.6 AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA.....	28
3.7 ASPECTOS ÉTICOS.....	29
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
4 RESULTADOS	32
4.1 VIABILIDADE DE <i>Candida albicans</i> ESTOCADA EM ÁGUA DESTILADA A - 20°C.....	32
4.2 EPIDEMIOLOGIA DA CANDIDEMIA NO RIO GRANDE DO SUL: SUSCETIBILIDADE E FATORES ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DESSA FUNGEMIA POR <i>Candida albicans</i> DURANTE 10 ANOS.....	41
4.3 UTILIZAÇÃO DO ÁGAR E CALDO MUELLER-HINTON NA PROVA DO TUBO GERMINATIVO.....	53
4.4 DETERMINATION OF GERM TUBE, PHOSPHOLIPASE AND PROTEINASE ACTIVITY FROM BLOODSTREAM ISOLATES OF <i>Candida</i> <i>albicans</i>	61
4.5 PESQUISA DE <i>Candida dubliniensis</i> EM ISOLADOS CLÍNICOS DE CANDIDEMIA PROVENIENTES DE UM HOSPITAL DE PORTO ALEGRE, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.....	70
4.6 SENSIBILIDAD DE <i>Candida albicans</i> DE HEMOCULTIVOS FRENTE A TRES FÁRMACOS: ESTUDIO RETROSPECTIVO EM RIO GRANDE DO SUL, BRASIL, 1999 A 2009.....	81
5 DISCUSSÃO	95
6 CONCLUSÕES	100
7 PERSPECTIVAS	101
REFERÊNCIAS	102
APÊNDICES	110
APÊNDICE A - Ficha para colheita de dados dos pacientes com candidose	111

sistêmica incluídos no estudo.....	
APÊNDICE B – Publicação não relacionada com o tema da tese.....	112
ANEXOS.....	120
ANEXO A - Carta de aceite do artigo “Viabilidade de <i>Candida albicans</i> estocada em água destilada a - 20°C” na Revista Brasileira de Análises Clínicas.....	121
ANEXO B - Aceite do artigo “Sensibilidad de <i>Candida albicans</i> de hemocultivos frente a tres fármacos: estudio retrospectivo en Rio Grande do Sul, Brasil, 1999 a 2009” na Revista Iberoamericana de Micologia.....	122

1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas têm crescido significativamente em importância na prática clínica nas últimas três décadas, em especial em decorrência do aumento do número de indivíduos imunossuprimidos, criticamente enfermos ou submetidos a procedimentos médicos invasivos. Entre as micoses sistêmicas de importância médica, predominam aquelas causadas por leveduras do gênero *Candida* e por fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* (KONTOYIANNIS; BODEY, 2002). De fato, em muitos países, como por exemplo, nos Estados Unidos, ocorreu um aumento de 207% dos casos de micoses entre 1979 a 2000, sendo estes relacionados principalmente aos gêneros *Candida*, *Aspergillus* e *Cryptococcus* (PFALLER; DIEKEMA, 2007).

A candidose é considerada a mais frequente das micoses invasivas, representando 80% das infecções fúngicas hospitalares. *Candida* spp. é considerada atualmente o quarto agente de infecções na corrente sanguínea (representando de 8 a 10% dos casos), devido a um aumento de 500% em sua incidência a partir da década de 80. Numerosos estudos nos últimos 10 anos têm documentado as características de candidemia no Brasil (GOLDANI; MARIO, 2003; ANTUNES *et al.*, 2004; AQUINO *et al.* 2005; BARBERINO *et al.*, 2006; COLOMBO *et al.*, 2006; MEDRANO *et al.*, 2006; COLOMBO *et al.*, 2007; PASQUALOTTO *et al.*, 2007; PASSOS *et al.*, 2007; BERGAMASCO *et al.*, 2012).

A infecção por *Candida* sp. pode ser facilitada por vários processos patológicos, fisiológicos ou traumáticos, sendo os mais comuns a imunossupressão por várias causas, como neutropenia, desnutrição e quimioterapia antineoplásica (MALUCHE *et al.*, 2008).

A única espécie identificada na rotina de diagnóstico micológico era *C. albicans*, no entanto, espécie não-*albicans* começaram a aumentar de incidência e assim, a identificação de todos os isolados em nível de espécie passou a ser fundamental (TORTORANO *et al.*, 2004; ALMIRANTE *et al.*, 2005; COLOMBO *et al.*, 2006). Essa identificação é realizada a partir de provas bioquímicas, e a diferenciação de *C. albicans* de outras espécies do gênero era facilmente realizada através da observação de tubo germinativo positivo e de clamidósporos intercalares e terminais em meio fubá acrescido de Tween 80. A partir do ano 1995, pela introdução de métodos de biologia molecular, novas espécies de *Candida* foram identificadas, dentre elas a *C. dubliniensis*. Esta espécie é filogeneticamente muito semelhante à *C. albicans*, sendo difícil sua diferenciação através de análises morfológicas e bioquímicas (SULLIVAN *et al.*, 1995). Testes fenotípicos foram desenvolvidos especialmente para este

propósito, os quais utilizam meios modificados e crescimento dos isolados em altas temperaturas (NONOKA *et al.*, 2008). Porém estes não são tão específicos e sensíveis quanto à atividade da beta-glucosidase e a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Em 2009, foi sugerido um teste de tolerância ao meio hipertônico, o qual poderia ser alternativo na diferenciação presuntiva destas espécies na rotina laboratorial (AKGUL; CERIKCIOGLU, 2009). Entretanto, estudos descrevem que há necessidade de realizar pelo menos três testes fenotípicos para o diagnóstico acurado de *C. dubliniensis* (MÄHNB *et al.*, 2005).

A identificação presuntiva do gênero *Candida* pode ser realizada através de meios cromogênicos como, CHROMagar[®] que permite a identificação de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, com base nas características de coloração que as colônias desenvolvem neste meio, além do meio Albicans ID[®], Chromalbicans Ágar[®] e Bactiad *Candida*[®]. Para identificação taxonômica das espécies, os isolados devem ser submetidos a provas bioquímicas de assimilação e fermentação de açúcares, como Vitek[®], ID 32C[®], Api 20C AUX9[®], Auxacolor Yeast Star[®], RapID Yeast Plus System[®] e Api *Candida*[®]. Métodos moleculares utilizam a identificação das sequências específicas de aminoácidos para cada espécie, através de fragmentos de DNA fúngico que são amplificados e testados com oligonucleotídeos específicos (MALUCHE *et al.*, 2008).

Apesar da maioria dos isolados de *C. dubliniensis* estarem associados com infecções orofaríngeas em indivíduos HIV-positivos, o isolamento destas leveduras a partir de diferentes espécimes clínicos tem sugerido um potencial patogênico significativo para esta espécie, mesmo em pacientes HIV-negativos (NONAKA *et al.*, 2008). Em um estudo prospectivo realizado em diferentes hospitais do Kuwait foi observado a prevalência dessa espécie em 67% das amostras respiratórias, 12% em cavidade oral, 9% na urina, 4% em hemocultivos, 3% em amostras da mucosa vaginal e 6% de outros sítios anatômicos (Khan *et al.*, 2012).

Esta diferenciação tornou-se ainda de maior importância quando foi descrito a resistência de algumas cepas de *C. dubliniensis* ao fluconazol, diferenciando o tratamento de pacientes com candidose por este agente (NONAKA *et al.*, 2008; AKGUL; CERIKCIOGLU, 2009). Além disso, a incidência de infecções provocadas por *Candida* não-*albicans* é crescente e em alguns casos está associada a altas taxas de mortalidade, aumento do tempo de internação e custos hospitalares (MIMICA *et al.*, 2009).

Para colonizar, causar infecção e driblar os mecanismos de defesa do hospedeiro, *Candida albicans* possui fatores de virulência, como formação de pseudo e hifas, diversidade fenotípica, fatores de adesão celular e produção de exoenzimas hidrolíticas; como fosfolipases

e proteinases (MOHAN; BALLAL, 2008; SCHEID *et al.*, 2010).

A observação da formação do tubo germinativo ocorre *in vitro*, durante a transição da forma de levedura para micelial em condições adversas ao ambiente, como: mudança de pH, condições nutricionais e temperatura (KIM *et al.*, 2002). Essas características pertenciam apenas às espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis*, entretanto, em 2008 foi identificada outra espécie que também a possui, *C. africana* (ROMEIO; CRISEO, 2008).

A exoenzima fosfolipase desempenha um papel importante na patogenia desta levedura, favorecendo a invasão tecidual do hospedeiro durante a candidose, através da desestabilização da membrana, promovendo a lise celular (SCHEID *et al.*, 2010). A proteinase tem o papel de degradar as substâncias presentes na pele e mucosa (colágeno, queratina e mucina), bem como os componentes imunes (citocinas, anticorpos e complemento) para ocorrer a penetração tecidual (OMBRELLA *et al.*, 2008). As enzimas hidrolíticas são constantemente estudadas em isolados leveduriformes provenientes da mucosa e da pele, entretanto, os provenientes do sangue ainda são escassos. Mohan & Ballal (2008) descreveram que isolados de *Candida spp.* provenientes de hemocultivos apresentaram alta produção de proteinases e fosfolipases.

Em vista dessa realidade, muitos isolados clínicos de *C. dubliniensis* acabam sendo erroneamente identificados como *C. albicans*. Com isso, dados epidemiológicos quanto a real incidência desta espécie como patogênica, ainda são escassos na literatura. Assim, este estudo objetivou investigar casos de candidose sistêmica por *C. albicans* diagnosticados na Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, com a finalidade de identificar a prevalência de *C. dubliniensis* nesta casuística. Em adição, também foi avaliada a epidemiologia da candidose por *C. dubliniensis* e seu perfil de suscetibilidade *in vitro* ao antifúngico de eleição para tratamento da candidose bem como à novos fármacos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar todos os casos de candidose sistêmica por *C. albicans* identificadas através de kit comercial ID 32C® (bioMérieux – Marcy-l’Etoile, França), diagnosticados no Laboratório de Micologia da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, durante o período de 1999 a 2009, buscando identificar a prevalência de *C. dubliniensis*, bem como avaliar fatores de virulência e comparar o perfil de suscetibilidade antifúngica entre os isolados clínicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Comparar distintos testes, fenotípicos (arranjo dos clamidiosporos, teste de termotolerância, formação do tubo germinativo, crescimento em meio hipertônico e niger), molecular (espectrometria de massa) e genotípico (reação em cadeia da polimerase - PCR) para diferenciação das duas espécies;

2.2.2 Realizar levantamento clínico-epidemiológico dos casos incluídos no estudo;

2.2.3 Avaliar o método de conservação de *Candida albicans* estocadas em água destilada estéril a - 20°C;

2.2.4 Comparar quatro substratos utilizados na prova do tubo germinativo;

2.2.5 Identificar a produção da fosfolipase e proteinase em isolados de *C. albicans*;

2.2.6 Comparar a atividade *in vitro* dos antifúngicos fluconazol, anfotericina B e anidulafungina frente aos isolados de *C. albicans* provenientes de hemocultivos, determinar a concentração inibitória mínima (CIM), a concentração fungicida mínima (CFM) e ponto de corte epidemiológico (ECV).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO E PERÍODO DO ESTUDO

O projeto foi desenvolvido de forma retrospectiva e prospectiva, a partir de cepas isoladas de pacientes com candidose sistêmica, estocadas na micoteca do Laboratório de Micologia da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre/RS.

3.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Foram estudados todos os casos clínicos de pacientes com candidose sistêmica causada por isolados identificados como *Candida albicans*, sendo avaliadas 240 amostras estocadas durante o período de 1999 a 2009, na micoteca do laboratório.

3.2.1 Critério de exclusão

Foram excluídos do estudo os casos clínicos de isolados leveduriformes que não apresentaram crescimento significativo após duplo repique em caldo infusão cérebro-coração (BHI), demonstrando a inviabilidade da cepa.

3.3 DIFERENCIAÇÃO DE *C. albicans* DE *C. dubliniensis*

A diferenciação destas espécies foi realizada através de testes fenotípicos e genotípico, descritos a seguir.

3.3.1 Testes fenotípicos

3.3.1.1 Microcultivo em ágar Fubá

Para a observação do arranjo dos clamidosporos de cada isolado, estes foram repicados em ágar Sabouraud (Sb) e incubados a 35°C por 24h. Após foram subcultivados em placas contendo ágar Fubá (farinha de milho e Tween 80) e cobertos por lamínula estéril, incubados a 35°C por no mínimo cinco dias, sendo observados através de microscópio óptico em objetivas de 10 e 40x. Os clamidosporos terminais e intercalares foram caracterizados como a espécie *C. albicans* (Figura 1A) e em formato de cacho, *C. dubliniensis* (Figura 1B).

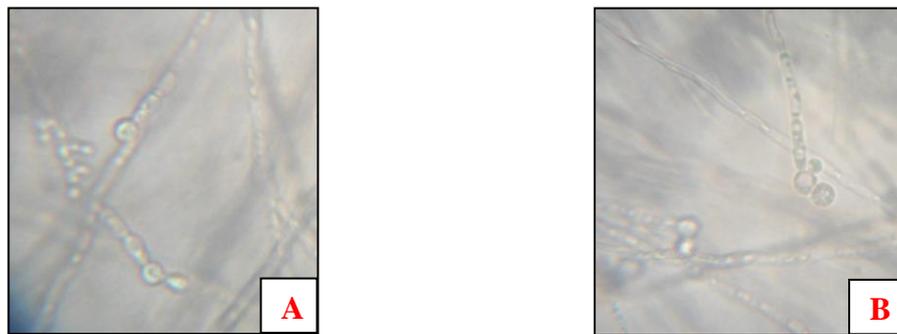


Figura 1. Presença de clamidosporos intercalares em isolado de *C. albicans* (A) e em formato de cacho em isolado de *C. dubliniensis* (B).

3.3.1.2 Crescimento a 42°C e 45°C

Para a avaliação da termotolerância, as cepas foram subcultivadas em Sb e incubadas a 42°C e 45°C por no mínimo cinco dias, determinando a capacidade de crescimento nestas duas temperaturas.

3.3.1.3 Formação do tubo germinativo

Para a prova do tubo germinativo (TG), colônias jovens cultivadas por 48h a 36°C em ágar Sb foram subcultivas em quatro diferentes meios como, soro congelado, soro fresco,

meio líquido e sólido Mueller-Hinton (MH). Uma alçada de colônia de cada amostra foi inoculada em tubos com 0,5 mL de soro humano previamente congelado, fresco e meio líquido MH. E para o meio sólido, realizou-se um inóculo de cada cepa na escala 0,5 McFarland ajustado em densitômetro (bioMérieux® – Marcy-I’Etoile, França). Foram semeados 10µL do inóculo em placas que com ágar MH e cobertos por lamínulas estéreis. Tanto tubos quanto placas foram incubados a 37°C por 2h.

A leitura imediata do teste em tubos foi realizada através de uma alçada do conteúdo líquido entre lâmina e lamínula. Assim, os tubos e as placas foram observados em microscópio óptico em objetivas de 10 e 40X. Os TGs apareceram como uma extensão não septada e sem constrição dos blastoconídios (Figura 2).

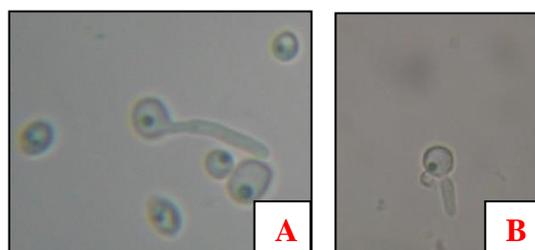


Figura 2. Extensão não septada, sem (A) e com (B) constrição a partir dos blastoconídios.

3.3.1.4 Repique em meio hipertônico líquido e sólido (NaCl 6,5%)

O meio sólido hipertônico (20g de glicose, 10g de peptona, 20g de ágar-ágar, 65g de cloreto de sódio (NaCl) em 1000 mL de água destilada) foi preparado de acordo com Chowdhary *et al.* (2011), sendo esterilizado em autoclave e distribuído em tubos. Enquanto que, o meio líquido (30g de caldo Sb, 65g de NaCl em 1000mL de água destilada) foi preparado de acordo com Alves *et al.* (2002). Para o inóculo de cada cepa, utilizou-se colônias jovens e ajustado em densitômetro (bioMérieux®, Marcy l'Etoile, França) na escala 0,5 McFarland e diluído em 1:100. Após 10µL do inóculo foram semeados no ágar e caldo hipertônico, incubados a 28°C por até sete dias.

O crescimento no ágar foi avaliado como bom (+++), moderado (++) , pouco (+) e sem (-) (Figura 3A). No caldo, observou-se a presença de turvação, correspondendo que houve crescimento (Figura 3B). Assim, *C. dubliniensis* não cresce nesses meios de cultura.

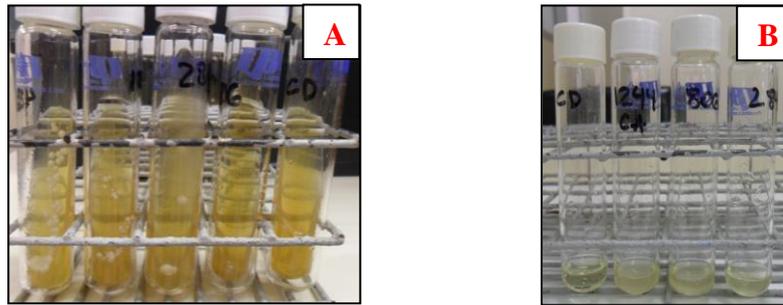


Figura 3. Caldo hipertônico (A) e ágar hipertônico (B)

3.3.1.5 Repique em meio Niger líquido e sólido (semente de *Guizotia abyssinica*)

O meio sólido niger (150g de semente niger, 1g de glicose, 1g de hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4), 1g de creatinina e 20g de ágar bacteriológico em 1000 mL de água destilada) foi preparado de acordo com Staib & Morschäuser (1999), sendo esterilizado em autoclave e distribuído em placas de Petri. O meio líquido foi preparado de acordo com Staib & Morschäuser (2005), porém sem a adição do ágar bacteriológico e distribuído em tubos com rosca.

Os isolados foram subcultivados em meio sólido e incubados a 30°C por 48h. As colônias de *C. albicans* se caracterizavam por coloração branca a creme com bordo liso, sem hifas ou clamidosporos. Enquanto que, as colônias de *C. dubliniensis* apresentavam bordos rugosos com franjas e presença de hifas e clamidosporos abundantes (Figura 4A e B). Para o meio líquido, os isolados foram subcultivados em tubos, incubados a 30°C em estufa shaker a 2500 rpm/20h. Após, uma gota do líquido foi observada entre lâmina e lamínula no microscópico óptico em objetiva de 40x. A presença de blastoconídios únicos e em pouca quantidade caracterizaram os isolados de *C. albicans*, enquanto que, *C. dubliniensis* foi caracterizada pela presença de blastoconídios em formato de cachos (Figura 5A e B).

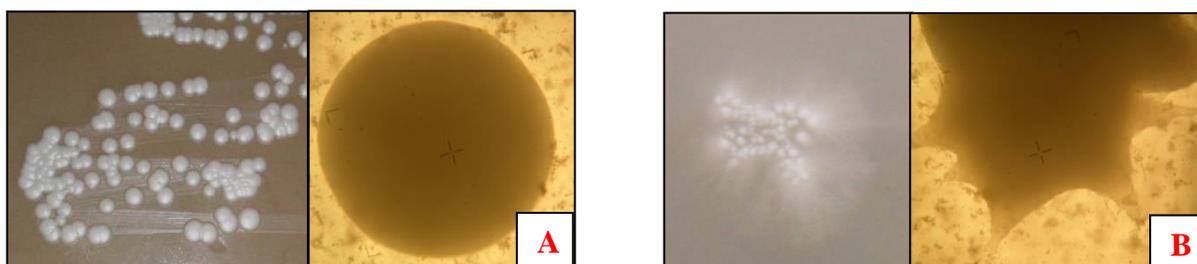


Figura 4. Colônias de *Candida albicans* (A) e *Candida dubliniensis* (B) em ágar Niger

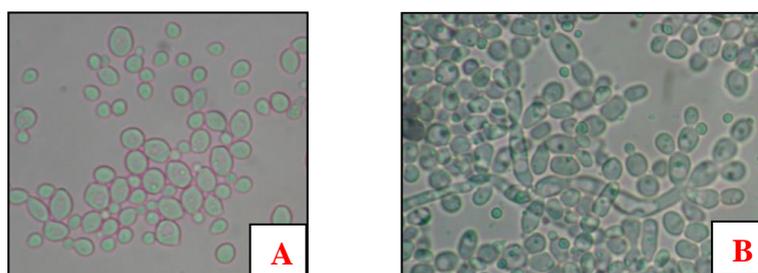


Figura 5. Microscopia do cultivo de *Candida albicans* (A) e *Candida dubliniensis* (B) em caldo Niger

3.3.1.6 Espectrometria de massa (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-time of flight mass spectrometry*, MALDI-TOF MS)

O MALDI-TOF MS realiza análise das proteínas constituintes das cepas intactas, no qual o espectro de massa dessas proteínas é gerado e interpretado como um fingerprint celular em um banco de dados, identificando o gênero e espécie das cepas testadas.

A técnica utilizada foi descrita por Putignani *et al.* (2011) através de 50 µg da colônia foram colocados sobre a placa de cultura do MALDI-TOF e recobertos por uma matriz orgânica em solução aquosa e acidificada. Após a evaporação da fase líquida, o material cristalizado foi submetido a um sistema de vácuo e irradiados por um laser pulsado de nitrogênio. A nuvem de íons gerada durante a ionização foi acelerada para dentro do tubo “TOF”, onde esses foram separados individualmente. O cálculo do espectro de cada cepa foi obtido de acordo com a razão massa/carga (m/z), numa escala de 2 a 20 kDa. Esses dados foram analisados pelo banco de dados, identificando a cepa testada.

3.3.2 Testes genotípicos

3.3.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As cepas caracterizadas presuntivamente pelos testes fenotípicos citados anteriormente como *C. dubliniensis*, foram submetidas a caracterização genotípica, através da extração do DNA total e amplificação com o par de *primer* NL1 (5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG3') e NL2 (5'GGTCCGTGTTTCAAGGCGG3') (O'DONNELL, 1993). Os produtos de amplificação foram verificados em gel de agarose a 1% corados com brometo de etídeo sob luz ultra violeta (UV) e fotodocumentados. Após, as amostras foram purificadas em coluna do *Kit Pure Link PCR Purification* (Invitrogen®) e enviadas ao sequenciamento. Foi utilizado um sequenciador automático MegaBACE500 com o uso do *kit DYEnamic ET* (Amersham) e os mesmos *primers* usados nas reações de PCR. Os cromatogramas obtidos foram visualizados e montados com o uso do programa Gap4 do pacote Staden (STADEN, 1996), e comparados no GenBank.

3.4 TESTE DE SUSCETIBILIDADE *IN VITRO*

O teste de suscetibilidade *in vitro* para as cepas de *C. albicans* e *C. dubliniensis* foi realizado através da técnica de Microdiluição em Caldo (MC), preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), de acordo com o documento de referência M27-A3, para três antifúngicos: fluconazol, anfotericina B e anidulafungina.

3.4.1 Preparo dos inóculos

Os inóculos foram preparados a partir de colônias jovens, com crescimento de 24h em ágar Sb a 36°C, em 5mL de solução salina estéril. Esta suspensão do inóculo foi ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland que corresponde a um inóculo inicial de aproximadamente $1-5 \times 10^6$ CFU mL⁻¹. Após, foi preparado uma diluição de 1:50 transferindo-se 100µl desta suspensão para 4,9mL de solução salina estéril e, a diluição de 1:20 com a transferência de 250µl da suspensão anterior em 4,75mL de meio RPMI-1640 e tampão. Esta

última diluição do inóculo foi dispensada em alíquotas de 100µl nos poços, contendo previamente 100µl dos produtos a testados e suas diluições.

3.4.2 Diluições utilizadas

A partir das soluções-estoque dos fármacos foram preparadas diluições para o fluconazol de 0,125 a 128 µg/mL, anfotericina B de 0,003 a 1 µg/mL e anidulafungina de 0,0015 a 1 µg/mL em meio RPMI-1640 e tampão. Alíquotas de 100µl dessas concentrações foram dispensadas sequencialmente nas microplacas, preenchendo os poços pertencentes às colunas numeradas, sendo o teste realizado em duplicata.

3.4.3 Leitura dos resultados

Para leitura do teste foi comparado visualmente (turbacão) o crescimento da levedura nos poços referentes às diferentes concentrações testadas dos produtos com o seu crescimento no poço-controle positivo. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pela menor concentração capaz de produzir a diminuição da turbidez em relação ao controle positivo dos fármacos, fluconazol e anidulafungina $\geq 50\%$ e anfotericina B $\geq 90\%$ (Figura 6). A concentração fungicida mínima (CFM), realizada para testes com anfotericina e anidulafungina, pois o fluconazol é classificado como fungistático, sendo determinada pelo subcultivo de 10µL de cada poço da microplaca, que apresentou ausência de turbidez, em placas contendo ágar Sb e, a seguir, incubadas a 35°C por 48h.



Figura 6. Microplacas com diluições de anfotericina B frente a um isolado de *Candida albicans* no teste de suscetibilidade realizado em duplicata. (+) controle de crescimento do isolado, (-) controle de esterilidade do meio de cultura.

3.5 ATIVIDADE DA FOSFOLIPASE E PROTEINASE

3.5.1 Preparo do inóculo

Para a determinação da atividade da fosfolipase e proteinase, utilizou-se inóculo de colônias jovens, ajustado em densitômetro na escala 0,5 McFarland (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França) e semeado 10uL nas placas contendo os meios determinados.

3.5.2 Determinação da atividade da fosfolipase

O ágar gema de ovo (22,5g ágar malte; 29,2g NaCl; 0,28g de cloreto de cálcio (CaCl_2) em 490mL de água destilada e esterilizado em autoclave) foi utilizado para determinar a atividade da fosfolipase, sendo preparado de acordo com Mohan & Ballal (2008). Quando a temperatura do meio atingiu 50°C, misturou-se 10mL de solução de gema de ovo estéril (50% gema de ovo e 50% água destilada estéril). As placas foram semeadas com cada isolado, em duplicata, e incubadas a 37°C por seis dias. A atividade da fosfolipase foi interpretada como positiva quando houve uma zona de precipitação ao redor da colônia (Figura 7).

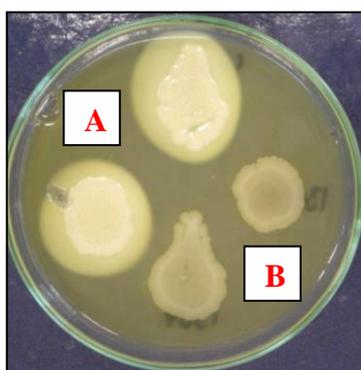


Figura 7. Presença da atividade da fosfolipase em isolado de *Candida albicans* (A) e ausência da atividade da fosfolipase em isolado de *C. glabrata* (B), teste realizado em duplicata.

3.5.3 Determinação da atividade da proteinase

O ágar utilizado para identificação da atividade da proteinase (11,7g base de carbono para levedura; 0,1g extrato de levedura; 2g albumina sérica bovina em 200 mL de água destilada e esterilizada através de filtração) foi preparado de acordo com Mohan & Ballal (2008). Após foi adicionado 16g ágar bacteriológico e 800 mL de água destilada estéril. Os isolados foram semeados, em duplicata, em placas contendo o ágar e incubados a 37°C por 6 dias. A atividade enzimática foi mensurada através do diâmetro da área lítica produzida ao redor da colônia, utilizando a solução corante (amido Schwarz 1,25% em ácido acético) e descorante (ácido acético e álcool etílico) (Figura 8).

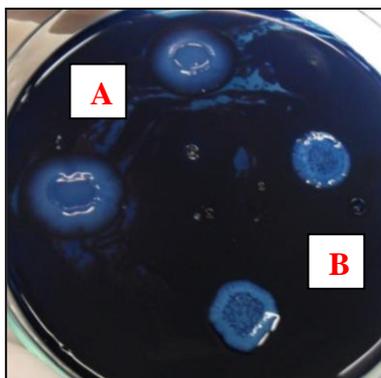


Figura 8. Presença da atividade da protease em um isolado de *Candida albicans* (A) e ausência dessa enzima em um isolado de *Candida glabrata* (B), teste realizado em duplicata.

3.6 AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

Foram revisados os prontuários de todos os pacientes incluídos no estudo, com o preenchimento de uma ficha padrão (apêndice A) para cada caso, contendo:

- Dados demográficos (idade, sexo e procedência);
- Doença de base;
- Evolução;

- Condições predisponentes (distúrbios gastrointestinais, distúrbios hematológicos, internação em UTI, transfusão, quimioterapia, câncer);
- Procedimentos invasivos realizados (cirurgias, nutrição parenteral, ventilação mecânica, hemodiálise, presença de sonda, cateter e dreno);
- Duração da internação;
- Uso de profilaxia antifúngica;
- Tratamento antifúngico;
- Manifestações clínicas;
- Utilização de antibioticoterapia e corticoterapia;
- Utilização de quimioterápicos.

3.7 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi exclusivamente epidemiológico, não envolvendo a realização de qualquer intervenção terapêutica. Todas as informações clínico-epidemiológicas necessárias para o estudo foram obtidas através de revisão de prontuários, não havendo qualquer contato direto entre investigadores com os pacientes.

A pesquisa teve interesse puramente científico. As informações referentes aos pacientes foram mantidas em completo sigilo e os autores firmaram o compromisso com a confidencialidade garantindo o sigilo quanto à identificação dos pacientes incluídos no estudo.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre/RS, sob parecer nº 183/10. Certificamos ainda, que o estudo observou todos os padrões éticos estabelecidos pela Instituição.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados epidemiológicos foram analisados no software Stata versão 11.0 (Stata Corp., College Station, Estados Unidos), sendo utilizada a proporção para caracterização da população de estudo. A associação entre as variáveis de exposição e o óbito foi avaliada por meio da regressão semiparamétrica de Cox e interpretada pela razão de risco (hazard ratio – HR), com intervalo de 95% de confiança (IC 95%). Para isto, interpretou-se o comportamento

da variável em resposta ao fim da exposição no tempo, sendo que, para cada paciente caracterizou a situação da sobrevivência, denominada de falha, interpretada pelo tempo decorrido entre o diagnóstico de candidemia até a ocorrência do evento de interesse. Também, a situação de censura foi definida quando o evento de interesse não havia ocorrido até o final da observação, ou pela perda do paciente durante o acompanhamento. Para aplicação da regressão de Cox, foi atendida a suposição de riscos proporcionais através de método gráfico descritivo e valor de $p < 0,05$ para rejeição da hipótese de que os riscos são proporcionais (Altman, 1991). As variáveis cujas associações mostraram o valor de $p < 0,20$ e atenderam também ao critério da proporcionalidade do risco foram selecionadas para integrarem o modelo de regressão multivariado.

A viabilidade dos isolados pertencentes à micoteca foi analisada através da frequência de crescimento de acordo com o ano correspondente.

As técnicas de emissão de TG e os testes fenotípicos foram analisados de acordo com sensibilidade e especificidade de cada um.

A atividade das exoenzimas (Pz) foram medidas através da razão do diâmetro da colônia pela soma do diâmetro da colônia e a zona de precipitação. O valor obtido foi categorizado como Pz = 1 (sem produção); 0,35–0,5 (alta produção); 0,51–0,74 (produção moderada); and 0,75–0,9 (baixa produção). Cada isolado foi testado em duplicada e o valor Pz foi calculado através da média.

Os valores obtidos no teste de suscetibilidade antifúngica foram através da média geométrica das CIM e CFM (50 e 90%). Estabeleceu-se os pontos de corte clínico (CBP) de acordo com CLSI (2008a, b) para o fluconazol (concentrações $\leq 8\mu\text{g/mL}$ foram consideradas como sensíveis; de 16 a $32\mu\text{g/mL}$, sensíveis dose-dependente e $\geq 64\mu\text{g/mL}$, resistentes), anidulafungina ($\leq 2\mu\text{g/mL}$ sensíveis e $> 2\mu\text{g/mL}$, não sensíveis) e anfotericina B ($\leq 1\mu\text{g/mL}$ sensíveis e $\geq 2\mu\text{g/mL}$, resistentes). Também utilizou-se o CBP de acordo com Pfaller *et al.* (2010; 2011; 2012), no qual descreveram que anfotericina B com concentrações < 1 e $\geq 1\mu\text{g/mL}$ foram consideradas como sensíveis e resistente, respectivamente. Em relação ao fluconazol, concentrações $\leq 2\mu\text{g/mL}$ foram consideradas sensíveis; $4\mu\text{g/mL}$ sensíveis dose-dependente e $\geq 8\mu\text{g/mL}$, resistentes. Anidulafungina com concentrações $\leq 2\mu\text{g/mL}$ foram consideradas sensíveis; $4\mu\text{g/mL}$ intermediária e $\geq 8\mu\text{g/mL}$, resistentes.

Além disso, os pontos de corte epidemiológicos (ECV) para os fármacos utilizados foram calculados de acordo com Turnidge *et al.* (2006), que considera a distribuição das CIM obtidas, a moda de cada um dos fármacos e a variabilidade da prova. Em geral, o ECV está aproximadamente duas diluições próximas a moda e compreende 95% dos valores da

distribuição das CIM obtidas. O ECV é uma medida sensível para detectar isolados emergentes com sensibilidade reduzida aos fármacos mencionados.

4 RESULTADOS

Artigo 4.1

VIABILIDADE DE *Candida albicans* ESTOCADA EM ÁGUA DESTILADA A
- 20°C.

MATTEI, A.S.; ALVES, S.H.; SEVERO, C.B.; GUAZZELLI, L.S; MATTOS, F;
SEVERO, L.C.

Aceito para publicação na Revista Brasileira de Análises Clínicas (RBAC)

RESUMO

Esse trabalho teve como objetivo avaliar o método de conservação de leveduras do gênero *Candida* estocadas em água destilada estéril a - 20°C. Utilizou-se 240 cepas de *Candida albicans* estocadas em água destilada estéril a - 20°C, durante o período de seis meses a 8 anos. Essas foram repicadas em duplicata em ágar de Sabouraud e incubadas a 35°C por 96h. Houve recuperação de 68,4% das 240 leveduras repicadas, sendo que a maior porcentagem de viabilidade foi referente ao período de seis meses e a menor foi de três anos. O método utilizado para o armazenamento das leveduras possui vantagens quando comparado a outros, além de ocupar pouco espaço, é facilmente realizado e possui baixo custo, porém deve ser adicionado um crioprotetor.

PALAVRA-CHAVES: leveduras, manutenção, congelamento, micoteca

SUMMARY

This study aimed to evaluate the maintenance of *Candida* genus stored at - 20°C in sterile distilled water. We used 240 strains of *Candida albicans* stored at - 20°C in sterile distilled water from six months to eight years. The strains subcultured on Sabouraud agar and incubated at 35°C for 96 h in two sets. It was recovered 68.4% of 240 yeast, the six months period was the highest percentage of viability and the three years was lowest. The used method in the study for yeast storage has advantages when compared to others, little space takes up, easiness and low cost, but must be added a cryoprotectant.

KEYWORDS: yeast, maintenance, freezing method, mycology collection

INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas têm crescido significativamente em importância na prática médica nas últimas três décadas. Isso se deve ao aumento do número de indivíduos imunocomprometidos, que se apresentam criticamente enfermos ou submetidos a procedimentos invasivos⁽¹⁾.

O gênero *Candida* é considerado o agente de infecção fúngica sistêmica mais importante, representando cerca de 8 a 10% de todos os casos. A principal causa desses percentuais é o aumento de 500% em sua incidência no ambiente hospitalar, em várias partes do mundo, a partir da década de 80. Nos últimos 10 anos, numerosos estudos têm também documentado o aumento de sua incidência no Brasil^(2,3,4,5).

Nesse contexto, a manutenção de coleção de cultura em laboratórios de micologia é de suma importância para estudos retrospectivos e prospectivos, além de aplicações tecnológicas, com intuito de pesquisar a morfologia, fisiologia, etiologia, genética e epidemiologia desses microrganismos. Porém, para análise fenotípica e genotípica torna-se necessária a escolha de métodos de preservação que garantam a pureza e viabilidade dos isolados, por longos períodos^(6,7,8). Esta escolha baseia-se no comportamento idiossincrático das espécies fúngicas frente a cada método de conservação⁽⁸⁾.

A conservação de fungos em meios de cultura requer que certos critérios técnicos sejam levados em consideração, pois os nutrientes podem ser consumidos totalmente, esgotando esses meios e acarretando a diminuição da viabilidade dos organismos estocados. Perdas de patogenicidade e virulência podem ser decorrentes de subcultivos sucessivos constantes ou esporádicos para meios frescos, necessários para que as culturas se mantenham viáveis. A contaminação por ácaros e fungos ambientais também pode ocorrer em coleções de cultura mantidas em tubos de ensaio com meios sólidos^(6,9). Na rotina dos laboratórios de análises clínicas, os métodos mais comumente empregados são subcultivos sucessivos em ágar, óleo mineral estéril e água destilada estéril, todos contendo meios sólidos como matriz. A liofilização e criopreservação em nitrogênio líquido têm sido também empregados, apresentando, de modo geral, melhores rendimentos. Frequentemente, no entanto, estas técnicas não estão acessíveis à maioria dos laboratórios. Como não há uma técnica universal para todos os tipos de fungos, vários estudos têm sido realizados com o intuito de se buscar a melhor forma de

preservação desses microrganismos, por isso, diferentes técnicas têm sido desenvolvidas e diferentes resultados têm sido obtidos^(6,7,8,9,10,11,12,13).

O presente trabalho objetivou avaliar o método de conservação de leveduras do gênero *Candida* estocadas em água destilada estéril a -20°C, tendo em vista ser um método de fácil execução e baixo custo e adequado a maioria dos laboratórios clínicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho utilizou-se 240 amostras clínicas de origem humana de *Candida albicans*, provenientes de diversos sítios anatômicos, pertencentes à coleção de cultura do Laboratório de Micologia do Hospital Santa Rita da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre/RS.

As leveduras foram identificadas através do sistema comercial ID 32C da Biomerieux[®]. Para o armazenamento das cepas de *C. albicans*, um fragmento de cada cultura foi inoculada em 5 mL de água destilada estéril, em tubos tipo *Eppendorf*, e estocadas a -20°C em freezer.

Foram utilizadas leveduras preservadas no período de 6 meses a 8 anos, no qual foram subcultivadas, em duplicata, para ágar de Sabouraud e incubadas a 35°C por 96 horas, com observação diária do crescimento.

RESULTADOS

Houve recuperação de 68,4% das 240 leveduras subcultivadas, sendo que a maior percentagem de viabilidade foi encontrada no período de 6 meses de preservação. Neste, todas as amostras estudadas foram recuperadas. Entretanto, a menor taxa de recuperação [41,7%] foi observada no período de 3 anos. Na tabela 1, são mostrados os resultados alcançados.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

As leveduras são facilmente isoladas de diferentes materiais biológicos em meios de cultura em laboratório. No entanto, a manutenção de culturas viáveis tem apresentado problemas metodológicos⁽⁶⁾. Alguns métodos resultam em baixos níveis de

sobrevivência e instabilidade das propriedades morfológicas e bioquímicas das cepas preservadas⁽⁷⁾, impossibilitando os estudos retrospectivos⁽⁸⁾.

Bueno e Gallardo⁽¹⁰⁾, Rodrigues *et al.*⁽¹²⁾ descreveram a recuperação de 100% dos fungos filamentos e leveduriformes armazenados em água destilada, em temperatura ambiente, por 5 anos. Todavia, quando comparado ao nosso estudo, a taxa de viabilidade foi menor (58,4%), podendo ser explicado pela diferença de temperatura durante a estocagem.

Em outros estudos, a recuperação de cepas de *C. albicans* e *Cryptococcus neoformans* variou de 90% a 100%, sendo, contudo, utilizado o método de preservação em caldo infusão cérebro-coração (BHI) e glicerol a -20°C^(7,11). As percentagens obtidas no presente trabalho foram de 42 a 82% de viabilidade, discordando, provavelmente, devido à falta de um crioprotetor.

A sobrevivência de fungos depende da temperatura e período de armazenamento, sendo que o estoque a -20°C em freezer proporciona viabilidades positivas por 4 a 5 anos, em decorrência da redução do metabolismo celular até o nível de dormência artificial⁽⁷⁾. Porém, a formação de cristais de gelo pode alterar essa viabilidade^(11,13). Isso poderia explicar a baixa taxa geral de recuperação das leveduras nesse estudo. Uma alternativa a esse problema poderia ser a adição de glicerol, cuja eficiência como protetor celular foi demonstrada por Silva *et al.*⁽⁷⁾, com a recuperação de 90% das leveduras estocadas, durante 3 e 4 anos.

A comparação dos resultados obtidos neste estudo [tabela 1] com aqueles apresentados na tabela 2, permite constatar que os dados aqui demonstrados são compatíveis com os resultados encontrados por outros autores^(6,7,8,9,10,11,12). Diferenças no tempo de preservação e o tipo de cepa estocada podem explicar as variações observadas na taxa de viabilidade dos organismos.

Métodos sofisticados de preservação, como liofilização e nitrogênio líquido, têm, claramente, maior capacidade de manter estáveis as características morfofisiológicas dos fungos. Diversos estudos têm mostrado que a liofilização e a criopreservação em nitrogênio líquido permitem recuperar, depois de longos períodos de estocagem, um elevado número de cepas com morfologia e patogenicidade inalteradas. No entanto, o alto custo de execução dessas técnicas é um fator limitante, principalmente, para os pequenos laboratórios de análises clínicas^(6,8,11).

A maior taxa de recuperação de cepas ocorreu no período de preservação compreendido entre 6 meses a 1 ano [tabela 1], o que demonstra a adequação do método

para estocagens em curtos períodos de tempo. No entanto, foi aceitável as taxas de recuperação acima de 6 anos de preservação [71,5%-80,0%]. Além disso, a manutenção em água destilada otimiza espaços nas coleções de cultura de fungos, é menos laboriosa e requer pequeno investimento⁽⁹⁾. Outras vantagens do método incluem certa proteção das culturas preservadas frente à contaminação por fungos, bactérias e ácaros do ambiente, bem como evita a dessecação e o esgotamento dos meios de cultura que podem levar a importantes perdas na viabilidade.

AGRADECIMENTO

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos de doutorado.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram que não há conflitos de interesses.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microb Rev.* 2007; 20(1):133–163.
- 2.Antunes AG, Pasqualotto AC, Diaz MC, D'Azevedo PA, Severo LC. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2004; 46:239-241.
- 3.Barberino MG, Silva N, Reboucas C, Barreiro K, Alcantara AP, Netto EM, Albuquerque L, Brites C. Evaluation of blood stream infections by *Candida* in three tertiary hospitals in Salvador, Brazil: a case-control study. *Braz J Infect Dis.* 2006; 10:36-40.
- 4.Colombo AL, Guimarães T, Silva LR, Monfardini LP, Cunha AK, Rady P, Alves T, Rosas RC. Prospective observational study of candidemia in Sao Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. *Infect Control and Hosp Epidemiol.* 2007; 28:570-576.

5. Pasqualotto AC, Moraes AB, Zanini RR, Severo LC. Analysis of independent risk factors for death among pediatric patients with candidemia and a central venous catheter in place. *Infect Control and Hosp Epidemiol*. 2007; 28:799-804.
6. Cavalcanti SDB. Aplicação de metodologias de preservação e caracterização de fungos na coleção de culturas do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. São Paulo. Dissertação [Mestrado em Ciências] - Faculdade de Medicina da USP; 2010.
7. Silva JO, Costa PP, Chinarelli SH. Manutenção de leveduras por congelamento a – 20°C. *RBAC*. 2008; 40(1): 73-74.
8. Girão MD, Prado MR, Brilhante RS, Cordeiro RA, Monteiro AJ, Sidrim JJ, Rocha M. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004; 37(3):229-233.
9. Diogo HC, Sarpieri A, Pires MC. Preservação de fungos em água destilada. *An Bras Dermatol*. 2005; 80(6):591-594.
10. Bueno L, Gallardo R. Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. *Rev Iberoam Micol*. 1998; 15:166-168.
11. Nery AS, Melhem MSC, Gomes AML. Manutenção da levedura *Cryptococcus* sp por congelamento. *Laes & Haes*. 2001; 129:194-198.
12. Rodrigues E, Lírio V, Lacaz C. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1992; 34(2):159-165.
13. Spanamberg A, Sanches EMC, Hummel J, Valente P. Efeito do congelamento sobre a viabilidade de células leveduriformes. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2008; 36: 43-45.

Tabela 1: Relação do número de leveduras examinadas com o número de amostras viáveis, após o período de 6 meses a 8 anos.

TEMPO DE ESTOCAGEM	AMOSTRAS ANALISADAS	AMOSTRAS VIÁVEIS
8 anos	7	5 (71,5%)
7 anos	5	4 (80%)
6 anos	5	4 (80%)
5 anos	36	21 (58,4%)
4 anos	52	43 (82,7%)
3 anos	60	25 (41,7%)
2 anos	30	19 (63,4%)
1 ano	29	27 (93,1%)
6 meses	16	16 (100%)
TOTAL	240	164 (68,4%)

Tabela 2. Métodos de preservação de fungos filamentosos e leveduriformes mais utilizados descritos na literatura

Método de preservação	Microrganismo estudado (n)	Tempo de conservação	Viabilidade (%)	Referência
Caldo BHI adicionado de glicerol a -80°C	<i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Trichosporon</i> (35)	6 meses	100%	Cavalcanti <i>et al</i> ⁽⁶⁾
Caldo BHI adicionado de glicerol a -20°C	<i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Trichosporon</i> , <i>Rhodotorula</i> (328)	3 a 4 anos	99 a 90%	Silva <i>et al</i> ⁽⁷⁾
Salina a 25°C	<i>Malassezia pachydermatis</i> (48)	6 meses	39,6%	Girão <i>et al</i> ⁽⁸⁾
Água destilada estéril a 25°C	Diferentes gêneros de fungos filamentosos (43)	12 meses	100%	Diogo <i>et al</i> ⁽⁹⁾
Água destilada a 4°C	Diferentes gêneros de fungos filamentosos (26)	2 anos	100%	Bueno e Gallardo ⁽¹⁰⁾
Caldo BHI adicionado de glicerol a -20°C	<i>Cryptococcus neoformans</i> (30)	4 meses	100%	Nery <i>et al</i> ⁽¹¹⁾
Água destilada estéril a 25°C	Diferentes gêneros de leveduras (34)	6, 12, 18, 24 meses	100 a 60%	Rodrigues <i>et al</i> ⁽¹²⁾

BHI: Infusão Cérebro-Coração

Artigo 4.2

EPIDEMIOLOGIA DA CANDIDEMIA NO RIO GRANDE DO SUL:
SUSCETIBILIDADE E FATORES ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO
DESSA FUNGEMIA POR *Candida albicans* DURANTE 10 ANOS

Mattei, A.S.; Alves, S.H.; Watte, G.; Severo, C.B.; Guazzelli, L.S.; Oliveira, F.M.;
Severo, L.C.

Artigo será encaminhado para Journal of Clinical Microbiology

RESUMO

O objetivo desse estudo retrospectivo no Rio Grande do Sul, Brasil, foi descrever os casos de candidemia por *Candida albicans* diagnosticados em um hospital de Porto Alegre/RS, no período de 1999 a 2009, determinando os fatores de riscos e o perfil de suscetibilidade antifúngica desses isolados. Foram revisados, de forma retrospectiva, os casos de candidemia por *C. albicans* diagnosticados no durante 10 anos. As variáveis estudadas foram: idade, gênero, situação geográfica, fatores predisponentes, doença de base, tratamento antifúngico profilático, manifestações clínicas, procedimentos invasivos realizados, períodoo de hospitalização, tratamento realizado e desfecho. E ainda foram submetidos ao teste de suscetibilidade antifúngica frente ao fluconazol, anfotericina B e anidulafungina; de acordo com *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) M27-A3. Os dados foram analisados no software Stata versão 11.0 através de regressão de Cox. Foram revisados 112 prontuários, os quais estavam disponíveis. A mediana de idade foi 54 anos. A doença de base foi câncer e, os procedimentos invasivos realizados foram utilização de sondas, cateteres e dreno. O tempo médio de internação foi de 38 dias. O antifúngico mais utilizado foi fluconazol. O óbito ocorreu em 62% dos pacientes. Na análise univariada dos fatores associados a candidemia nos 30 dias anteriores ao óbito foram idade, câncer e os 10º dias de internação. Enquanto que, na análise multivariada, o fator associado foi câncer. Em relação ao teste de suscetibilidade, todos os isolados foram sensíveis a anidulafungina e anfotericina B, enquanto que, um isolado foi resistente ao fluconazol. Os casos de candidemia por *C. albicans* diagnosticados durante 10 anos ocorreram com maior frequência em pacientes com presença de cateteres. Observamos que houve maior chance de ocorrência desta micose em pacientes oncológicos. O percentual de alta dos pacientes foi baixo. E a maioria dos isolados foi sensível aos três fármacos utilizados.

PALAVRAS-CHAVES: candidemia, *Candida albicans*, mortalidade, antifúngicos, epidemiologia

INTRODUÇÃO

As leveduras do gênero *Candida* são importantes patógenos adquiridos em hospitais, especialmente em pacientes criticamente enfermos, internados em unidades de tratamento intensivo (UTI) e submetidos por longos períodos a regime de imunossupressão e antibioticoterapia (PASQUALOTTO *et al.*, 2005; COLOMBO *et al.*, 2006).

A candidose é considerada a mais frequente das micoses invasivas, representando 80% das infecções fúngicas hospitalares. Nos Estados Unidos (EUA) representa a 4ª causa de infecções sanguínea, correspondendo 8 a 10% dos casos, devido ao aumento de 500% em sua incidência, a partir da década de 80 (PFALLER; DIEKEMA, 2007; DIEKEMA *et al.*, 2012).

A candidemia é um importante problema em hospitais terciários, sendo que em 2006 foi documentada, em hospitais de São Paulo, a incidência de candidemia de 2,49 casos por 1000 admissões (COLOMBO *et al.*, 2006).

O desenvolvimento desta fungemia em pacientes hospitalizados pode aumentar a média de internação hospitalar em 10 dias e elevar a mortalidade em 14,5 a 49% (GIRI; KINDO, 2012; DELUCA *et al.*, 2012). Assim, sua incidência e epidemiologia variam de acordo com a situação geográfica do paciente (BERGAMASCO *et al.*, 2012).

A terapia antifúngica utilizada durante a década de 90 era a classe dos azoles e, além disso, a maioria das espécies relacionadas a candidemia eram *C. albicans*. Em 2005, surgiram as equinocandinas, consideradas a primeira linha de tratamento para candidose invasiva em diversos pacientes, principalmente aqueles expostos aos azoles recentemente (PFALLER *et al.*, 2011; DIEKEMA *et al.*, 2012).

Pela existência de diferenças na epidemiologia dessa micose, o monitoramento das tendências sobre a verdadeira incidência, sua distribuição e perfil de suscetibilidade a antifúngicos tornou-se necessário (COLOMBO *et al.*, 2006; YAMAMOTO *et al.*, 2012; PFALLER *et al.*, 2012; BERGAMASCO *et al.*, 2012).

O objetivo desse estudo retrospectivo no Rio Grande do Sul, Brasil, foi descrever os casos de candidemia por *Candida albicans* diagnosticados no período de 1999 a 2009, determinando os fatores de riscos e o perfil de suscetibilidade antifúngica desses isolados.

PACIENTES E MÉTODOS

1. População de estudo

Foram revisados, de forma retrospectiva, os casos de candidemia diagnosticados no Laboratório de Micologia da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, RS, Brasil, durante o período de 1999 a 2009.

Os casos de candidemia incluídos no estudo foram aqueles que pelo menos uma hemocultura foi positiva para *Candida albicans*. Os isolados foram identificados através do método automatizado ID 32C (bioMérieux[®], Marcy l'Etoile, França).

As variáveis estudadas foram: idade, gênero, situação geográfica, fatores predisponentes (distúrbios gastrointestinais, distúrbios hematológicos, internação em UTI, transfusão e quimioterapia), doença de base (cardiopatias, respiratória, gastrointestinal, urinária, endocrinopatia, câncer e vírus da imunodeficiência humana - HIV), tratamento antifúngico profilático, manifestações clínicas, procedimentos invasivos realizados (cirurgias, nutrição parenteral, ventilação mecânica, hemodiálise, presença de sonda, cateter e dreno), período de hospitalização, tratamento realizado (antifúngico, uso de antibióticos e corticóides) e desfecho.

2. Antifungigrama

Os isolados de *Candida albicans* foram submetidos ao teste de suscetibilidade antifúngica frente ao fluconazol, anfotericina B e anidulafungina; de acordo com *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) M27-A3, descritos no artigo de Mattei *et al.* (2013).

Os isolados foram classificados como sensíveis (S), quando a concentração inibitória mínima (CIM) foi $\leq 8 \mu\text{g/mL}$ para o fluconazol, $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ anfotericina B e $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ para anidulafungina. E suscetível dose-dependente (SDD) com CIM 16-32 $\mu\text{g/mL}$ para o fluconazol e resistente (R) quando CIM $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ para fluconazol, $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ para anfotericina B e $> 2 \mu\text{g/mL}$ anidulafungina.

3. Análise Estatística

Os dados foram analisados no software Stata versão 11.0 (Stata Corp., College Station, Estados Unidos), sendo utilizada a proporção para caracterização da população de estudo. A associação entre as variáveis de exposição e o óbito foi avaliada por meio da regressão semiparamétrica de Cox e interpretada pela razão de risco (hazard ratio –

HR), com intervalo de 95% de confiança (IC 95%). Para isto, interpretou-se o comportamento da variável em resposta ao fim da exposição no tempo, sendo que, para cada paciente caracterizou a situação da sobrevivência, denominada de falha, interpretada pelo tempo decorrido entre o diagnóstico de candidemia até a ocorrência do evento de interesse. E também se definiu a situação de censura, quando o evento de interesse não havia ocorrido até o final da observação, ou pela perda do paciente durante o acompanhamento. Para aplicação da regressão de Cox, foi atendida a suposição de riscos proporcionais através de método gráfico descritivo e valor de $p < 0,05$ para rejeição da hipótese de que os riscos são proporcionais (ALTMAN, 1991). As variáveis cujas associações mostraram o valor de $p < 0,20$ e atenderam também ao critério da proporcionalidade do risco foram selecionadas para integrarem o modelo de regressão multivariado.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, sob o parecer nº 183/10.

RESULTADOS

Foram diagnosticados 938 casos de candidose durante o período de 10 anos. Destes 758 casos eram provenientes de hemoculturas, sendo que, 285 foram identificados como isolados de *C. albicans*. Entretanto, estavam disponíveis somente 112 prontuários, os quais foram possíveis revisar.

Os pacientes tinham idade de 1 dia a 87 anos, com mediana de 54 anos de idade. A prevalência foi no grupo de adultos com 84%. Em relação ao gênero e a situação geográfica, 54% (n=61) dos pacientes pertenciam ao sexo feminino e eram da cidade de Porto Alegre/RS.

Os fatores predisponentes com maior frequência foram a quimioterapia/radioterapia, seguidos de distúrbios gastrointestinais. A doença de base foi câncer e, os procedimentos invasivos realizados foram utilização de sondas, cateteres e dreno (41%), seguidos de cirurgias (38%).

As manifestações clínicas foram febre (48%), vômitos (10%), dispneia (24%), dor (33%) e tosse (12,5%). O tempo de internação variou de 3 a 180 dias, com mediana de 38 dias.

Apenas 6% dos pacientes receberam tratamento antifúngico profilático. O tratamento antifúngico utilizado na maioria dos casos foi fluconazol, sendo que, em

casos de persistência do quadro clínico era utilizado em associação ou troca por anfotericina B. O óbito ocorreu em 62% dos pacientes.

Na análise univariada dos fatores associados a candidemia nos 30 dias anteriores ao óbito foram idade, câncer e os 10º dias de internação; estão descritos na tabela 1. Enquanto que, na análise multivariada, o fator associado foi câncer (Tabela 2).

Tabela 1. Fatores associados aos 30 dias anteriores ao desfecho através da análise univariada em pacientes com candidemia por *Candida albicans*.

Variável	Alta (n=43)	Óbito (n=69)	Valor p
Idade em anos (mediana)	42 (0 - 83)	54 (0 - 87)	0,04
Gênero M:F	48:52	48:52	1,00
Câncer, n (%)	10 (24)	32 (46)	0,05
Cirurgias, n (%)	14 (33)	23 (33)	0,53
Utilização de cateteres, sondas e drenos, n (%)	15 (35)	29 (42)	0,98
Ventilação mecânica, n (%)	3 (7)	5 (7)	0,82
Uso de antibióticos, n (%)	17 (40)	31 (45)	0,77
Quimioterapia, n (%)	5 (12)	10 (15)	0,95
10 primeiros dias de internação, n (%)	12 (28)	42 (61)	0,01
Tratamento, n (%)			0,99
Fluconazol	13 (30)	24 (35)	
Anfotericina B	3 (7)	5 (7)	
Associação*	6 (14)	12 (17)	
Sem tratamento	11 (26)	23 (33)	

M:F – masculino:feminino

*Associação: fluconazol e anfotericina B

Tabela 2. Fatores associados aos 30 dias anteriores ao desfecho, através da análise multivariada em pacientes com candidemia por *Candida albicans*.

Variável	HR	(IC 95%)	Valor de p
Idade (mediana)	1,44	(0,86 – 2,39)	0,16
Câncer	2,41	(1,42 – 4,09)	0,001
Ventilação mecânica	0,36	(0,13 – 1,02)	0,06

HR - razão de risco, IC – intervalo de confiança

Em relação ao teste de suscetibilidade, todos os isolados foram sensíveis a anidulafungina e anfotericina B, enquanto que, um isolado foi resistente ao fluconazol. Além disso, quatro isolados foram classificados como sensíveis dose-dependente ao fluconazol (Tabela 3).

Os pacientes correspondentes aos isolados que foram classificados como SDD e R ao fluconazol evoluíram para morte, sendo que destes, três pacientes iniciaram o tratamento com fluconazol e após, houve mudança do antifúngico, utilizando anfotericina B.

Tabela 3. Suscetibilidade antifúngica dos 112 isolados dos casos de candidemia por *C. albicans* durante o período de 10 anos (1999 a 2009).

Fármacos	Sensível n (%)	SDD n (%)	Resistente n (%)
Fluconazol	107 (96)	4 (2,6)	1 (1,4)
Anfotericina B	112 (100)	-	0 (0)
Anidulafungina	112 (100)	-	0 (0)

SDD: Sensível dose-dependente

DISCUSSÃO

Nos últimos 10 anos, vários estudos têm descrito a epidemiologia da candidemia, demonstrando a importância desta fungemia em pacientes criticamente enfermos (VIUDES *et al.*, 2002; PASQUALOTTO *et al.*, 2005; COLOMBO *et al.*, 2006; BERGAMASCO *et al.*, 2012; YAMAMOTO *et al.*, 2012; DIEKEMA *et al.*, 2012).

Outras espécies não albicans estão sendo diagnosticadas como agentes causadores da candidemia, porém a *C. albicans* continua sendo a espécie de maior prevalência, justificando a necessidade de estudos mais aprofundados sobre essa levedura. Assim, em nosso estudo, 38% dos casos revisados de candidemia foram identificados como *Candida albicans*, concordando com Colombo *et al.* (2006) que realizou estudo no Brasil e Diekema *et al.* (2012), nos Estados Unidos da América (EUA).

Os fatores associados que contribuem para o desenvolvimento da candidemia são bem conhecidos (PASQUALOTTO *et al.*, 2005; COLOMBO *et al.*, 2006; YAMAMOTO *et al.*, 2012; PFALLER *et al.*, 2012), de modo que, os resultados observados nesse estudo retrospectivo do sul do Brasil concordam com os dados já descritos.

De acordo com o fator idade, comparado-o com outro estudo realizado no Brasil, (COLOMBO *et al.*, 2006) a mediana de idade dos nossos pacientes foi maior e com prevalência no grupo de adultos. Enquanto que, a variável gênero, houve predominância do feminino, contrariando outros estudos que descreveram que a maioria era do sexo masculino (PASQUALOTTO *et al.*, 2005; COLOMBO *et al.*, 2006; PFALLER *et al.*, 2012).

Os fatores predisponentes com maior frequência foram a quimioterapia/radioterapia, seguidos de distúrbios gastrointestinais, o que discorda de Pasqualotto *et al.* (2005), no qual relataram a maior frequência através da transfusão sanguínea.

Como foi descrito em outros dois estudos realizados em hospitais no Brasil, a doença de base com maior frequência diagnosticada foi câncer (PASQUALOTTO *et al.*, 2005; COLOMBO *et al.*, 2006). Constatamos que, a possibilidade de ocorrência de candidemia em pacientes oncológicos foi 2,4 vezes maior (Tabela 2). Além disso, de 20 a 55% dos casos de candidemia estão relacionados ao câncer (TORTORANO *et al.*, 2004; ALMIRANTE *et al.*, 2005) e com predominância da espécie *C. albicans* (BERGAMASCO *et al.*, 2012). Entretanto, Diekema *et al.* (2012) descreveu que nos EUA, poucos casos de candidemia ocorreram em pacientes oncológicos.

Os fatores de prognóstico em pacientes oncológicos com candidemia têm sido descritos em diversos estudos, que incluem neutropenia, gravidade da doença, disseminação, presença de comorbidades como, falha renal, idade avançada, permanência em UTI, utilização de ventilação mecânica e corticóide (BERGAMASCO *et al.*, 2012).

A utilização de cateteres, um procedimento invasivo, que possibilitaria a colonização e desenvolvimento da candidemia já foi descrita por outros autores (PASQUALOTTO *et al.*, 2005; DIEKEMA *et al.*, 2012; PFALLER *et al.*, 2012). Em Barcelona, um estudo descreveu que 89% dos pacientes com candidemia continham cateter venoso central, demonstrando a possibilidade da colonização e o desenvolvimento da fungemia (LÓPEZ-MEDRANO *et al.*, 2012)

A manifestação clínica mais frequente observada nos pacientes foi febre, demonstrando que havia um processo inflamatório, porém este não é um sinal específico da candidemia (COLOMBO *et al.*, 2006).

O tempo médio de internação foi 18 dias maiores do que descrito por Colombo *et al.* (2006), aumentando os gastos com hospitalização e favorecendo o desenvolvimento de enfermidades.

A exposição prévia ao fluconazol pode resultar em falha terapêutica, com o surgimento de espécies não sensíveis a este, sendo um fator forte e independente associado à candidemia (COLOMBO *et al.*, 2006). Entretanto, poucos pacientes receberam tratamento antifúngico profilático e quando submetidos ao teste de suscetibilidade, a maioria foi sensível ao fluconazol.

O tratamento antifúngico utilizado na maioria dos casos foi fluconazol, discordando de outros estudos, no qual o tratamento inicial descrito foi anfotericina B (PASQUALOTTO *et al.*, 2005; COLOMBO *et al.*, 2006). Pfaller *et al.* (2012) relatou sucesso na utilização da terapia combinada ou em sequência de fluconazol e equinocandina, enquanto que, em nosso estudo foi utilizado fluconazol e anfotericina B.

A taxa de alta em nossos pacientes foi baixa, sendo que essa observação já havia sido descrita em outros estudos no Brasil (PASQUALOTTO *et al.*, 2005; COLOMBO *et al.*, 2006). Entretanto, Pfaller *et al.* (2012) descreveu um percentual de 62% de alta. Para diminuir a taxa de mortalidade nesses pacientes deve-se prevenir o surgimento da candidemia em pacientes criticamente enfermos e aumentar as opções de tratamento.

Com a utilização de testes de suscetibilidade antifúngica *in vitro* podemos detectar isolados de *Candida* spp. potencialmente resistentes, auxiliando no tratamento eficaz e rápido da candidose (PFALLER *et al.*, 2011). A resistência antifúngica foi observada em apenas um isolado ao fluconazol. A sensibilidade de isolados de *C. albicans* provenientes do sangue frente a este fármaco já foi descrita por Antunes *et al.* (2004).

Pfaller *et al.* (2008) testou 41 isolados resistentes ao fluconazol frente a anidulafungina e observou que todos foram sensíveis. A resistência cruzada entre os

dois fármacos ainda não foi relatada, porém ainda não foi confirmada que essa resistência não exista (PFALLER *et al.*, 2011).

O presente estudo apresenta algumas limitações. Como foi realizado de forma retrospectiva, perdemos algumas informações que poderiam interferir nas variáveis estudadas. Além disso, foi realizado em um único hospital, mesmo sendo de referência e receber pacientes de todo estado do Rio Grande do Sul. E ainda, reforçamos a necessidade de uma vigilância epidemiológica contínua para acompanharmos as possíveis mudanças dessa micose.

CONCLUSÃO

Os casos de candidemia por *Candida albicans* diagnosticados durante 10 anos ocorreram com maior frequência em mulheres adultas, com presença de cateteres e câncer. Observamos que houve maior chance de ocorrência desta em pacientes oncológicos. O percentual de alta dos pacientes foi baixo. E a maioria dos isolados testados foram sensíveis aos três fármacos utilizados.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado do primeiro autor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almirante B, Rodriguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, Mensa J, Sanchez F, Ayats J, Gimenez M, Saballs P, Fridkin SK, Morgan J, Rodriguez-Tudela JL, Warnock DW, Pahissa A; Barcelona Candidemia Project Study Group. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol.* 43:1829–35, 2005.

Altman DG. Practical statistics for medical research. London: Chapman & Hall, 611 pp, 1991.

Antunes A, Pasqualotto A, Diaz M, Azevedo P, Severo LC. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 46(5): 239-241, 2004.

Bergamasco M, Garnica M, Colombo A, Nucci M. Epidemiology of candidemia in patients with hematologic malignancies and solid tumours in Brazil. *Mycoses.* 2012. doi: 10.1111/myc.12013.

Colombo A, Nucci M, Park B, Nouer S, Arthington-Skaggs S, Matta D, Warnock D, Morgan J, Brazilian Network Candidemia Study. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. *Journal of Clinical Microbiology.* 44(8): 2816–2823, 2006.

De Luca C, Guglielminetti M, Ferrario A, Calabro M, Casari E. Candidemia: species involved, virulence factors and antimycotic susceptibility. *New Microbiologica.* 35: 459-468, 2012.

Diekema D, Arbefeville S, Boyken L, Kroeger J, Pfaller M. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 73: 45–48, 2012.

Giri S, Kindo AJ. A review of *Candida* species causing blood stream infection. *Indian J Med Microbiol.* 30(3): 270-8, 2012.

López-Medrano F, Fernández-Ruiza M, Origüena J, Belarte-Tornero L, Carazo-Medina R, Panizo-Mota F, Chaves F, Sanz-Sanz F, Juana F, Aguado J. Clinical significance of *Candida* colonization of intravascular catheters in the absence of documented candidemia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 73: 157–161, 2012

Mattei A, Alves S, Mario D, Severo C, Guazzelli L, Oliveira M, Severo L. Sensibilidad de *Candida albicans* de hemocultivos frente a tres fármacos: estudio retrospectivo en Rio Grande do Sul, Brasil, 1999 a 2009. *Revista Iberoamericana de Micología,* 2013

Pasqualotto A, Nedel W, Machado T, Severo L. A comparative study of risk factors and outcome among outpatient-acquired and nosocomial candidaemia. *Journal of Hospital Infection.* 60: 129–134, 2005.

Pfaller M, Boyken L, Hollis L, Kroeger J, Messer S, Tendolkar S, Diekema D. Use of epidemiological cutoff values to examine 9-year trends in susceptibility of *Candida* species to anidulafungin, caspofungin and micafungin. *J. Clin. Microbiol.* 49 (2):624-629, 2011.

Pfaller M, Diekema D, Ostrosky-Zeichner L, Rex J, Alexander B, Andes D, Brown S, Chaturvedi V, Ghannoum M, Knapp C, Sheehan D, Walsh T. Correlation of MIC with Outcome for *Candida* Species Tested against Caspofungin, Anidulafungin, and Micafungin: Analysis and Proposal for Interpretive MIC Breakpoints. *J. Clin. Microbiol.* 46(8):2620-2629, 2008.

Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews.* 20: 133-163, 2007.

Pfaller P, Neofytos D, Diekema D, Azie N, Meier-Kriesche H, Quan S, Horn D. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004–2008. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 74: 323–331, 2012.

Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Kibbler CC, Faure O, Biraghi E, Canton E, Zimmermann K, Seaton S, Grillot R; ECMM Working Group on Candidaemia. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 23: 317–22, 2004.

Viudes, A; Peman, E; Canton, P; Ubeda, J; Lopez-Ribot, L; Gobernado, M. Candidemia at a tertiary-care hospital: epidemiology, treatment, clinical outcome and risk factors for death. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21:767–774, 2002.

Yamamoto, A; Paula, C; Dias, L; Tadano, T; Martins, E; Amadio, J; Hahn, R. Epidemiological and clinical characteristics of nosocomial candidiasis in university hospitals in Cuiabá – Mato Grosso, Brazil. *Rev Iberoam Micol.* 29(3):164–168, 2012.

Artigo 4.3**UTILIZAÇÃO DO ÁGAR E CALDO MUELLER-HINTON NA PROVA DO TUBO
GERMINATIVO**

Mattei, A.S.; Alves, S.H.; Severo, C.B.; Guazzelli, L.S.; Oliveira, F.M.; Severo, L.C.

O artigo será encaminhado para a publicação na Revista Mycoses.

Resumo

Candida albicans é frequentemente isolada em amostras clínicas, assim a sua diferenciação presuntiva de outras espécies não-albicans é baseada na habilidade de formar o tubo germinativo em soro humano. Entretanto, existem duas espécies que também possuem essa característica, *C.dublinskiensis* e *C.afriicana*. O objetivo foi comparar quatro diferentes substratos para a realização da prova do tubo germinativo (TG). Utilizou-se 140 isolados de *Candida* spp. (135 *C. albicans*, 4 *C. tropicalis* e 1 *C. dublinskiensis*) identificadas através de meio automatizado. A prova do TG foi utilizando soro previamente congelado e fresco, caldo e ágar Mueller-Hinton (MH). O TG através da técnica do soro a fresco foi identificado em 96% (130/136), 94% (128/136) através do soro congelado, 92% (125/136) no ágar e 90% (122/136) no caldo MH. A sensibilidade de cada teste foi maior que 90% e especificidade de 100%. Tanto o caldo quanto o ágar MH foram capazes de identificar apenas os verdadeiros positivos e não ocorrendo falsos positivos, porém deixaram de identificar alguns isolados de *C.albicans*. O ágar e o caldo MH podem ser utilizados na rotina laboratorial, uma alternativa na identificação do tubo germinativo.

Palavras-chaves: identificação, tubo germinativo, Mueller-Hinton, *Candida albicans*

INTRODUÇÃO

A identificação rápida de isolados de espécies de *Candida* em laboratórios clínicos tornou-se ainda mais importante, pois a alta incidência da candidose aumenta na mesma proporção do crescimento de números de pacientes com risco de desenvolver infecção por *Candida albicans* [1].

A diferenciação presuntiva rápida entre *C. albicans* e espécies não-*albicans* é frequentemente realizada com base na habilidade dos isolados evidenciarem tubos germinativos no soro [2]. Entretanto, até 2008, acreditava-se que apenas *C. albicans* e *C. dubliniensis* seriam capazes de formar o tubo germinativo. *C. africana*, uma nova espécie do gênero também possui tal característica [3]. Além disso, *C. tropicalis* pode formar pseudohifas muito semelhantes ao tubo germinativo, porém há a presença de uma constrição, o que muitas vezes dificulta a diferenciação das espécies [4].

Um método simples, rápido, seguro e prático que facilite a rotina laboratorial para diferenciação de *C. albicans* de outras espécies tornou-se necessário [5]. Em 2007, uma nova técnica utilizando o ágar Mueller-Hinton para a produção do tubo germinativo, na qual seria mais segura quando comparada com o método convencional [2].

O objetivo desse estudo foi comparar quatro substratos para a realização da prova do tubo germinativo.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se 140 isolados clínicos de *Candida* spp., sendo 135 *C. albicans*, 4 *C. tropicalis* e 1 *C. dubliniensis* provenientes de candidose em diversos sítios anatômicos, identificadas através do meio automatizado ID 32C (biomerieux[®], Marcy l'Etoile, França).

Os substratos para a produção de tubos germinativos (TG) incluíram: a) soro previamente congelado; b) soro fresco; c) caldo Muller-Hinton (MH); d) ágar Mueller-Hinton. Os inóculos constituíram-se um fragmento de colônia para os tubos contendo 0,5 mL de soro ou caldo MH e 10 uL de uma suspensão padronizada (0,5 da escala de McFarland) para o ágar MH, imediatamente coberta por lamínula estéril. A incubação foi a 37°C por 2h para todas as técnicas.

A visualização da emissão de tubo germinativo a partir dos soros e caldo MH foi realizada da forma convencional e as placas com ágar MH em microscópio óptico em objetivas de 10 e 40x. As quatro técnicas foram comparadas e calculadas as sensibilidade e especificidade de cada uma.

RESULTADOS

No soro a fresco a emissão do TG ocorreu em 96% (130/136) das amostras, no soro previamente congelado a emissão do TG foi de 94% (128/136). No ágar MH 92% (125/136) e no caldo MH 90% (122/136) das amostras produziram tubos germinativos (Tabela 1).

Em nenhum dos quatro substratos ocorreu a formação do TG nas quatro amostras de *Candida tropicalis*, apresentando uni a multibrotamentos nos blastoconídios e filamentos com constrição, os quais foram facilmente visualizados através do ágar e caldo MH quando comparados com soro congelado e a fresco.

Em todas as técnicas avaliadas, a sensibilidade foi maior que 90% e a especificidade foi de 100%. No caldo e no ágar MH, as amostras emitiram somente tubos germinativos verdadeiros, isto é, com ausência de constrição entre o tubo germinativo e a célula leveduriforme; todavia, não foram capazes de identificar alguns isolados de *C. albicans*.

Através do caldo MH foi possível observar grande quantidade de brotamentos nos blastoconídios em comparação com as outras três técnicas. Além disso, a formação do TG foi melhor visível no ágar e caldo do que nas outras duas técnicas, não deixando dúvidas quanto à presença ou ausência da constrição.

Em todas as técnicas, *C. dubliniensis* emitiu tubo germinativo.

DISCUSSÃO

O TG é uma alternativa simples e barata em comparação com outras técnicas de diagnóstico rápido e pode ser utilizado em laboratórios que tentam trabalhar economicamente [4,6]. A formação do TG pela *C. albicans* ocorre frequentemente quando existem condições desfavoráveis, resultado da conversão da forma leveduriforme para filamentosa, além da existência de pseudohifas [1].

O método clássico que utiliza soro humano possui sensibilidade entre 91 a 100% e especificidade de 95 a 100%, amplamente utilizado há muitos anos em laboratórios [4], nossos resultados estão de acordo com estes parâmetros. Apesar da simplicidade e baixo custo, a filamentação em soro apresenta como desvantagem a necessidade do inóculo ser padronizado. Outra desvantagem é a má interpretação do observador das extensões de blastoconídios como TG, tempo de incubação correto e o pool de soro poderia estar contaminado com HIV e vírus da hepatite [2].

Na tentativa de superar tais inconvenientes, têm sido propostos outros meios, como soro de animais, água peptonada, *tryptic soy broth* (TSI), caldo Sabouraud, Caldo Infusão cérebro-coração (BHI) e caldo RPMI-1640, porém apresentando baixa sensibilidade [4]. Kim et al. [1] comparou a formação do TG em soro de coelho a 37°C com *yeast extract peptone dextrose* (YEPD) a 39°C e observou maior sensibilidade e especificidade através do YEPD.

Em nosso estudo, a formação do TG através do ágar MH foi facilmente observada e já havia sido descrita por Rimek et al. [2], apontando a possibilidade da utilização do caldo MH, sendo uma vantagem a fácil diferenciação da presença ou ausência da constrição entre a extensão e o blastoconídio.

O ágar MH é utilizado em testes de suscetibilidade de *Candida* sp. através da disco-difusão frente ao fluconazol, anfotericina B, posaconazol e voriconazol; com resultados semelhantes ao meio padrão utilizado no e-test [5,7,8,9]. Além disso, o meio padrão é mais caro e necessita de equipamentos específicos para utilizá-lo [9].

Tanto o caldo quanto ágar MH deixaram de identificar 11 e 14 isolados respectivamente, isso poderia ser explicado pela existência de alguns isolados de *C. albicans* apresentarem TG negativo [4].

Nos quatro meios testados não houve a formação do TG nos isolados de *C. tropicalis*, o que aponta para 100% de especificidade; este resultado também foi observado por Rimek et al. [2]. Através do caldo e ágar MH foi facilmente visualizada a constrição entre a extensão formada a partir do blastoconídio, não existindo dúvidas sobre a presença do TG. Entretanto, Hilmioglu et al. [4] descreveu que com o passar das horas de incubação, a sensibilidade de todos os meios que havia testado aumentavam e a especificidade diminuía.

CONCLUSÃO

O ágar e o caldo Mueller-Hinton podem ser utilizados na prova do tubo germinativo, com sensibilidade e especificidade altas, sendo substratos alternativos na rotina laboratorial.

AGRADECIMENTO

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos de doutorado.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram que não existem conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

- [1] Kim D, Shin W, Lee K, Kim K, Park J, Koh C. 2002. Rapid differentiation of *Candida albicans* from other *Candida* species using its unique germ tube formation at 39°C. *Yeast* 19: 957–962.
- [2] Rimek D, Fehse B, Göpel P. 2007. Evaluation of Mueller-Hinton-agar as a simple medium for the germ tube production of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Mycoses* 51: 205–208.
- [3] Romeo O, Criseo G. 2008. Morphological, biochemical and molecular characterisation of the first Italian *Candida africana* isolate. *Mycoses* 52: 454–457.
- [4] Hilmioglu S, Ilkit M, Badak Z. 2007. Comparison of 12 liquid media for germ tube production of *Candida albicans* and *C. tropicalis*. *Mycoses* 50: 282–285.
- [5] Brown S, Traczewski M. 2007. Quality Control Limits for Posaconazole Disk Susceptibility Tests on Mueller-Hinton Agar with Glucose and Methylene Blue. *J Clin Microbiol* 45(1): 222–223.

[6] Hoppe J, Frey P. 1999. Evaluation of Six Commercial Tests and the Germ-Tube Test for Presumptive Identification of *Candida albicans*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18:188–191.

[7] Pfaller M, Barry A, Bille J et al. 2004. Quality Control Limits for Voriconazole Disk Susceptibility Tests on Mueller-Hinton Agar with Glucose and Methylene Blue. *J Clin Microbiol* 42(4): 1716–1718.

[8] Pfaller M, Boyken L, Messer S, Tendolkar S, Hollis R, Diekema D. 2004. Evaluation of the Etest Method Using Mueller-Hinton Agar with Glucose and Methylene Blue for Determining Amphotericin B MICs for 4,936 Clinical Isolates of *Candida* Species. *J Clin Microbiol* 42(11): 4977–4979.

[9] Lee S, Fung C, Lee N et al. 2001. Fluconazole Disk Diffusion Test with Methylene Blue- and Glucose-Enriched Mueller-Hinton Agar for Determining Susceptibility of *Candida* Species. *J Clin Microbiol* 39(4): 1615-1617.

Tabela 1. Comparação de quatro técnicas para a produção de tubo germinativo em isolados clínicos de *Candida* spp.

AMOSTRAS	SORO	SORO	ÁGAR	CALDO
	CONGELADO	FRESCO	MH	MH
<i>Candida albicans</i> (n=135)	129	127	124	121
<i>Candida tropicalis</i> (n=4)	0	0	0	0
<i>Candida dubliniensis</i> (n=1)	1	1	1	1
Total	130	128	125	122
S/E	96/100%	95/100%	92/100%	90/100%

MH: Mueller-Hinton; S/E: Sensibilidade/Especificidade

Artigo 4.4

DETERMINATION OF GERM TUBE, PHOSPHOLIPASE AND PROTEINASE
ACTIVITY FROM BLOODSTREAM ISOLATES OF *Candida albicans*

Antonella Souza Mattei, Sydney Hartz Alves, Cecília Bittencourt Severo, Luciana da
Silva Guazzelli, Flávio de Mattos Oliveira, Luiz Carlos Severo

Artigo aceito para publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

Resumo

Introdução: *Candida albicans* são comensais, entretanto, se ocorrer interferência na microbiota residente ou defesa imune estiver debilitada, esta levedura pode causar infecções. Existem muitos fatores que contribuem para a virulência e patogenicidade dessa levedura, incluindo a produção do tubo germinativo e enzimas hidrolíticas extracelulares, especialmente a fosfolipase e proteinase. Esse estudo objetivou investigar *in vitro* a formação do tubo germinativo, atividade da fosfolipase e proteinase em espécies de *C. albicans* provenientes de hemocultivos. **Métodos:** Foram utilizados 153 isolados de *C. albicans* provenientes de hemocultivos e analisados de acordo com a produção do tubo germinativo, atividade da fosfolipase e proteinase. As técnicas utilizaram ágar gema de ovo, meio de cultura contendo soro bovino e soro humano. O estudo foi realizado em duplicata. **Resultados:** O percentual dos isolados que produziram proteinase foi 97% e 78% dos isolados produziram fosfolipase. O tubo germinativo foi positivo em 95% dos isolados. A maioria dos isolados apresentaram produção baixa de fosfolipase e alta produção de proteinase. **Conclusão:** *Candida albicans* provenientes de hemocultivos possuem fatores de virulência, como enzimas hidrolíticas e formação de tubo germinativo, sendo que em condições favoráveis seriam capazes de causar infecção.

Palavras-chaves: virulência, tubo germinativo, fosfolipase, proteinase, *Candida albicans*, candidemia

Abstract

Introduction: *Candida albicans* are commensals, however, if the balance of normal flora is disrupted or the immune defenses are compromised, its can cause disease manifestations. Several attributes contribute to the virulence and pathogenicity this yeast, including the production of germ tube and extracellular hydrolytic enzymes, particularly phospholipase and proteinase. This study aimed to investigate the germ tube production, activity of phospholipase and proteinase in bloodstream isolates of *C. albicans*. **Methods:** One hundred and fifty-three isolates of *Candida albicans* were obtained from blood samples and were analyzed for germ tube, phospholipase and proteinase production. The assays were performed in egg yolk medium, a medium containing bovine serum albumin and human serum. The study was performed in duplicate. **Results:** The percentage of isolates which produced detectable amounts of proteinase was 97% and 78% of isolates produced phospholipase. The percentage production of germ tube was 95% of isolates. The majority of isolates were considered to have low phospholipase production and high proteinase production. **Conclusion:** Bloodstream isolates of *Candida albicans* produce virulence factors, such the germ tube production and hydrolytic enzymes production; that in favorable conditions would be capable of causing infection.

Keywords: virulence, germ tube, phospholipase, proteinase, *Candida albicans*, candidemia

Introduction

Candida albicans is a common coloniser of human skin and mucosal surfaces, and balance between colonization and candidiasis depends on the ability of its in modulating the expression of virulence factors in response to the environmental changes, combined with the competence of the hosts immune system¹.

Several virulence factors of *Candida albicans* have been discovered or proposed, including adhesion, hyphal formation, germ tube (GT), phenotypic diversity and production of extracellular hydrolytic enzymes, such as phospholipases and proteinases^{2,3,4,5,6}.

The hydrolytic enzymes destroy or disorganize elements of the host cell membranes, leading to membrane dysfunction and/or physical disruption. Phospholipases act by invading and causing tissue damage in host cells, rupturing the epithelial cell membranes and allowing the ends of hyphae penetrate the cytoplasm. Proteinase production is important for increasing the ability of certain organisms to colonize and penetrate the host tissue and deceive the host immune system, breaking a significant number of important proteins for immunity, such as immunoglobulins, complement proteins and cytokines^{5,7,8,9}. The GT production can be induced from the yeast cell and developed into the mycelia form. This morphological transition can be induced by changes in a variety of environmental factors and the action of immune system blocked¹⁰.

Due to the increased incidence of invasive infections by *Candida albicans*, interest in the study of virulence factors of these species has intensified, to establish strategies for the prevention and control of candidiasis, and also to identify possible targets for the development of new therapeutic interventions^{7,11}. However, the studies about the relationship between GT production and hydrolytic enzymes activity in bloodstream isolates are scarce^{2,12}.

Thus, this study aimed to investigate the in vitro the germ tube production, activity of phospholipase and proteinase in bloodstream isolates of *C. albicans*, such as virulence factors.

Methods

One hundred and fifty-three isolates of *Candida albicans* were obtained from the blood samples identify through ID 32C assay (BioMérieux – Marcy-I'Etoile, France) and were analyzed for germ tube, phospholipase and proteinase production as previous described by Mohan & Ballal² e Vidotto et al.⁸ The standard strain *C. albicans* ATCC 28367 (American Type Culture Collection, Rockville, Md) was included in the experiments.

The inoculum of yeast cells was made from stock cultures and incubated for 24 hours at 37°C in Sabouraud dextrose agar and standardized to 0.5 McFarland turbidity range at densitometer (BioMérieux – Marcy-I'Etoile, France).

The isolates were screened for their extracellular phospholipase activity by growing them on egg-yolk agar and measuring the size of the zone of precipitation. Briefly, the egg-yolk medium consisted of 22.5g malt agar, 29.2g NaCl, 0.28g CaCl₂ and 10% sterile egg yolk. Extracellular phospholipase activity was detected by inoculating 10 µL aliquots of the yeast suspension (approximately 10⁸ yeast cells/mL) into the wells punched onto the surface of the egg-yolk medium. The diameter of the precipitation zone around the well was measured after incubation at 37 °C for six days. Phospholipase activity (Pz value) was determined by the ratio of the diameter of the colony to the total diameter of the zone of precipitation.

Determination of the protease production was performed in agar containing bovine albumin serum. A solution was prepared by dissolving 11.7g yeast carbon base, 0.1g yeast extract and 2g bovine serum albumin in 200 mL of distilled water. The solution was sterilised by filtration, and added to a previously sterilised stock solution of 16g of Agar-Agar in 800 mL of distilled water. After inoculation, plates were incubated at 37°C, and results were recorded after 6 days of incubation. The plates were fixed with 20% trichloroacetic acid and stained with 1.25% amidoblack. Descolouruzation was performed with 15% acetic acid. Enzyme activity was measured as the diameter of a lytic area around the growth on serum.

The measure (Pz) was determined as the ratio of the diameter of the colony to the total diameter of the colony plus the precipitation zone, and was scored and categorised as follows: Pz-1 (negative); 0.35–0.5 (high producers); 0.51–0.74 (moderate producers); and 0.75–0.9 (low producers). Each isolate was tested in duplicate and the enzymes activities values were recorded as the average of the two measurements.

The germ tube (GT) induction was defined as filamentous out-growth from a blastoconidium at least twice as long as the parent cell without constriction at the junction. The isolated colony of yeast cells was inoculated in glass tubes with 1 ml of human serum, then incubated at 37°C for 2h. A drop of yeast inoculum was then placed on a clean microscope slide, a coverslip was placed on the slide. The examination of the wet mount preparation under the 40x microscope objective and tests were performed in duplicate.

Results

Phospholipase activity in *Candida albicans* isolates was detected in 78% (120/153) and proteinase activity in 97% (148/153) of the isolates studied.

The mean values of the isolates tested demonstrated Pz 0.79, varying degrees of phospholipase activity (Pz value: 0.48-1.00). The average Pz value for proteinase activity was 0.71 with ranged from 0.49 and 1.00.

The isolates were categorized by phospholipase and proteinase production enzymatic, described in table 1. The majority of *C. albicans* isolates that showed enzymatic activity were considered to have very strong proteinase activity and low phospholipase activity. In the present study, 73% of the isolates produced both phospholipase and proteinase.

The GT induction was positive in 95% (146/153) of *Candida albicans* isolates from blood culture.

Discussion

For the past several years yeasts in the genus *Candida* continue to be amongst the most important etiologic agents of nosocomial infection. The considerable increase in deep-seated candidemia is most commonly observed in patients in ICUs, those with indwelling catheters or receiving oncological treatment, organ transplant recipients, and other immunocompromised individuals subjected to heavy therapeutic protocols^{2, 13}.

The many studies about the exoenzymes activity are frequent in *Candida* spp. isolates from mucosal surface^{1,3,7,8,9,12,14}, while, in bloodstream isolates are scarce^{2,12}. The virulence in *Candida* spp. is believed to be due not to a single virulence factor but

to the combination of several factors¹², besides the colonization different anatomic sites⁷.

Phospholipases and proteinases of *C. albicans* are considered important virulence factor, the absence or lowered expression of these enzymes may indicate the less virulent nature of *Candida* species².

In our study, 78% and 97% of the isolates showed phospholipase and proteinase activity, respectively. Mohan & Ballal² found similar percentages at phospholipase, however, the proteinase activity was 44%, suggesting that our isolates would be more virulent when compared.

Few studies have investigated phospholipase and proteinase production together in the same strains. In this study, 73% of the isolates produced both phospholipases and proteinases, agreement with D`Eça Júnior et al.⁷ e Kantarcioglu & Yucel¹⁴ observed that 60 and 93% of *C. albicans* isolates, but were isolated from different anatomic sites.

In a other similar study, the enzymatic activity indicated that all *Candida albicans* isolates were pathogenic², however, the present study showed no activity in 38 isolates at least a hydrolytic enzyme.

The GT observation was positive in 95% of the isolates. The high production of phospholipase was observed in the 13 of this isolates with GT positive. Vidotto et al.¹² described the correlation between high phospholipase activity and GT production in the oral isolates examined, which suggest that these capabilities are needed for the colonization and infection of the oral cavity by *C. albicans*. It is possible that the high phospholipase activity and GT production can facilitate the penetration through the mucosa, since the phospholipase activity is particularly concentrated at the tips of the hyphae.

Ghannoum⁴ and D`Eça Júnior et al.⁷ suggested that quantity of phospholipase produced by *C. albicans* varied with the specific isolate and correlation with the site of infection.

In the present research, *C. albicans* bloodstream isolates produced extracellular phospholipase and proteinase. Blood isolates generally produce much higher levels than isolates from wounds or urine^{4,14}.

Conclusion

Boodstream isolates of *Candida albicans* produce virulence factors, such the germ tube production and hydrolytic enzymes production; that in favorable conditions would be capable of causing infection.

Acknowledgment

The authors thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for doctoral scholarship of the first author.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

References

1. Marcos-Arias C., Eras E, Madariaga L, Aguirre J, Quindós G. Phospholipase and proteinase activities of *Candida* isolates from denture wearers. *Mycoses* 2009; 54: e10–e16.
2. Mohan V, Ballal M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. *Rev Iberoam Micol* 2008; 25: 208-210.
3. Scheid L, Mario D, Lopes P, Loreto E, Linares C, Santurio J, Alves S. *Candida dubliniensis* does not show phospholipase activity: true or false? *Rev Soc Bras Med Tropical* 2010; 43(2):205-206.
4. Ghannoum M. Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000; 13(1):122-143.
5. Schulze J, Sonnenborn U. Yeasts in the Gut: From Commensals to Infectious Agents. *Dtsch Arztebl Int.* 2009; 106(51-52): 837–842.
6. Brand A. Hyphal Growth in Human Fungal Pathogens and Its Role in Virulence. *Int J Microbiol.* 2012; 2012: 517-529.
7. D’Eça Júnior A, Silva A, Rosa F, Monteiro S, Figueiredo P, Monteiro C. *In vitro* differential activity of phospholipases and acid proteinases of clinical isolates of *Candida*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011; 44(3):334-338.

8. Vidotto V, Pontón J, Aoki S, Quindós G, Mantoan B, Pugliese A, Ito-Kuwa S, Nakamura K. Differences in extracellular enzymatic activity between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates. *Rev Iberoam Micol* 2004; 21: 70-74.
9. Ombrella A, Racca L, Ramos L. Actividades proteinasa y fosfolipasa de aislamientos de *Candida albicans* provenientes de secreciones vaginales con distintos valores de pH. *Rev Iberoam Micol* 2008; 25: 12-16.
10. Kim D, Shin W, Lee K, Kim K, Park J, Koh C. Rapid differentiation of *Candida albicans* from other *Candida* species using its unique germ tube formation at 39°C. *Yeast* 2002; 19: 957–962.
11. Rorig KCO, Colacite J, Abegg MA. Production of virulence factors *in vitro* by pathogenic species of the genus *Candida*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42:225-227.
12. Vidotto V, Koga-Ito C, Milano R, Fianchino B, Pontón J. Correlation between germ tube production, phospholipase activity and serotype distribution in *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol* 1999; 16: 208-210.
13. Giri S, Kindo A. A review of *Candida* species causing blood stream infection. *Indian J. Med. Microbiol.* 2012; 30 (3): 270-278.
14. Kantarcioglu A, Yucel A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses* 2002; 45: 160–165.

Table 1. Distribution of 153 bloodstream *C. albicans* isolates, according to phospholipase and proteinase production

Production of extracellular hydrolytic enzymes (Pz)	<i>Candida albicans</i>	
	Phospholipase (n)	Proteinase (n)
High (0.35-0.5)	17	81
Moderate (0.51-0.74)	38	56
Low (0.75-0.99)	65	11
Negative (1)	33	5
Total	153	153

Pz: activity zone for phospholipase and proteinase

Artigo 4.5

PESQUISA DE *Candida dubliniensis* EM ISOLADOS CLÍNICOS DE CANDIDEMIA
PROVENIENTES DE UM HOSPITAL DE PORTO ALEGRE, RIO GRANDE DO
SUL, BRASIL

MATTEI, A.S.; ALVES, S.H.; SEVERO, C.B.; GUAZZELLI, L.S.; OLIVEIRA, F.M.;
SEVERO, L.C.

Artigo será encaminhado a Mycopathologia.

RESUMO

Candida albicans é uma espécie comum da microbiota residente orofaríngea e gastrointestinal, tornando-se patogênica em condições favoráveis. Outras espécies desse gênero adquiriram essa característica, como por exemplo, *C. dubliniensis*, diferenciada apenas por teste genotípico. O objetivo foi utilizar testes fenotípicos para a diferenciação de *C. albicans* de *C. dubliniensis*. Foram utilizados 153 isolados provenientes de hemocultivos pertencentes a micoteca de um hospital, identificados como *C. albicans* através do kit comercial durante o período de 1999 a 2009. As cepas foram subcultivadas e as colônias identificadas através de testes fenotípicos (formação do tubo germinativo, ágar fubá, termotolerância, meio niger e hipertônico), molecular (espectrometria de massa) e genotípico. Nos testes de espectrometria de massa, ágar fubá, caldo niger e caldo hipertônico todas as cepas foram identificadas como *C. albicans*. Entretanto, 146 cepas foram identificadas como *C. albicans* através dos testes fenotípicos ágar niger, ágar hipertônico e termotolerância. A emissão do tubo germinativo ocorreu em 148 (96%) cepas testadas. A identificação genotípica foi realizada em sete cepas, as quais foram presuntivamente identificadas como *C. dubliniensis* através dos testes fenotípicos citados anteriormente. Todas as sete cepas foram identificadas como *C. albicans*. Dessa maneira, *C. dubliniensis* não foi identificada nos isolados de hemocultivos pertencentes em nossa micoteca, concluindo que todos os casos de candidemia diagnosticados eram causados por *C. albicans*. Os testes fenotípicos de espectrometria de massa, ágar fubá, caldo niger e caldo hipertônico concordaram com o teste genotípico, sendo que este ainda é o teste mais preciso para a diferenciação das duas espécies.

PALAVRAS-CHAVES: fenotípico, molecular, PCR, *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, hemocultivo

INTRODUÇÃO

Candida albicans é uma espécie comum da microbiota residente orofaríngea e gastrointestinal, podendo tornar-se patogênica em condições favoráveis. Nas últimas décadas, outras espécies desse gênero tornaram-se patógenos clinicamente importantes, como por exemplo, *C. dubliniensis* (MÄHNB *et al.*, 2005; FERNANDEZ *et al.*, 2010; SILVEIRA-GOMES *et al.*, 2011).

C. dubliniensis é muito semelhante fenotipicamente a *C. albicans*, diferenciadas apenas por teste genotípico (ALVES *et al.*, 2002; LORETO *et al.*, 2010). Essa espécie é comumente isolada de amostras clínicas da cavidade oral de pacientes HIV positivos (LORETO *et al.*, 2010; CHOWDHARY *et al.*, 2011). Além disso, está relacionada com casos sistêmicos em pacientes HIV negativos, em particular neutropênicos pela quimioterapia e transplantados de órgãos sólidos ou medula óssea (ODDS *et al.*, 1998; FERNANDEZ *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2011). A incidência dessa levedura em casos de infecções sistêmica é de 2%, contudo os relatos de casos têm aumentado, provavelmente pela maior disponibilidade de testes acurados na diferenciação de *C. albicans* (FERNANDEZ *et al.*, 2010).

A diferenciação entre essas duas espécies tornou-se essencial quando isolados de *C. dubliniensis* demonstraram resistência ao fluconazol, resultando em fracasso no tratamento com esse antifúngico (AKGÜL; ÇERIKÇIOĞLU, 2009; MÄHNB *et al.*, 2005; SILVEIRA-GOMES *et al.*, 2011).

Os testes fenotípicos são de grande utilidade na rotina laboratorial. Possuem alta reprodutibilidade e custo baixo, reduzindo o tempo de diagnóstico e direcionando para terapia antifúngica mais adequada; porém não caracterizam o diagnóstico definitivo. O teste molecular permite a identificação definitiva, porém necessita de equipamentos com alto custo e mão de obra especializada (PASLIGH *et al.*, 2010; ESTRADA-BARRAZA *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.* 2011; SILVEIRA-GOMES *et al.*, 2011, PUTIGNANI *et al.*, 2011).

O objetivo do trabalho foi pesquisar *Candida dubliniensis* em isolados clínicos de hemocultivos previamente identificados como *C. albicans* em um hospital de Porto Alegre/RS, Brasil, durante o período de 10 anos.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Isolados clínicos

Foram utilizados 153 isolados provenientes de hemocultivos pertencentes a micoteca do Laboratório de Micologia, da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre/RS, identificados como *Candida albicans* através do kit comercial ID 32C® (BioMerieux, Marcy l'Etoile, França) durante o período de 1999 a 2009.

As cepas foram subcultivadas em ágar Sabouraud a 35°C por 24 horas e após o crescimento, as colônias foram identificadas através de testes fenotípicos e genotípico. Os testes fenotípicos utilizados foram: formação do tubo germinativo, ágar fubá, meio niger (caldo e ágar) e meio hipertônico (caldo e ágar), termotolerância e espectrometria de massa. E o teste genotípico foi realizado através da reação em cadeia da polimerase (PCR) seguido de sequenciamento genético. Para o controle dos testes utilizou-se *C. albicans* ATCC 28367 e *C. dubliniensis* CBS 7987.

2. Formação do tubo germinativo

Uma colônia de cada isolado foi inoculada em 0,5 mL de soro humano e incubados a 37°C por 2h. A leitura foi realizada através de uma gota do inóculo entre lâmina e lamínula, observados ao microscópio óptico em objetiva de 40x.

3. Presença e estrutura de clamidosporos

a) Microcultivo em ágar fubá

As cepas foram subcultivadas em ágar fubá (farinha de milho e Tween 80) e incubadas a 37°C por 48h. Através de uma lamínula, observa-se a presença de abundantes clamidosporos formando pares ou trios nas extremidades das hifas em isolados de *C. dubliniensis*, enquanto que, *C. albicans* apresenta clamidosporos intercalares e terminais únicos.

b) Ágar e caldo niger (semente de *Guizotia abyssinica*)

As cepas foram subcultivadas em ágar niger (semente de *Guizotia abyssinica*, glicose, hidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄), creatinina, ágar base) e incubados a 30°C por 48h. As colônias de *C. albicans* são de coloração branca a creme com bordo liso, sem hifas ou clamidosporos. Enquanto que, *C. dubliniensis* possuem bordos rugosos com franjas, presença de hifas e clamidosporos abundantes. Para o caldo (mesma composição do ágar niger, porém sem o ágar base) as cepas foram repicadas em tubos, incubadas a 30°C em estufa shaker a 2500 rpm/20h. Após, uma alçada foi observada entre lâmina e lamínula no microscópio óptico em objetiva de 40x. As cepas

de *C. albicans* apresentam pequena quantidade de blastoconídios e *C. dubliniensis*, clamidosporos em formato de cachos.

4. Crescimento em 45°C

As cepas foram subcultivadas em ágar Sabouraud e incubadas a 45°C durante sete dias, determinando a capacidade de crescimento nesta temperatura. A termotolerância é uma característica de *C. albicans*, enquanto que, *C. dubliniensis* apresenta ausência de crescimento a essa temperatura.

5. Crescimento em ágar e caldo hipertônico (NaCl 6,5%)

Foi preparado um inóculo de cada cepa, previamente subcultivadas em ágar Sabouraud a 36°C por 24h, ajustado em densitômetro (BioMerieux®) na escala 0,5 McFarland e diluído em 1:100. Após 10uL foram semeados no ágar (glicose, peptona, ágar base, NaCl) e caldo (Caldo Sabouraud e NaCl) hipertônico e incubados a 28°C até sete dias. O crescimento no ágar foi avaliado como bom (+++), moderado (++) , pouco (+) e sem (-). No caldo observou se houve a presença ou ausência de turvação. Assim, *C. dubliniensis* não cresce nesses dois meios de cultura.

6. Espectrometria de massa

Matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) realiza análise das proteínas constituintes em cepas intactas, no qual o espectro de massa dessas proteínas é gerado e interpretado como um fingerprint celular em um banco de dados, identificando o gênero e espécie das cepas testadas, de acordo com a técnica descrita por Putignani *et al.* (2011).

7. Caracterização genotípica

As cepas caracterizadas como *C. dubliniensis* através dos testes fenotípicos foram submetidas a caracterização genotípica, através da extração do DNA total e amplificação com o par de *primer* NL1 (5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG3') e NL2 (5'GGTCCGTGTTTCAAGGCGG3') (O'DONNELL, 1993). Os produtos foram enviados ao sequenciamento e comparados com o GenBank.

Os testes foram comparados, calculando a sensibilidade e especificidade de cada um.

RESULTADOS

Das 153 cepas utilizadas no estudo, 146 foram identificadas como *C. albicans* através dos testes fenotípicos ágar niger, ágar hipertônico e termotolerância. Entretanto,

nos testes MALDI-TOF MS, ágar fubá, caldo niger e caldo hipertônico todas as cepas foram identificadas como *C. albicans* (Tabela 1).

A emissão do tubo germinativo ocorreu em 148 cepas testadas (96%).

Tabela 1: Testes fenotípicos utilizados na diferenciação de *Candida albicans* e *C. dubliniensis* em 153 cepas provenientes de hemocultivos.

Testes fenotípicos	<i>Candida</i>		
	<i>albicans</i>	Sensibilidade	Especificidade
	n = 153		
Tubo germinativo	148	96%	100%
Ágar fubá	153	100%	100%
Caldo niger	153	100%	100%
Ágar niger	146	95%	68%
Caldo hipertônico	153	100%	100%
Ágar hipertônico	146	95%	68%
Termotolerância (45°C)	146	95%	68%
MALDI-TOF MS	153	100%	100%

MALDI-TOF MS: *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*

No ágar hipertônico, os resultados foram os seguintes: 73/153 cepas com pouco crescimento (+), 54/153 cepas com crescimento moderado (++), 19/153 cepas com crescimento bom (+++) e 7/153 sem crescimento (-).

Através do ágar niger, as sete cepas apresentaram colônias com bordo rugoso, sugerindo que seriam *C. dubliniensis*. Contudo, ao observar estas no microscópio em objetiva de 10x, os bordos das colônias eram lisos.

A identificação genotípica, PCR, foi realizada em sete cepas, as quais foram presuntivamente identificadas como *C. dubliniensis* através dos testes fenotípicos citados anteriormente. Todas as sete cepas foram identificadas como *C. albicans*.

DISCUSSÃO

A diferenciação de *Candida albicans* de *C. dubliniensis* é uma necessidade contínua, tanto para auxiliar o tratamento da micose quanto para aspecto epidemiológico. Desse modo, vários testes fenotípicos têm sido propostos, com alta sensibilidade e especificidade (ALVES *et al.*, 2002; STAIB; MORSCHÄUSER, 2005; AKGÜL; ÇERIKÇIOGLU, 2009; ELLS *et al.*, 2009; PASLIGH *et al.*, 2010; LORETO *et al.*, 2010; SILVEIRA-GOMES *et al.*, 2011; CHOWDHARY *et al.*, 2011; BADER *et al.*, 2011; BILLE *et al.*, 2012).

A incidência de *C. dubliniensis* em infecções sistêmicas é baixa, aproximadamente 2% dos casos de candidemia (FERMANDEZ *et al.*, 2010), e sua prevalência também representa este percentual em micotecas com cepas estocadas e identificadas como *C. albicans* (MÄHNB *et al.*, 2005).

Esses testes fenotípicos podem identificar falsos positivos, pois muitas cepas de *C. albicans* possuem a habilidade em se parecer com *C. dubliniensis*, dificultando o diagnóstico e o tratamento (MÄHNB *et al.*, 2005). Além disso, sabe-se que isolados de *C. albicans* armazenados por períodos longos podem produzir mudanças morfológicas e enzimáticas, assim, esse fenômeno é conhecido como mudança fenotípica (*phenotypic switching*), sendo espontâneo, reversível e frequentemente observado (SILVEIRA-GOMES *et al.*, 2011).

Ribeiro *et al.* (2011) descreveram que 48 cepas de *C. albicans* (n=200) apresentaram abundantes clamidosporos e em formato de cachos através do ágar fubá, sendo identificados como *C. dubliniensis*. Esses dados sugeriram que o arranjo dessas estruturas não permitiria a diferenciação entre as espécies. Entretanto, em nosso estudo todos os isolados apresentaram esses esporos intercalares e/ou terminais.

Em relação a emissão do tubo germinativo, 96% das cepas de *C. albicans* foram positivas; concordando com Mähnb *et al.* (2005) que descreveu que a maioria das cepas de *C. albicans* testadas apresentaram tubo germinativo positivo. A ausência do tubo germinativo pode ocorrer em isolados dessa espécie, podendo explicar a falha do teste (HILMIOGLU *et al.*, 2007).

Através do teste de termotolerância, sete isolados de *C. albicans* não apresentaram crescimento, sendo presuntivamente identificadas como *C. dubliniensis*. Esse fato já havia sido documentado por Chowdhary *et al.* (2011), Ribeiro *et al.* (2011) e Mähnb *et*

al. (2005), e ainda, foi descrito que cepas de *C. dubliniensis* foram capazes de crescer a temperatura de 45°C (MÄHNB *et al.*, 2005; PASLIGH *et al.*, 2010).

Através do ágar niger houve contradição entre a macro e microscopia das colônias das sete cepas identificadas como *C. dubliniensis*. Chowdhary *et al.* (2011) havia relatado que 11 cepas de *C. albicans* apresentaram colônias com bordo rugoso com pseudohifas, blastoconídios e clamidocsporos nesse meio de cultivo. Entretanto, o caldo niger apresentou melhor desempenho, concordando com o teste genotípico, no qual este é um meio que induz rapidamente a formação abundantes dessas estruturas em cepas de *C. dubliniensis* (STAIB; MORSCHÄUSER, 2005).

O caldo e ágar hipertônico discordaram na diferenciação das duas espécies, como foi observado por Akgül & Çerikçioğlu (2009) que descreveram a presença de falso-positivos no teste com ágar hipertônico. Entretanto, Chowdhary *et al.* (2011) demonstrou 100% de sensibilidade e especificidade utilizando o ágar, sugerindo que esse possui vantagens quando comparado com o caldo. O crescimento no caldo é baseado na turbidez do meio, o que pode ser confundido com contaminação microbiana. Assim, Silveira-Gomes *et al.* (2011) descreveram que 8 isolados de *C. albicans* não apresentaram crescimento no caldo hipertônico. Entretanto, Alves *et al.* (2002) demonstrou que todas as cepas de *C. albicans* testadas apresentaram crescimento visível e as cepas de *C. dubliniensis* não cresceram neste meio.

O MALDI-TOF MS tem sido aplicado como uma ferramenta útil na análise microbiana com base no perfil espécie-específica, proporcionando uma alternativa rápida e fácil de usar, com precisão na identificação no ambiente clínico (PUTIGNANI *et al.*, 2011). Diversos estudos têm comparado a eficácia desse teste com outros métodos e demonstraram a identificação de 99% das leveduras testadas (BILLE *et al.*, 2012; BADER *et al.*, 2011; PUTIGNANI *et al.*, 2011), sendo considerado mais rápido e cinco vezes mais barato do que o teste ID 32C[®] (BILLE *et al.*, 2012).

A diferenciação definitiva dessas duas espécies continua ocorrendo através do teste genotípico. Além disso, as sequências obtidas podem ser comparadas e auxiliariam no entendimento dos aspectos de virulência, resistência a antifúngicos e mecanismos de adesão do gênero *Candida* (ELLS *et al.*, 2009; LORETO *et al.*, 2010).

CONCLUSÃO

A espécie *Candida dubliniensis* não foi identificada em isolados de hemocultivos, concluindo que todos os casos de candidemia diagnosticados foram causados por *C. albicans*. Os testes fenotípicos MALDI-TOF MS, ágar fubá, caldo niger e caldo hipertônico concordaram com o teste genotípico.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos de doutorado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akgül, Ö; Çerikçioğlu, N. Hypertonic Sabouraud Dextrose Agar as a Substrate for Differentiation of *Candida dubliniensis*. *Mycopathologia*. 167:357–359, 2009.

Alves, S.; Milan, E.; Sant’Ana, P.; Oliveira, L.; Santurio, J.; Colombo, A. Hypertonic sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 43: 85–86, 2002.

Bader O, Weig M, Taverne-Ghadwal L, Lugert R, Groß U, Kuhns M. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*. 17: 1359–1365, 2011.

Bille E, Dauphin B, Leto J, Bougnoux M, Beretti J, Lotz A, Suarez S, Meyer J, Join-Lambert O, Descamps P, Grall N, Mory F, Dubreuil L, Berche P, Nassif X, Ferroni A. MALDI-TOF MS Andromas strategy for the routine identification of bacteria, mycobacteria, yeasts, *Aspergillus* spp. and positive blood cultures. *Clin Microbiol Infect*. 18: 1117–1125, 2012.

Chowdhary, A.; Randhawa, H.; Kowshik, T.; Kathuria, S.; Roy, P.; Brandt, M. Application of hypertonic Sabouraud glucose agar for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 69:440–442, 2011.

Ells R, Kock J, Pohl C. *Candida albicans* or *Candida dubliniensis*? *Mycoses*. 54;1-16, 2009.

Estrada-Barraza, D.; Martínez, A.; Flores-Padilla, L.; Elias, R.; Sánchez-Vargas, L. Comparación entre métodos convencionales, ChromAgar *Candida*[®] y el método de la PCR para la identificación de especies de *Candida* en aislamientos clínicos. *Rev Iberoam Micol*. 28(1):36–42, 2011.

Fernandez, A.; Jewtuchowicz, V.; Malzone, M.; Lopez-Daneri, G.; Saa, G.; Iovannitti, C.; Tokumoto, M.; Mujica, M. Phenotypic and genotypic characterization of *Candida dubliniensis* isolate in a patient with disseminated candidiasis. *Mycoses*. 54:e602-e605, 2010.

Hilmioglu S, Ilkit M, Badak Z. Comparison of 12 liquid media for germ tube production of *Candida albicans* and *C. tropicalis*. *Mycoses*. 50: 282–285, 2007.

Mähnb, B; Stehr, F; Schäfer, W; Neuber, K. Comparison of standard phenotypic assays with a PCR method to discriminate *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Mycoses*. 48: 55–61, 2008.

Loreto, E.; Scheid, L.; Nogueira, C.; Zeni, G.; Santurio, J.; Alves, S. *Candida dubliniensis*: Epidemiology and Phenotypic Methods for Identification. *Mycopathologia*. 69:431–443, 2010.

Odds F, Nuffel L, Dams G. Prevalence of *Candida dubliniensis* Isolates in a Yeast Stock Collection. *Journal of Clinical Microbiology*. 36(10): 2869–2873, 1998.

Pasligh J, Radecke C, Fleischhacker M, Ruhnke M. Comparison of Phenotypic Methods for the Identification of *Candida dubliniensis*. *J Microbiol Immunol Infect*. 43(2):147–154, 2010.

Putignani L, Chierico D, Onori M, Mancinelli L, Argentieri M, Bernaschi P, Coltella L, Lucignano B, Pansani L, Ranno S, Russo C, Urbani A, Federici G, Menichella D. MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping of clinically relevant fungi. *Mol. BioSys*. 7: 620–629, 2011.

Ribeiro, P.; Querido, S.; Back-Brito, G.; Mota, A.; Koga-Ito, C.; Jorge, A. Research on *Candida dubliniensis* in a Brazilian yeast collection obtained from cardiac transplant, tuberculosis, and HIV-positive patients, and evaluation of phenotypic tests using agar screening methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 71:81–86, 2011.

Silveira-Gomes F, Sarmiento D, Espírito-Santo E, Souza N, Pinto T, Marques-da-Silva S. Differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* using hypertonic Sabouraud broth and tobacco agar. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 44(4):457-460, 2011

Staib P, Morschäuser J. Liquid growth conditions for abundant chlamydospore formation in *Candida dubliniensis*. *Mycoses*. 48:50-54, 2005.

Artigo 4.6

SENSIBILIDAD DE *Candida albicans* DE HEMOCULTIVOS FRENTE A TRES FÁRMACOS: ESTUDIO RETROSPECTIVO EN RIO GRANDE DO SUL, BRASIL, 1999 A 2009.

Mattei, A.S.; Alves, S.H.; Mario, D.A.; Watte, G.; Severo, C.B.; Guazzelli, L.S.;
Oliveira, F.M.; Severo, L.C.

Aceito para publicação na Revista Iberoamericana de Micologia.

RESUMEN

La candidiasis es una de las micosis más importantes entre las frecuentes infecciones invasivas por hongos en pacientes hospitalizados; por esta razón, el tratamiento antifúngico es un desafío constante. Este estudio evaluó la sensibilidad *in vitro* de aislados clínicos de *C. albicans* procedentes de hemocultivos a fluconazol, de anfotericina B y de anidulafungina; diagnosticados en un hospital del sur de Brasil. Para los estudios de sensibilidad *in vitro* se aprobaron 153 aislados de *C. albicans* frente a los fármacos mencionados, en concordancia con el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Se determinaron las concentraciones inhibitorias y fungicidas mínimas (CMI y CMF, respectivamente) de cada fármaco y el punto de corte epidemiológico (ECV). Todas las cepas fueron susceptibles a anidulafungina, con la CMI y CMF $\leq 1\mu\text{g/mL}$; sin embargo, cuando comparado con el ECV, un 3% de los aislados presentó valores más altos. Con relación al fluconazol, un 96% fue sensible; un 3%, susceptible dosis-dependiente; y un 1%, resistente. Sin embargo, se observó que 21% de los aislados presentó valores mayores que el ECV. Bajo la acción de anfotericina B, una de las cepas fue resistente; y el resto, susceptible, de acuerdo a la CMF; por otro lado, un 1,5% de los aislados presentó valores mayores al ECV. En conclusión, los aislados de *C. albicans* presentaron mayor sensibilidad a anidulafungina y un 90% de estas cepas (CMI₉₀) presentó los menores valores bajo anfotericina B. Basados en el ECV y la nueva clasificación descrita por Pfaller, los aislados podrían ser resistentes a fluconazol, lo que demuestra la importancia de la asociación y revisión de estos parámetros.

Palabras clave: *Candida albicans*, candidemia, anfotericina B, fluconazol, anidulafungina.

ABSTRACT

Candidiasis is one of the most important among recurrent invasive yeast infections in patients, thus antifungal treatment becomes a challenge. The aim of this study was to evaluate *in vitro* activity of clinical *Candida albicans* isolates from blood cultures to fluconazole, amphotericin B and anidulafungin; in a hospital from Rio Grande do Sul, Brazil. Susceptibility in 153 isolates to the three drugs mentioned was tested according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Minimal inhibitory and fungicidal concentrations (MIC, MFC) of each drug were determined, as well as the epidemiological cutoff value (ECV). All of the isolates were susceptible to anidulafungin, MIC and MFC $\leq 1\mu\text{g/mL}$; however, when compared with ECV, 3% of isolates exhibited higher values against fluconazole; 96% were susceptible; 3%, susceptible dose-dependent; and, 1%, resistant. Also, it was observed that 21% of isolates exhibited higher values than ECV. Against amphotericin B, one of the isolates was resistant; the other ones, susceptible, based on the MFC; furthermore, 1,5% of the isolates exhibited higher values. In conclusion, *C. albicans* isolates exhibited more susceptibility to anidulafungin, and 90% of them (MIC₉₀) exhibited the lowest values against amphotericin B. Based on ECV and Pfaller classification, isolates could be resistant to fluconazole, demonstrating the importance of the combination of these parameters.

KEY WORDS: *Candida albicans*, candidemia, amphotericin B, fluconazole, anidulafungin

INTRODUCCIÓN

Las infecciones invasivas por hongos son frecuentes en pacientes hospitalizados a causa de la inmunosupresión, del uso prolongado de antibióticos y/o corticosteroides, de la nutrición parenteral y de los procedimientos invasivos; en consecuencia, una alta tasa de mortalidad es observada [1, 11, 13].

La candidiasis es una micosis cutánea o sistémica, causada por *Candida* spp. y clasificada como el cuarto tipo de infección que afecta al tejido sanguíneo, lo que contribuye con el aumento de la morbilidad, de la mortalidad, de los costos y del tiempo de hospitalización [3, 22].

En las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), las candidemias constituyen un grave problema, debido a que la permanencia prolongada de los pacientes en las mismas trae como consecuencia la colonización por *Candida* spp.; principalmente por *C. albicans* [11]. Recientemente, un estudio realizado en Brasil demostró que *Candida albicans* es la principal especie en episodios de candidemia [4].

La gran mayoría de los aislados clínicos de *C. albicans* es sensible a fluconazol; sin embargo, se puede observar resistencia clínica durante el tratamiento [9, 15, 16, 23]. Anfotericina B es un antifúngico poliénico ampliamente utilizado en la práctica clínica, a pesar su elevada toxicidad [3]. Así, en 2005, una alternativa surgió para el tratamiento y la prevención de la candidiasis: anidulafungina, una de las equinocandinas aprobada por la *United States Food and Drug Administration* (FDA) [14], que ha demostrado ser más eficaz que fluconazol [23].

La anidulafungina se diferencia de las otras equinocandinas en que no se metaboliza en el hígado, su degradación es química, posee un volumen de distribución equivalente al volumen acuoso total corporal y una semivida biológica más larga que sus congéneres. Diversos estudios muestran una excelente actividad *in vitro* de la anidulafungina sobre *Candida* spp. con valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) menores que los obtenidos con caspofungina y micafungina [10, 12, 14].

El objetivo de este estudio fue evaluar la sensibilidad *in vitro* de aislados clínicos de *C. albicans* procedentes de hemocultivos a fluconazol, de anfotericina B y de anidulafungina.

MATERIALES y MÉTODOS

Aislados: Se utilizaron 153 aislados de *C. albicans* procedentes de hemocultivos diagnosticados de 1999 a 2009 en el hospital Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA), Rio Grande do Sul, Brasil. Las muestras fueron identificadas por el método automatizado ID 32C[®] (bioMérieux – Marcy-l'Étoile, Francia) y almacenadas en agua destilada a - 20 °C, hasta el momento de realizar el presente estudio.

Fármacos: Anfotericina B (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), anidulafungina y fluconazol (Pfizer, Inc, New York, NY) fueron obtenidos a través del fabricante, en polvo estandar y preparados de acuerdo con el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) en su documento M27-A3 [5, 6].

Prueba de sensibilidad antifúngica: La prueba de microdilución en caldo se realizó de acuerdo con el CLSI M27-A3, y se utilizó el inóculo con una concentración final de $1,5 \pm 1,0 \times 10^3$ células/mL en medio RPMI-1640, incubado a 35°C durante 24 o 48h. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó por la concentración más baja capaz de producir la disminución de la turbidez en comparación con el control positivo de los fármacos (fluconazol y anidulafungina $\geq 50\%$ y anfotericina B $\geq 90\%$). La concentración mínima fungicida (CMF), realizada para pruebas con anfotericina y anidulafungina, se determinó mediante el subcultivo de 10 μ L de cada pocillo de la microplaca que presentó ausencia de turbidez, para placas que contenían agar Sabouraud y posterior incubación a 35°C durante 48h.

Análisis de los resultados: Se realizó el promedio geométrico de las concentraciones inhibitorias y fungicidas mínimas de cada fármaco, así como la concentración capaz de inhibir un 50 y un 90% de los aislados. Se establecieron puntos de corte clínicos (CBP) de acuerdo con el CLSI [5, 6] para fluconazol (concentraciones $\leq 8\mu\text{g/mL}$ son consideradas susceptibles; de 16 a $32\mu\text{g/mL}$, susceptibles dosis-dependientes; y $\geq 64\mu\text{g/mL}$, resistentes), anidulafungina ($\leq 2\mu\text{g/mL}$ son consideradas sensibles; y $> 2\mu\text{g/mL}$, no sensibles) y anfotericina B ($\leq 1\mu\text{g/mL}$ son consideradas susceptibles y $\geq 2\mu\text{g/mL}$, resistentes). También se evaluó los CBP de acuerdo con Pfaller et al. [15, 17, 19] que describieron que anfotericina B con concentraciones < 1 e $\geq 1\mu\text{g/mL}$ son considerados como susceptibles y resistentes, respectivamente. Con relación a fluconazol, concentraciones $\leq 2\mu\text{g/mL}$ son consideradas susceptibles; $4\mu\text{g/mL}$ susceptibles dosis-dependientes; y $\geq 8\mu\text{g/mL}$, resistentes. Anidulafungina con

concentraciones $\leq 2\mu\text{g/mL}$ son consideradas sensibles; $4\mu\text{g/mL}$ intermediaria y $\geq 8\mu\text{g/mL}$, resistentes. Por otra parte, se obtuvieron los puntos de corte epidemiológicos (ECV) para los fármacos utilizados, de acuerdo con Turnidge et al. [24] que considera la distribución de CMI obtenidos, la moda del CMI de cada una de los fármacos y la variabilidad de la prueba. En general, el ECV es determinado a ser aproximadamente dos diluciones sobre la moda y abarca un 95% de los valores de la distribución de CMI obtenidos. Estos ECV son medidas sensibles para medir aislados emergentes con menor sensibilidad a los mencionados fármacos.

RESULTADOS

El número de aislados de *C. albicans* de hemocultivos obtenidos durante 10 años de estudio (1999 a 2009) y su relación con la sensibilidad de cada fármaco utilizado en este trabajo, de acuerdo con CMI y ECV se describieron en la Tabla 1.

Los valores de las concentraciones inhibitoras y fungicida mínimas de los fármacos: fluconazol, anfotericina B y anidulafungina frente a los aislados de *C. albicans* se describieron en la Tabla 2. Cuando se compararon los resultados de el promedio geométrico de las CMI de los tres fármacos, se pudo observar que el valor más bajo se obtuvo para anidulafungina; sin embargo, el valor más bajo de CMI₉₀ fue observado para anfotericina B, y el valor mayor para fluconazol. Al mismo tiempo, con relación al CMF₉₀, ninguna diferencia entre anfotericina B y anidulafungina se observó. Por otro lado, fluconazol es clasificado como fungistático.

De acuerdo con CLSI [5, 6], todas las cepas fueron susceptibles a anidulafungina, con la CMI y la CMF $\leq 1\mu\text{g/mL}$. No obstante, cuando se comparó con el ECV, un 3% (n=4) de los aislados presentó valores más altos. En relación al fluconazol, un 96% (n=148) fue caracterizado como sensible; un 3% (n=4), como susceptible dosis-dependiente; y un 1% (n=1), como resistente. Asimismo, se observó que un 21% (n=31) de los aislados presentó valores mayores que el ECV. Con relación a anfotericina B, todos los aislados fueron susceptibles; sólo un aislado se caracterizó como resistente, esto con base en la concentración fungicida. Además, 1,5% (n=2) de los aislados presentó valores mayores a los valores de ECV.

Cuando se utilizó la clasificación hecha por Pfaller et al. [15, 17, 19] todas las cepas permanecieron susceptibles a anidulafungina. Con relación a anfotericina B y al fluconazol, hubo cambios en la clasificación de las cepas. La comparación de los

valores obtenidos de los fármacos de acuerdo con Pfaller et al. [15, 17, 19] y CLSI [5, 6] presentaron diferencia estadística en la prueba de chi-cuadrado de Pearson con $p = 0,035$ y se describieron en la tabla 3 ($p = 0,035$).

DISCUSIÓN

El uso de las pruebas de sensibilidad antifúngica *in vitro* tiene como finalidad detectar aislados de *Candida* spp. potencialmente resistentes. De este modo, constituye una ayuda en el tratamiento rápido y eficaz de la candidiasis [14]. El CBP se utiliza para indicar cuáles de los aislados responden comúnmente al tratamiento con la dosis recomendada de cada fármaco, mientras que el ECV se puede utilizar como una medida más sensible para las cepas emergentes con una menor sensibilidad al fármaco utilizado [15] y, de esta manera, la respuesta clínica puede ser diferente de lo esperado.

La mayoría de los aislados (96%) fueron sensibles a fluconazol; sin embargo, cuando se utilizó el ECV, un 21% de los aislados presentó una menor sensibilidad, lo cual no es posible de ser observado por medio del CBP. Un porcentaje similar han observado Pfaller et al. [15]; según los autores, un 15% de los aislados presentó valores de CMI mayor que el ECV; por otro lado, la mayoría de los estudios utiliza el CBP [8, 10, 11, 12], con lo cual se observa resultados similares a los obtenidos en nuestra investigación, que presentó a la mayoría de los aislados como sensible, y a un 5% de los aislados como resistentes al fluconazol.

Sólo un aislado fue resistente a fluconazol y cuando comparado con anidulafungina presentó una CMI de $0,003\mu\text{g/mL}$, una de las más bajas concentraciones, que demostró, así, la alta sensibilidad a esta equinocandina. De esta manera, Pfaller et al. [18] realizaron una prueba con 41 aislados resistentes a fluconazol frente a anidulafungina y observaron una CMI_{90} $0,06\mu\text{g/mL}$, sin que haya ocurrido resistencia cruzada entre los dos fármacos, aunque no se ha confirmado que esta resistencia no exista [14]. Fluconazol, así como todos los azoles, actúa inhibiendo la enzima lanosterol 14- α -desmetilasa del citocromo P450, que convertiría lanosterol en ergosterol, un constituyente de la membrana celular de los hongos. La resistencia observada en nuestro estudio puede haber ocurrido por la cantidad y calidad del lugar de unión de la enzima y/o la reducción del acceso del fármaco a este lugar. Además, existe la posibilidad de mutación del gen que codifica el lugar de unión de la enzima, con lo que disminuye la afinidad a fluconazol, y su sobreexpresión resultaría en la necesidad de

altas concentraciones del fármaco para inhibir la presencia de la enzima en el interior de la célula. Otra posibilidad sería la salida del fármaco por las bombas de eflujo de presentes en el hongo [15, 20].

Con relación a anidulafungina, todos los aislados fueron sensibles de acuerdo con el CBP (Tabla 1), mientras que 3% de estos presentaron una menor sensibilidad a través del ECV. La resistencia a las equinocandinas ha sido relatada en aislados de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* resultante de la mutación en la subunidad Fksp de la enzima β -(1,3)-D-glucano sintasa, sin la necesidad de que ocurra una CMI > 2 μ g/mL en estos aislados [2, 14, 18, 20]. Además, la relación entre la menor sensibilidad *in vitro* de las equinocandinas y la falla clínica no siempre están vinculadas [13].

Varios estudios han tratado de determinar la sensibilidad de los aislados de *Candida* spp. frente a las equinocandinas, y en ellos la mayoría de los valores encontrados fluctuaba de 0,03 a 0,06 μ g/mL [12, 14, 16, 18, 21, 23], lo que está de acuerdo con los resultados de este estudio. Pfaller et al. [14] informaron que un 1,2% de los aislados de *C. albicans* de hemocultivos podrían ser resistentes a anidulafungina cuando se utiliza el ECV, de acuerdo con lo que se observó en este estudio. Por lo tanto, se podría predecir cuáles aislados podrían responder de manera diferente a lo esperado durante el tratamiento.

Todos los aislados fueron sensibles a anfotericina B, mientras que en el CMF sólo un aislado fue resistente de acuerdo con Pfaller et al. [19], lo que está de acuerdo con Boff et al. [3] que demostraron la sensibilidad de *C. albicans* a ese fármaco por la CMI y la CMF. Cuando utilizado el ECV, un 1,5% de los aislados presentó valores mayores. Pfaller et al. [19] describieron valor de ECV más grande (2 μ g/mL) que en nuestro estudio. La resistencia a anfotericina B puede estar asociada con el aumento o disminución de los esteroides de la membrana o, inclusive, por la producción de proteínas y enzimas fúngicas que actuarían en el fármaco [7], lo que puede explicar la falla en el tratamiento.

Pfaller et al. [15, 17, 19] demostraron que hay diferencia en los CBP utilizados por CLSI [5, 6], esto también se observó en nuestro estudio con diferencia estadística (p 0,035) en la tabla 3.

Con estos CBP, que son especie específicos, se puede identificar aislados resistentes y que fueron previamente identificados con el susceptibles, con un resultado satisfactorio en el tratamiento [15, 17]. De esta manera, existe la necesidad de inserción de estos nuevo CBP en lo CLSI.

La mayoría de los estudios sobre la sensibilidad *in vitro* sólo utiliza la CMI y, en comparación con este estudio, los aislados de *C. albicans* serían sensibles a anfotericina B [1, 4, 8, 11, 12]. No obstante, a través de la CMF, un aislado sería resistente, lo que demuestra la importancia de esta evaluación. Cuando comparado el aislado resistente a anfotericina B frente a anidulafungina, se observó que era sensible y presentaba la concentración más baja (0,0015µg/mL). Pfaller et al. [19] y Rambach et al. [22] utilizaron además del CBP, el cálculo del ECV, lo que demostró la importancia del seguimiento de especies con sensibilidad reducida.

Utilizar solamente el valor de CMI elevado para definir la resistencia frente a un fármaco no es suficiente, es necesario tener en cuenta las características de la posible mutación del gen de la resistencia, lo que es posible a través del ECV.

CONCLUSIÓN

Con los resultados de este trabajo se concluyó que los aislados de *C. albicans* presentan mayor sensibilidad a anidulafungina; sin embargo, los valores más bajos obtenidos en el 90% de los aislados (CMI₉₀) se deben a la acción de anfotericina B. Asimismo, a través del ECV y la nueva clasificación descrita por Pfaller, los aislados podrían ser resistentes a fluconazol, lo que demuestra la importancia de la asociación y revisión de estos parámetros.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Pfizer Inc. por la donación de los fármacos utilizados en este estudio y a la Coordinación de Perfeccionamiento de Personal de Nivel Superior (CAPES) por la beca de doctorado del primer autor.

DECLARACIÓN DE LOS AUTORES

Los autores declaran que no hay conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Antunes A, Pasqualotto A, Diaz M, D'Azevedo P, Severo L. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* 2004; 46(Suppl. 5):239-241.
2. Arendrup M, Garcia-Effron G, Lass-Flörl C, Lopez A, Rodriguez-Tudela J, Cuenca-Estrella M, Perlin D. Echinocandin susceptibility testing of *Candida* species: comparison of EUCAST EDef 7.1, CLSI M27-A3, Etest, Disk Diffusion, and Agar Dilution Methods with RPMI and Isosensitest Media. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54(Suppl. 1):426-429.
3. Boff E, Lopes P, Spader T, Scheid L, Loreto E, Dal Forno N, Aquino V, Severo L, Santurio J, Alves S. Reavaliação da suscetibilidade de *Candida* à anfotericina B: estudo comparativo com isolados de três hospitais do Estado do Rio Grande do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2008; 41(Suppl. 1):36-40.
4. Bonfietti L, Szeszs M, Chang M, Martins M, Pukinskas S, Nunes M, Pereira G, Paniago A, Purisco S, Melhem M. Ten-Year Study of Species Distribution and Antifungal Susceptibilities of *Candida* bloodstream Isolates at a Brazilian Tertiary Hospital. *Mycopathologia.* 2012; in print
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing yeasts. Approved standard M27-A3, 3rd ed., CLSI, Wayne. 2008; 25 pp.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing yeasts. Approved standard M27-S3, 3rd ed., CLSI, Wayne. 2008; 19 pp.
7. Filippin F, Souza L. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2006; 42(Suppl. 2): 167-194.
8. Godoy P, Tiraboschi I, Severo L, Bustamante B, Calvo B, Almeida L, Matta D, Colombo A. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. Bloodstream isolates from Latin American Hospitals. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003; 98(Suppl. 3): 401-405.
9. Hazen K, Baron E, Colombo A, Girmenia C, Sanchez-Sousa A, Palacio A, Bedout C, Gibbs D, The Global Antifungal Surveillance Group. Comparison of the Susceptibilities of *Candida* spp. to Fluconazole and Voriconazole in a 4-Year Global Evaluation Using Disk Diffusion. *Journal of Clinical Microbiology.* 2003; 41(Suppl. 12): 5623–5632.

10. Labbé A, Pépin J, Patiño C, Castonguay S, Restieri C, Laverdiere M. A single-centre 10-year experience with *Candida* bloodstream infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2009; 20(Suppl. 2): 45-50.
11. Matta D, Almeida L, Machado A, Azevedo A, Kusano E, Travassos N, Salomão R, Colombo A. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2007; 57: 399-404.
12. Ostrosky-Zeichner L, Rex J, Pappas P, Hamill R, Larsen R, Horowitz H, Powderly W, Hyslop N, Kauffman C, Cleary J, Mangino J, Lee J. Antifungal Susceptibility Survey of 2,000 Bloodstream *Candida* Isolates in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2003; 47(Suppl. 10): 3149–3154.
13. Perlin D. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resistance Updates.* 2007; 10:121-130.
14. Pfaller M, Boyken L, Hollis L, Kroeger J, Messer S, Tendolkar S, Diekema D. Use of epidemiological cutoff values to examine 9-year trends in susceptibility of *Candida* species to anidulafungin, caspofungin and micafungin. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49 (Suppl. 2):624-629.
15. Pfaller M, Andes D, Diekema D, Espinel-Ingroff A, Sheehan D. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: Time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resistance Updates.* 2010; 13: 180-195.
16. Pfaller M, Castanheira M, Diekema D, Messer S, Moet G, Jones R. Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Etest Methods with the CLSI Broth Microdilution Method for Echinocandin Susceptibility Testing of *Candida* Species. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(5):1592-1599.
17. Pfaller M, Diekema D, Andes D, Arendrup M, Brown S, Lockhart S, Motyl M, Perlin D, CLSI Subcommittee for Antifungal Testing. Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. *Drug Resist Updat.* 2011; 14(3):164-76.
18. Pfaller M, Diekema D, Ostrosky-Zeichner L, Rex J, Alexander B, Andes D, Brown S, Chaturvedi V, Ghannoum M, Knapp C, Sheehan D, Walsh T. Correlation of MIC with Outcome for *Candida* Species Tested against Caspofungin, Anidulafungin, and

- Micafungin: Analysis and Proposal for Interpretive MIC Breakpoints. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(Suppl. 8):2620-2629.
19. Pfaller M, Espinel-Ingroff A, Canton E, Castanheira M, Cuenca-Estrella M, Diekema D, Forthergill A, Fuller J, Ghannoum M, Jones R, Lockhart S, Martin-Mazuelos E, Ostrosky-Zeichner L, Pappas T, Pelaez T, Peman J, Rex J, Szeszs S. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B, flucytosine and itraconazole and *Candida* spp. As determined by CLSI broth microdilution. *Journal Clinical of Microbiology.* 2012; 50(Suppl. 6): 2040-2046.
20. Pfaller M. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. *The American Journal of Medicine.* 2012; in print.
21. Pfaller M, Boyken L, Hollis R, Messer S, Tendolkar S, Diekema D. In Vitro Activities of Anidulafungin against More than 2,500 Clinical Isolates of *Candida* spp., Including 315 Isolates Resistant to Fluconazole. *Journal of Clinical Microbiology.* 2005; 43(Suppl. 11): 5425–5427.
22. Rambach G, Oberhauser H, Speth C, Lass-Flörl C. Susceptibility of *Candida* species and various moulds to antimycotic drugs: use of epidemiological cutoff values according to EUCAST and CLSI in an 8-year survey. *Medical Mycology.* 2011; 49(Suppl. 8): 856-863.
23. Reboli A, Shorr A, Rotstein C, Pappas P, Kett D, Schlamm H, Reisman A, Biswas P, Walsh T. Anidulafungin compared with fluconazole for treatment of candidemia and other forms of invasive candidiasis caused by *Candida albicans*: a multivariate analysis of factors associated with improved outcome. *BMC Infectious Diseases.* 2011; 11(Suppl. 261):1-8.
24. Turnidge J, Kahlmeter G, Kronvall G. Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. *Clinical Microbiology and Infection.* 2006; 12(Suppl. 5): 418-425.

Tabla 1. Sensibilidad de *Candida albicans* de hemocultivos, frente la anfotericina B, anidulafungina y fluconazol, en el periodo de 1999 a 2009.

FÁRMACOS (ECV ug/mL)	Año	n	CMI (ug/mL)	
			Oscilación	Moda
Anfotericina B (1 ug/mL)	1999	2	0,015 – 0,03	-
	2000	4	0,125 – 0,25	0,125
	2001	3	0,03 – 0,125	0,03
	2002	6	0,03 – 0,25	0,125
	2003	3	0,03 – 0,125	0,03
	2004	1	0,25	-
	2005	20	0,003 – 0,25	0,03
	2006	42	0,015 – 0,5	0,06
	2007	25	0,003 – 0,25	0,03
	2008	22	0,03 – 0,25	0,06
	2009	25	0,03 – 0,25	0,06
Anidulafungina (1 ug/mL)	1999	2	0,003	-
	2000	4	0,003 – 0,06	0,015
	2001	3	0,03 – 0,125	0,03
	2002	6	0,003 – 0,125	0,007
	2003	3	0,03 – 0,125	0,03
	2004	1	0,003	-
	2005	20	0,0015 – 0,06	0,003
	2006	42	0,0015 – 0,5	0,003
	2007	25	0,003 – 0,25	0,015
	2008	22	0,003 – 0,25	0,125
	2009	25	0,003 – 0,125	0,06
Fluconazol (1 ug/mL)	1999	2	0,125 – 0,25	-
	2000	4	0,125 – 0,5	0,25
	2001	3	0,125 – 0,25	0,125
	2002	6	0,25 – 4	0,5
	2003	3	0,25 – 0,5	0,25
	2004	1	0,5	-
	2005	20	0,125 – 64	0,25
	2006	42	0,125 – 16	0,125
	2007	25	0,125 – 8	0,125
	2008	22	0,125 – 2	0,125
	2009	25	0,125 – 8	0,125

CMI: Concentración mínima inhibitoria, ECV: Puntos de corte epidemiológicos

Tabla 2. Sensibilidad ($\mu\text{g/mL}$) *in vitro* de 153 aislamientos de *Candida albicans* frente a la anfotericina B, anidulafungina y fluconazol.

FÁRMACO	CMI ($\mu\text{g/mL}$)				CMF ($\mu\text{g/mL}$)			
	M.G	Oscilación	CMI ₅₀	CMI ₉₀	M.G	Oscilación	CMF ₅₀	CMF ₉₀
Fluconazol	0,4	0,125 a 64	0,25	2	—	—	—	—
Anfotericina B	0,06	0,003 a 0,5	0,06	0,03	0,12	0,003 a 2	0,125	0,25
Anidulafungina	0,017	0,0015 a 0,5	0,015	0,125	0,05	0,0015 a 1	0,06	0,25

M.G: Promedio geométrico, CMI: Concentración mínima inhibitoria, CMF: Concentración mínima fungicida, —: Prueba no se realizó debido a que el fluconazole es clasificado con fungistático.

Tabla 3. Comparación de los valores obtenidos de los fármacos de acuerdo con Pfaller et al. (A) y CLSI (B) clasificados con susceptibles, intermediario o susceptible dosis-dependiente y resistentes

Fármacos	Susceptible (n)		Intermediario/ SSD (n)		Resistente (n)	
	A	B	A	B	A	B
	Fluconazol	141	148	3	4	9
Anidulafungina	153	153	0	0	0	0
Anfotericina B	151	152	-	-	2	1

SSD: Susceptible dosis-dependiente, A: Pfaller et al. [15, 17, 19], B: CLSI [5, 6], - : no hay la clasificación, (p 0,035)

5 DISCUSSÃO

Nos últimos 10 anos, vários estudos descreveram sobre a epidemiologia da candidemia, demonstrando a importância desta fungemia em pacientes criticamente enfermos (VIUDES *et al.*, 2002; PASQUALOTTO *et al.*, 2005; COLOMBO *et al.*, 2006; BERGAMASCO *et al.*, 2012; YAMAMOTO *et al.*, 2012; DIEKEMA *et al.*, 2012).

Outras espécies não albicans estão sendo diagnosticadas como agentes causadores da candidemia, porém a *C. albicans* continua sendo a espécie de maior prevalência, justificando a necessidade de estudos mais aprofundados sobre essa levedura. Assim, em nosso estudo, 38% dos casos revisados de candidemia foram identificados como *Candida albicans*, concordando com Colombo *et al.* (2006) que realizou estudo no Brasil e Diekema *et al.* (2012), nos Estados Unidos da América (EUA).

Os fatores associados que contribuem para o desenvolvimento da candidemia são bem conhecidos (PASQUALOTTO *et al.*, 2005; COLOMBO *et al.*, 2006; YAMAMOTO *et al.*, 2012; PFALLER *et al.*, 2012), de modo que, os resultados observados nesse estudo retrospectivo do sul do Brasil estão de acordo com os dados já descritos.

Constatamos que, a possibilidade de ocorrência de candidemia em pacientes oncológicos foi 2,4 vezes maior. Além disso, de 20 a 55% dos casos de candidemia estão relacionados ao câncer (TORTORANO *et al.*, 2004; Almirante *et al.*, 2005) e com predominância da espécie *C. albicans* (BERGAMASCO *et al.*, 2012). Entretanto, Diekema *et al.* (2012) descreveu que nos EUA, poucos casos de candidemia ocorreram em pacientes oncológicos

Em relação aos isolados leveduriformes utilizados neste estudo, são microorganismos facilmente cultivados, provenientes do sangue e estocados, porém alguns métodos de manutenção resultam em baixos níveis de sobrevivência e instabilidade das suas propriedades fisiológicas e bioquímicas (SILVA *et al.*, 2008).

A sobrevivência das leveduras em micoteca depende da temperatura e período de armazenamento, sendo que o estoque em freezer a - 20°C proporciona a viabilidade por quatro a cinco anos, através da redução do metabolismo celular até o nível de dormência artificial e além de anular o risco de contaminação por ácaros (SILVA *et al.*, 2008). Porém, a formação de cristais de gelo poderia interferir na viabilidade (NERY *et al.*,

2001; SPANAMBERG *et al.*, 2008). A formação de cristais poderia ser a causa da baixa taxa de recuperação das leveduras nesse estudo (68,4%). Uma alternativa seria a adição de glicerol, um crioprotetor, no qual a sua eficiência foi demonstrada por Silva *et al.* (2008), com recuperação de 90% das leveduras estocadas durante três e quatro anos.

Os fatores de virulência da espécie *C. albicans* são bastante estudados incluindo a formação de pseudo e hifas, diversidade fenotípica, fatores de adesão celular e produção de exoenzimas hidrolíticas; como fosfolipases e proteinases (MOHAN; BALLAL, 2008; SCHEID *et al.*, 2010).

A espécie *C. albicans* apresenta a capacidade de crescer tanto na forma leveduriforme quanto na forma micelial em resposta a diferentes fatores ambientais. *In vivo* nos tecidos infectados, o micélio formado pode ser um importante fator de virulência, auxiliando a aderência do micro-organismo em tecidos epiteliais. *In vitro*, a formação do TG ocorre a partir da célula leveduriforme e pode transformar-se na forma micelial (KIM *et al.*, 2002).

O TG é uma alternativa simples e barata em comparação com outras técnicas de diagnóstico rápido e pode ser utilizado em laboratórios que tentam trabalhar economicamente (HOPPE; FREY, 1999; HILMIOGLU *et al.*, 2007). O método clássico que utiliza soro humano possui sensibilidade entre 91 a 100% e especificidade de 95 a 100%, amplamente utilizado há muitos anos em laboratórios (HILMIOGLU *et al.*, 2007), nossos resultados estão de acordo com estes parâmetros.

Em nosso estudo, a formação do TG através do ágar MH foi facilmente observada e já havia sido descrita por Rimek *et al.* (2009), apontando a possibilidade da utilização do caldo MH, sendo uma vantagem a fácil diferenciação da presença ou ausência da constrição entre a extensão e o blastoconídio.

Os estudos sobre a atividade das exoenzimas são frequentes em isolados de *Candida* spp. provenientes de mucosas (VIDOTTO *et al.*, 1999; GHANNOUM, 2000; KANTARCIOGLU; YUCEL, 2002; VIDOTTO *et al.*, 2004; OMBRELLA *et al.*, 2008; MARCOS-ARIAS *et al.*, 2009; Scheid *et al.*, 2010; D'EÇA *et al.*, 2011), enquanto que, em isolados de hemocultivos são escassos (VIDOTTO *et al.*, 1999; MOHAN; BALLAL, 2008). Acredita-se que a virulência de isolados de *Candida* spp. seja a combinação de diversos fatores que contribuem para a patogenicidade da espécie, além do sítio anatômico colonizado (VIDOTTO *et al.*, 1999).

Em nosso estudo, observamos que em 78% e 97% dos isolados apresentaram atividade da fosfolipase e proteinase, respectivamente. Mohan & Ballal (2008)

encontraram porcentagem semelhante em relação a fosfolipase, entretanto, a atividade da proteinase foi de 44%, podendo sugerir que os nossos isolados seriam mais virulentos quando comparados.

Os isolados de *C. albicans* de hemocultivos produziram as exoenzimas fosfolipase e proteinase. Em geral, altos níveis dessas enzimas são produzidos por isolados provenientes de urina e mucosa (GHANNOUM, 2000; KANTARCIOGLU; YUCEL, 2002).

A diferenciação de *Candida albicans* de *C. dubliniensis* é uma necessidade contínua, tanto para auxiliar o tratamento da micose quanto para aspecto epidemiológico. Desse modo, vários testes fenotípicos têm sido propostos, com alta sensibilidade e especificidade (ALVES *et al.*, 2002; STAIB; MORSCHÄUSER, 2005; AKGÜL; ÇERIKÇIOGLU, 2009; ELLS *et al.*, 2009; PASLIGH *et al.*, 2010; LORETO *et al.*, 2010; SILVEIRA-GOMES *et al.*, 2011; CHOWDHARY *et al.*, 2011; BADER *et al.*, 2011; BILLE *et al.*, 2012).

A incidência de *C. dubliniensis* em infecções sistêmicas é baixa, aproximadamente 2% dos casos de candidemia (FERNANDEZ *et al.*, 2010), e sua prevalência também representa este mesmo percentual em micotecas com cepas estocadas e identificadas como *C. albicans* (MÄHNB *et al.*, 2005). Nesse sentido, foi documentando a prevalência dessa espécie, em hospitais do Kuwait, em 67% das amostras respiratórias, 12% em cavidade oral, 9% na urina, 4% em hemocultivos, 3% em amostras da mucosa vaginal e 6% de outros sítios anatômicos (Khan *et al.*, 2012).

Quando utilizou-se os testes fenotípicos para a diferenciação houve discordância entre os testes, sendo que a maioria identificou os isolados como *C. albicans*. O teste genotípico também identificou os isolados como *C. albicans*. Esses testes fenotípicos podem identificar falsos positivos, pois muitas cepas de *C. albicans* possuem a habilidade em se parecer com *C. dubliniensis*, dificultando o diagnóstico e o tratamento (MÄHNB *et al.*, 2005). Além disso, sabe-se que isolados de *C. albicans* armazenados por períodos longos podem produzir mudanças morfológicas e enzimáticas, assim, esse fenômeno é conhecido como mudança fenotípica (*phenotypic switching*), sendo espontâneo, reversível e frequentemente observado (SILVEIRA-GOMES *et al.*, 2011).

A diferenciação definitiva dessas duas espécies continua ocorrendo através do teste genotípico. Além disso, as sequências obtidas podem ser comparadas e auxiliariam no entendimento dos aspectos de virulência, resistência a antifúngicos e mecanismos de adesão do gênero *Candida* (ELLS *et al.*, 2009; LORETO *et al.*, 2010).

Os testes de suscetibilidade antifúngica *in vitro* têm a finalidade de detectar isolados de *Candida* spp. potencialmente resistentes, auxiliando no tratamento eficaz e rápido da candidose (PFALLER *et al.*, 2011).

A maioria dos isolados (96%) foram sensíveis ao fluconazol, entretanto, quando utilizado o ECV, 21% apresentaram suscetibilidade diminuída, sendo que isso não seria possível constatar através do CBP. Um percentual semelhante já foi observado por Pfaller *et al.* (2010), porém, a maioria dos estudos utilizam o CBP (GODOY *et al.*, 2003; OSTROSKY-ZEICHNER *et al.*, 2003; MATTA *et al.*, 2007; LABBÉ *et al.*, 2009), com resultados semelhantes a nossa pesquisa, sendo a maioria sensível e 5% dos isolados resistentes ao fluconazol.

Em relação a anidulafungina, todos os isolados foram sensíveis, enquanto 3% desses apresentaram sensibilidade diminuída através do ECV. A resistência as equinocandinas já foi relatada em isolados de *C. albicans* e espécies não-*albicans*, decorrente da mutação da subunidade *Fksp* da enzima β -1, 3-D-glucana sintase, não necessitando que ocorra CIM $>2\mu\text{g/mL}$ nesses isolados (PFALLER *et al.*, 2008; ARENDRUP *et al.*, 2010; PFALLER *et al.*, 2011; PFALLER, 2012).

Todas as cepas estudadas foram sensíveis a anfotericina B através da CIM, enquanto que, na CFM, apenas uma cepa foi resistente. Esses resultados concordam com Boff *et al.* (2008), que demonstrou a sensibilidade de *C. albicans* a esse fármaco através da CIM e CFM. Utilizando o ECV, 1,5% dos isolados apresentaram valores superiores. A resistência poderia estar associada à diminuição ou aumento dos esteróis da membrana ou ainda, pela produção de proteínas e enzimas do fungo que agiriam neste fármaco (FILIPPIN; SOUZA, 2006), explicando a falha do tratamento.

Pfaller *et al.* (2010; 2011; 2012) demonstraram que existe diferença entre os valores CBP utilizados pelo CLSI (2008 a, b), isto também foi observado em nosso estudo com diferença estatística ($p < 0,035$).

Com estes novos CBP, que são espécie-específicos, podemos identificar isolados resistentes e que foram previamente identificados como sensíveis aos fármacos testados, obtendo um resultado satisfatório no tratamento (PFALLER *et al.*, 2010; PFALLER *et al.*, 2011). Dessa maneira, existe a necessidade de inserir esses novos CBP no CLSI.

Utilizando apenas o valor CIM elevada para definir a resistência a um fármaco é um dado insuficiente, precisa-se levar em consideração as características de possível mutação do gene de resistência, sendo possível através do ECV.

O presente estudo apresenta algumas limitações, pois foi realizado de forma retrospectiva, perdemos algumas informações que poderiam interferir nas variáveis estudadas. Além disso, utilizou-se apenas um hospital, mesmo sendo este de referência e receber pacientes de todo estado do Rio Grande do Sul. E ainda, reforçamos a necessidade de uma vigilância epidemiológica contínua para acompanharmos as possíveis mudanças dessa micose.

6 CONCLUSÃO

Os casos de candidemia por *Candida albicans* diagnosticados durante 10 anos ocorreram com maior frequência em pacientes adultos e com presença de cateteres. Observamos que houve maior chance de ocorrência desta em pacientes oncológicos. O percentual de alta dos pacientes foi baixo. E a maioria dos isolados foi sensível aos três fármacos utilizados,

O método utilizado para a conservação de leveduras nesse estudo apresentou taxa de viabilidade de 70%, além de ocupar pouco espaço, é facilmente realizado e possui baixo custo,

O ágar e o caldo Mueller-Hinton podem ser utilizados na prova do tubo germinativo, com sensibilidade e especificidade altas, sendo substratos alternativos na rotina laboratorial,

Os isolados de *Candida albicans* provenientes de hemocultivos possuem fatores de virulência, como enzimas hidrolíticas (fosfolipase e proteinase),

A espécie de *Candida dubliniensis* não foi identificada em isolados de hemocultivos, concluindo que todos os casos de candidemia diagnosticados foram causados por *C. albicans*. Os testes fenotípicos MALDI-TOF MS, ágar fubá, caldo niger e caldo hipertônico concordaram com o teste genotípico,

Os isolados de *Candida albicans* apresentaram maior suscetibilidade a anidulafungina, entretanto, os menores valores obtidos em 90% dos isolados (CIM₉₀) foram através da anfotericina B. E através do ECV, os isolados poderiam ser resistentes ao fluconazol, demonstrando a importância da associação desses dois parâmetros.

7 PERSPECTIVAS

A candidemia é um importante problema em hospitais terciários, sendo que o desenvolvimento desta fungemia em pacientes hospitalizados pode aumentar a média de internação hospitalar e eleva a mortalidade, como foi comprovado nesse estudo. A sua epidemiologia varia de acordo com a situação geográfica do paciente. Desse modo, o diagnóstico definitivo e a escolha do tratamento correto são indispensáveis para a alta hospitalar.

Com esses resultados espera-se que sejam realizados, em laboratórios de micologia, testes que diferenciem as duas espécies de *Candida*, bem como os testes de suscetibilidade antifúngica. Em relação ao método de conservação de leveduras, deve-se adicionar um crioprotetor.

Além disso, o constante estudo epidemiológico sobre a candidemia deve continuar sendo realizado, com a finalidade de controlar as possíveis mudanças nos fatores associados no desenvolvimento dessa micose.

REFERÊNCIAS

AKGUL, Ö.; CERIKCIOGLU, N. Hypertonic Sabouraud Dextrose Agar as a Substrate for Differentiation of *Candida dubliniensis*. **Mycopathologia**, v. 167, p. 357–359, 2009.

ALMIRANTE, B; RODRIGUEZ, D; PARK, B; CUENCA-ESTRELLA, M; PLANES, A; ALMELA, M; MENSA, J; SANCHEZ, F; AYATS, J; GIMENEZ, M; SABALLS, P; FRIDKIN, S; MORGAN, J; RODRIGUEZ-TUDELA, J; WARNOCK, D; PAHISSA A; BARCELONA CANDIDEMIA PROJECT STUDY GROUP. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **J Clin Microbiol**. v. 43, p. 1829–35, 2005.

ALTMAN, D. **Practical statistics for medical research**. London: Chapman & Hall; 1991. 611 pp.

ALVES, S; MILAN, E; SANT'ANA, P; OLIVEIRA, L; SANTURIO, J; COLOMBO, A. Hypertonic sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 43, p. 85–86, 2002.

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

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

ARENDRUP, M; GARCIA-EFFRON, G; LASS-FLÖRL, C; LOPEZ, A; RODRIGUEZ-TUDELA, J; CUENCA-ESTRELLA, M; PERLIN, D. Echinocandin susceptibility testing of *Candida* species: comparison of EUCAST EDef 7.1, CLSI M27-A3, Etest, Disk Diffusion, and Agar Dilution Methods with RPMI and Isosensitest Media. **Antimicrob. Agents Chemother**. v. 54, n. 1, p. 426-429, 2010.

BADER, O; WEIG, M; TAVERNE-GHADWAL, L; LUGERT, R; GROB, U; KUHNS, M. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clin Microbiol Infect**. v. 17, p. 1359–1365, 2011.

BARBERINO, M; SILVA, N; REBOUCAS, C; BARREIRO, K; ALCANTARA, A; NETTO, E; ALBUQUERQUE, L; BRITES, C. Evaluation of blood stream infections by *Candida* in three tertiary hospitals in Salvador, Brazil: a case-control study. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 10, p. 36-40, 2006.

BERGAMASCO, M; GARNICA, M; COLOMBO, A; NUCCI, M. Epidemiology of candidemia in patients with hematologic malignancies and solid tumours in Brazil. **Mycoses**. 2012. doi:10.1111/myc.12013

BILLE, E; DAUPHIN, B; LETO, J; BOUGNOUX, M; BERETTI, J; LOTZ, A; SUAREZ, S; MEYER, J; JOIN-LAMBERT, O; DESCAMPS, P; GRALL, N; MORY, F; DUBREUIL, L; BERCHE, P; NASSIF, X; FERRONI, A. MALDI-TOF MS Andromas strategy for the routine identification of bacteria, mycobacteria, yeasts, *Aspergillus* spp. and positive blood cultures. **Clin Microbiol Infect**. v. 18, p. 1117–1125, 2012.

BOFF, E; LOPES, P; SPADER, T; SCHEID, L; LORETO, E; DAL FORNO, N; AQUINO, V; SEVERO, L; SANTURIO, J; ALVES, S. Reavaliação da suscetibilidade de *Candida* à anfotericina B: estudo comparativo com isolados de três hospitais do Estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 41, n. 1, p. 36-40, 2008.

CHOWDHARY, A; RANDHAWA, H; KOWSHIK, T; KATHURIA, S; ROY, P; BRANDT, M. Application of hypertonic Sabouraud glucose agar for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 69, p. 440–442, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). M27 - A3. Reference Method for broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of yeast. Approved Standard, 3rd ed. v. 28, n. 14, p. 1-25, 2008a.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). M27 - S3. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing yeasts. Approved Standard, 3rd ed., Wayne. 19 pp., 2008b.

COLOMBO, A; GUIMARAES, T; SILVA, L; MONFARDINI, L; CUNHA, A; RADY, P; ALVES, T; ROSAS, R. Prospective observational study of candidemia in Sao Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infect ion Control and Hospital Epidemiology**. v. 28, p. 570-576, 2007.

COLOMBO, A; NUCCI, M; PARK, B; NOUER, S; ARTHINGTON-SKAGGS, B; DA MATTA, D; WARNOCK, D; MORGAN, J; Brazilian Network Candidemia Study. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia

in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 44, p. 2816-2823, 2006.

D'EÇA JÚNIOR, A; SILVA, A; ROSA, F; MONTEIRO, S; FIGUEIREDO, P; MONTEIRO, C. *In vitro* differential activity of phospholipases and acid proteinases of clinical isolates of *Candida*. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 44, n. 3, p. 334-338, 2011.

DIEKEMA, D; ARBEFEVILLE, S; BOYKEN, L; KROEGER, J; PFALLER, M. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 73, p. 45-48, 2012.

ELLS, R; KOCK, J; POHL, C. *Candida albicans* or *Candida dubliniensis*? **Mycoses**. v. 54, p. 1-16, 2009.

FERNANDEZ, A; JEWUCHOWICZ, V; MALZONE, M; LOPEZ-DANERI, G; SAA, G; IOVANNITTI, C; TOKUMOTO, M; MUJICA, M. Phenotypic and genotypic characterization of *Candida dubliniensis* isolate in a patient with disseminated candidiasis. **Mycoses**. v. 54, p. e602-e605, 2010.

FILIPPIN, F; SOUZA, L. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 42, n. 2, p. 167-194, 2006.

GHANNOUM M. Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis. **Clin. Microbiol. Rev**. v. 13, n. 1, p. 122-143, 2000.

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

GOLDANI, L; MARIO, P. *Candida tropicalis* fungemia in a tertiary care hospital. **Journal of Infectology**. v. 46, p. 155-160, 2003.

HILMIOGLU, S; ILKIT, M; BADAĞ, Z. Comparison of 12 liquid media for germ tube production of *Candida albicans* and *C. tropicalis*. **Mycoses**. v. 50, p. 282-285, 2007.

HOPPE, J; FREY, P. Evaluation of Six Commercial Tests and the Germ-Tube Test for Presumptive Identification of *Candida albicans*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. v. 18, p. 188-191, 1999.

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

KIM, D; SHIN, W; LEE, K; KIM, K; PARK, J; KOH, C. Rapid differentiation of *Candida albicans* from other *Candida* species using its unique germ tube formation at 39°C. **Yeast**. v. 19, p. 957–962, 2002.

KONTOYIANNIS, D; BODEY, G. Invasive aspergillosis in 2002: an update. **European Journal of Clinical Microbiology and Infection Diseases**. v. 21, p. 161-172, 2002.

LABBÉ, A; PÉPIN, J; PATIÑO, C; CASTONGUAY, S; RESTIERI, C; LAVERDIERE, M. A single-centre 10-year experience with *Candida* bloodstream infections. **Can J Infect Dis Med Microbiol**. v. 20, n. 2, p. 45-50, 2009.

LORETO, E; SCHEID, L; NOGUEIRA, C; ZENI, G; SANTURIO, J; ALVES, S. *Candida dubliniensis*: Epidemiology and Phenotypic Methods for Identification. **Mycopathologia**. v. 69, p. 431–443, 2010.

MÄHNB, B; STEHR, F; SCHÄFER, W; NEUBER, K. Comparison of standard phenotypic assays with a PCR method to discriminate *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. **Mycoses**. v. 48, p. 55–61, 2008.

MALUCHE, ME; SANTOS, JI. *Candida* sp. e infecções hospitalares: aspectos epidemiológicos e laboratoriais. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, n. 1, p. 65-67, 2008.

MARCOS-ARIAS, C; ERAS, E; MADARIAGA, L; AGUIRRE, J; QUINDÓS, G. Phospholipase and proteinase activities of *Candida* isolates from denture wearers. **Mycoses**. v. 54, p. e10–e16, 2009.

MATTA, D; ALMEIDA, L; MACHADO, A; AZEVEDO, A; KUSANO, E; TRAVASSOS, N; SALOMÃO, R; COLOMBO, A. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. 57: 399-404, 2007.

MEDRANO, D; BRILHANTE, R; CORDEIRO, R; ROCHA, M; RABENHORST, S; SIDRIM, J. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida*

parapsilosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 48, p. 17-20, 2006.

MIMICA, L; UEDA, S; MARTINO, D; NAVARINI, A; MARTINI, I. Diagnóstico de infecção por *Candida*: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 45, n. 1, p. 17-23, 2009.

MOHAN, V; BALLAL, M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. **Rev Iberoam Micol**. v. 25, p. 208-210, 2008.

NERY, A; MELHEM, M; GOMES, A. Manutenção da levedura *Cryptococcus* sp. por congelamento. **Laes & Haes**. v. 129, p. 194-198, 2001.

NONAKA, C; NASCIMENTO, G; GOULART FILHO, J; LIMA, K; MILAN, E. *Candida dubliniensis* – levedura emergente associada à candidose oral. **Revista de Odontologia da UNESP**. v. 37, n. 2, p. 125-132, 2008.

O'DONNELL, K. *Fusarium* and its near relatives. In: REYNOLDS, D; TAYLOR, J. **The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics**. CAB International, Wallingford, UK, p. 225–233, 1993.

OMBRELLA, A; RACCA, L; RAMOS, L. Actividades proteinasa y fosfolipasa de aislamientos de *Candida albicans* provenientes de secreciones vaginales con distintos valores de pH. **Rev Iberoam Micol**. v. 25, p. 12-16, 2008.

OSTROSKY-ZEICHNER, L; REX, J; PAPPAS, P; HAMILL, R; LARSEN, R; HOROWITZ, H; POWDERLY, W; HYSLOP, N; KAUFFMAN, C; CLEARY, J; MANGINO, J; LEE, J. Antifungal Susceptibility Survey of 2,000 Bloodstream *Candida* Isolates in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 47, n. 10, p. 3149–3154, 2003.

PASLIGH, J; RADECKE, C; FLEISCHHACKER, M; RUHNKE, M. Comparison of Phenotypic Methods for the Identification of *Candida dubliniensis*. **J Microbiol Immunol Infect**. v. 43, n. 2, p. 147–154, 2010.

PASQUALOTTO, A; DE MORAES, A; ZANINI, R; SEVERO, LC. Analysis of independent risk factors for death among pediatric patients with candidemia and a central venous catheter in place. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. v. 28, p. 799-804, 2007.

PASSOS, X; COSTA, C; ARAUJO, C; NASCIMENTO, E; SOUZA, L; ODE, F; SALES, W; SILVA, M. Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* spp. bloodstream isolates from a Brazilian tertiary care hospital. **Mycopathologia**. v. 163, p. 145-151, 2007.

PFALLER, M.; DIEKEMA, D. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 20, n. 1, p. 133–163, 2007.

PFALLER, M; ANDES, D; DIEKEMA, D; ESPINEL-INGROFF, A; SHEEHAN, D. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: Time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. **Drug Resistance Updates**. v. 13, p. 180-195, 2010.

PFALLER, M; BOYKEN, L; HOLLIS, L; KROEGER, J; MESSER, S; TENDOLKAR, S; DIEKEMA, D. Use of epidemiological cutoff values to examine 9-year trends in susceptibility of *Candida* species to anidulafungin, caspofungin and micafungin. **J. Clin. Microbiol.** v. 49, n. 2, p. 624-629, 2012.

PFALLER, M; DIEKEMA, D; OSTROSKY-ZEICHNER, L; REX, J; ALEXANDER, B; ANDES, D; BROWN, S; CHATURVEDI, V; GHANNOUM, M; KNAPP, C; SHEEHAN, D; WALSH, T. Correlation of MIC with Outcome for *Candida* Species Tested against Caspofungin, Anidulafungin, and Micafungin: Analysis and Proposal for Interpretive MIC Breakpoints. **J. Clin. Microbiol.** v. 46, n. 8, p. 2620-2629, 2008.

PFALLER, M; ESPINEL-INGROFF, A; CANTON, E; CASTANHEIRA, M; CUENCA-ESTRELLA, M; DIEKEMA, D; FORTHERGILL, A; FULLER, J; GHANNOUM, M; JONES, R; LOCKHART, S; MARTIN-MAZUELOS, E; OSTROSKY-ZEICHNER, L; PAPPAS, T; PELAEZ, T; PAMAN, J; REX, J; SZESZS, S. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B, flucytosine and itraconazole and *Candida* spp. ss determined by CLSI broth microdilution. **Journal Clinical of Microbiology**. v. 50, n. 6, p. 2040-2046, 2012.

PFALLER, P; NEOFYTOS, D; DIEKEMA, D; AZIE, N; MEIER-KRIESCHE, H; QUAN, S; HORN, D. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004–2008. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 74, p. 323–331, 2012.

PUTIGNANI, L; CHIERICO, D; ONORI, M; MANCINELLI, L; ARGENTIERI, M; BERNASCHI, P; COLTELLA, L; LUCIGNANO, B; PANSANI, L; RANNO, S; RUSSO, C; URBANI, A; FEDERICI, G; MENICHELLA, D. MALDI-TOF mass

spectrometry proteomic phenotyping of clinically relevant fungi. **Mol. BioSys.** v. 7, p. 620–629, 2011.

RIMEK, D; FEHSE, B; GÖPEL, P. Evaluation of Mueller-Hinton-agar as a simple medium for the germ tube production of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. **Mycoses** 51: 205–208, 2007.

ROMEO, O; CRISEO, G. Morphological, biochemical and molecular characterisation of the first Italian *Candida africana* isolate. **Mycoses.** v. 52, p. 454–457, 2008.
SCHEID, L; MARIO, D; LOPES, P; LORETO, E; LINARES, C; SANTURIO, J; ALVES, S. *Candida dubliniensis* does not show phospholipase activity: true or false? **Rev Soc Bras Med Tropical.** v. 43, n. 2, p. 205-206, 2010.

SILVA, J; COSTA, P; CHINARELLI, S. Manutenção de leveduras por congelamento a – 20°C. **RBAC.** v. 40, n. 1, p. 73-74, 2008.

SILVEIRA-GOMES, F; SARMENTO, D; ESPÍRITO-SANTO, E; SOUZA, N; PINTO, T; MARQUES-DA-SILVA, S. Differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* using hypertonic Sabouraud broth and tobacco agar. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 44, n. 4, p. 457-460, 2011.

SPANAMBERG, A; SANCHES, E; HUMMEL, J; VALENTE, P. Efeito do congelamento sobre a viabilidade de células leveduriformes. **Acta Scientiae Veterinariae.** v. 36, p. 43-45, 2008.

STADEN, R. The Staden sequence analysis package. **Molecular Biotechnology.** v. 5, p. 233–241, 1996.

STAIB P; MORSCHHAUSER J. Chlamydospore formation on Staib agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*. **Mycoses.** v. 42, p. 521–4, 1999.

STAIB, P; MORSCHÄUSER, J. Liquid growth conditions for abundant chlamydospore formation in *Candida dubliniensis*. **Mycoses.** v. 48, p. 50-54, 2005.

SULLIVAN, D; WESTERNENG, T; HAYNES, K; BENNETT, D; COLEMAN, D. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. **Microbiology.** v. 141, p. 1507–1521, 1995.

TORTORANO, A; PEMAN, J; BERNHARDT, H; KLINGSPOR, L; KIBBLER, C; FAURE, O; BIRAGHI, E; CANTON, E; ZIMMERMANN, K; SEATON, S; GRILLOT, R; ECMM WORKING GROUP ON CANDIDAEMIA. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** v. 23, p. 317–22, 2004.

TURNIDGE, J; KAHLMEYER, G; KRONVALL, G. Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. **Clinical Microbiology and Infection.** v. 12, n. 5, p. 418-425, 2006.

VIDOTTO, V; KOGA-ITO, C; MILANO, R; FIANCHINO, B; PONTÓN, J. Correlation between germ tube production, phospholipase activity and serotype distribution in *Candida albicans*. **Rev Iberoam Micol.** v. 16, p. 208-210, 1999.

VIDOTTO, V; PONTÓN, J; AOKI, S; QUINDÓS, G; MANTOAN, B; PUGLIESE, A; ITO-KUWA, S; NAKAMURA, K. Differences in extracellular enzymatic activity between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates. **Rev Iberoam Micol.** v. 21, p. 70-74, 2004.

VIUDES, A; PEMAN, E; CANTON, P; UBEDA, J; LOPEZ-RIBOT, L; GOBERNADO, M. Candidemia at a tertiary-care hospital: epidemiology, treatment, clinical outcome and risk factors for death. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** v. 21, p. 767–774, 2002.

YAMAMOTO, A; PAULA, C; DIAS, L; TADANO, T; MARTINS, E; AMADIO, J; HAHN, R. Epidemiological and clinical characteristics of nosocomial candidiasis in university hospitals in Cuiabá – Mato Grosso, Brazil. **Rev Iberoam Micol.** v. 29, n. 3, p. 164–168, 2012.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Ficha para colheita de dados dos pacientes com candidose sistêmica incluídos no estudo

Nome:

Hospital:

Data: ___/___/___

Prontuário:

Micoteca:

Caso:

Idade:

Sexo () F () M

Cidade/Região:

Doença de base:

Evolução:

Antifúngico profilático: _____ Duração: _____

Tratamento realizado: _____ Duração: _____

Sinais e sintomas:

Coinfecção: _____

Quimioterápico: _____

Material processado: _____

Data: ___/___/___

 Tubo germinativo ATB

APÊNDICE B – Publicação não relacionada com o tema da tese**Cutaneous infection by *Diaporthe phaseolorum* in Brazil**

**Mattei, A.S.^{1*}; Severo, C.B.²; Guazzelli, L.S.²; Oliveira, F.M.²; Gené,
J.³; Cano J³, Guarro, J.³; Severo, L.C.⁴**

1 Aluna de doutorado do Programa de Pós Graduação em Ciências Pneumológicas, Faculdade de Medicina, UFRGS,
antonella.mattei@hotmail.com

2 Dr. Ciências Pneumológicas, Laboratório de Micologia da Santa Casa de Porto Alegre/RS

3 Unitat de Micologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Espanha

4 Prof. Dr., Faculdade de Medicina, UFRGS

* Rua Prof. Annes Dias, 285, Hospital Santa Rita, Laboratório de Micologia, 96000-020, Porto Alegre/RS, Brasil. +555132148419, +55513214.

Abstract

Diaporthe phaseolorum is a frequent fungal parasite of plants, rarely involved in humans diseases. We describe a case of eumycetoma on hands and foot caused by this fungus in a renal transplanted Brazilian farmer diagnosed by morphology and molecular biology. The treatment was resolved with oral itraconazole.

Keywords: *Diaporthe*, *Phomopsis*, Brazil, eumycetoma

Introduction

Solid organ transplant patients are frequently infected by fungi in nearly 5% cases within the first six months after transplantation and principally by *Candida*, *Aspergillus* and *Cryptococcus* [1]. Here we describe a case of a renal transplanted patient infected with the fungus *Diaporthe*, a common parasite of plants [2] that occasionally can infect humans [3].

Case Report

A 43-year-old man developed to end-stage renal failure secondary to focal segmental glomerulosclerosis and underwent kidney transplantation. The patient developed renal vein thrombosis in the transplant kidney, and was removed. The patient underwent to second cadaveric kidney transplantation. His immunosuppressive regimen was antithymocyte globulin, tacrolimus, and prednisone. He developed diabetes mellitus that was adequately controlled by metformin.

Two years later, some cutaneous indurated and eritematous lesions appeared in the both right members. Part of two of the lesions (one from the right arm and one from of the right leg) were surgical removed for histologic examination which revealed foci of granulomatous lesions with central microabscesses (chronic necrotizing granulomatous lesions) in the deep dermis (Figure 1). Grocott-Gomori silver staining showed the presence of septate hyphae, occasionally branched at 45° angles, and individual and chain yeast-like forms with a thick wall (Figure 2). Portions of the biopsed specimens were cultured on Sabouraud dextrose agar tubes (SDA; Difco Laboratories, Detroit, Mich.) containing chloramphenicol (0.05 mg/ml) and incubated at 25° and 37°C for 7 days. Filamentous fungal cultures of both samples yielded identical colonies of a dematiaceous fungus, which was sent to the Faculty of Medicine of the Rovira i Virgili University for identification.

The treatment was initiated with oral itraconazole at 100 mg twice a day. After one month skin lesions were surgically excised and the patient continued with itraconazole. At a 5-month follow-up visit, whilst still receiving itraconazole and maintenance of the immunosuppressive regime, no occurrence of the skin lesions was observed.

For identification, the fungus (FMR 12194) was subcultured on oatmeal agar (OA; 30 g filtered oat flakes, 20 g agar, 1L distilled water) and potato dextrose agar (PDA; Difco Laboratories, Detroit, Mich.) and incubated at $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, up to two months. Growth rates were determined on PDA plates at 25° , 37° , 40° and 42°C for 14 days in darkness. In descriptions colour colony codes in parenthesis refer to Kornerup & Wanscher [4]. The microscopic features were determined by making wet mounts with lactic acid, which were then examined under a light microscope.

The fungus growing on OA and PDA reached a diameter of 50-70 mm in 5 days and covered the whole agar surface after 7 days at 25°C ; at 37°C , colonies reached 21-30 mm diameter after 21 days, and did not grow at 40°C . On PDA, the fungus produced a yellowish orange (4/A/7-8) diffusible pigment, orange (5/B/7) in the colony reverse, which was absent in OA. The colony morphology was very similar on the two culture media tested. At the beginning they were white with cottony to lanose or feathery aerial mycelium, with a slightly fringed margin; reverse brown (5/E/4) to dark brown (6/F/4) at the centre. After 2-3 weeks immersed or semimmerged, dark pigmented stromata, 350-800 μm diameter, appeared scattered on the agar, some ripened to give pycnidial conidiomata. Pycnidia usually single, globose to subglobose, unilocular, ostiolate, dark brown or black, often with 1-2 long necks; wall composed of an outer layer of cells of *textura globosa* to *angularis*, dark brown, thick-walled, 7-13 μm diam, and a thick inner layer of cells of *textura globosa*, colourless; necks more or less cylindrical, 250-460 μm long, coated with short dark brown hyphae. Conidiophores lining the cavity of the conidiomata, usually composed of a hyaline, cylindrical basal cell, 5-7 x 2.5-3 μm , usually bearing 1 or 2 terminal phialidic conidiogenous cells. Conidiogenous cells hyaline, cylindrical, tapering towards the apex, 8-13 x 1.5-2 μm , with barely visible collarettes. Conidia of one type (α conidia), unicellular, hyaline, ellipsoidal to

cylindrical, rounded at both ends, 5-8 x 1.8-2 μm , biguttulate, sometimes bearing a basal conidiogenous scar, arranged in slimy masses. β conidia and teleomorph were not observed (Figure 2). According to these features, the fungus was tentatively identified as *Diaporthe* sp.

To confirm the identification, the internal transcribed spacer (ITS) region of rDNA was PCR amplified and sequenced as previously described [5]. BLAST sequence homology searches [6] were performed to compare the sequence obtained (approx. 550bp) of the isolates studied with those of other fungi deposited in the GenBank database. The BLAST query with the ITS regions sequenced from both isolates showed a 99% similarity with several sequences of *Diaporthe phaseolorum* (accession no. AF 001020.2, AY 577815.1, JN 541222.1 and JF 896458.1; 100% query coverage), and two other sequences belonging to *Diaporthe* sp. (FJ799938.1) and *Phomopsis* sp. (DQ480356.1).

Discussion

The genus *Diaporthe* includes important plant pathogens, endophytes either saprobes on plant debris that are most commonly seen as their *Phomopsis* anamorphs, which is characterized by the production of two types of conidia, named α - and β - conidia, into a close fruiting body (conidiomata) [7]. Traditionally, the species recognition of *Diaporthe/Phomopsis* complex was based on morphology, culture characteristics and host association. However, several studies demonstrated that such features are not always suitable for species identification due to their inter- and intra-species variability [8, 9]. Therefore, the recognition of these fungi is currently based mainly on sequence analyses the ITS region, although other genomic regions have also been used for taxonomic reevaluation of *Diaporthe / Phomopsis* species [9, 10, 11]. In our case,

morphological features of the clinical isolate were very similar to that of *Diaporthe longicolla* (= *Phomopsis longicolla*) mainly by the absence of β conidia and the sexual [10]. It is worth of mentioning that *D. longicolla*, a species that has been recently described as etiological agent a cutaneous infection [12], was only identified by ITS sequence due to absence of in vitro sporulation. In our case, the percentages of similarity obtained with the ITS sequences of the case isolate showed a 99 % of similarity with only sequences of *D. phaseolorum*, resolving therefore the identification of our isolate. Nevertheless, Santos et al. [10] describes *D. phaseolorum* as a homothallic species that, in addition to sexual structures, most of strains produce the anamorph with the two types of conidia, features that were not observed in any of the culture conditions tested.

The present study reports the first case of *Diaporthe* human infection in Brazil and the eumycetoma second case report by *D. phaseolorum* [3]. Other three cases of invasive infection by *Diaporthe* spp. were reported in the literature, however, were cutaneous infection, keratitis and osteomyelitis cases [12, 13, 14]. Most of these infections affected farmers and gardeners that had contact with plants receiving immunosuppressive therapy. In our patient the skin lesions appeared in after two years of transplantation. Garcia-Reyne et al. [12] also described a patient who developed lesions one year after the renal transplantation. It should be kept greater attention to transplant patients about the occurrence of fungal infections, in special those immunosuppressed and associated with other diseases such as diabetes mellitus [15].

In the clinical cases caused by saprophyte fungi, as in the present case, the diagnosis is not easy, the conjunction of culture, histopathology and clinical history being fundamental for a definitive diagnosis [16]. Here the isolation of the same fungus from two different lesions from two different extremities was helpful to avoid to

consider a possible contamination although the fact how that microorganism could infect in two different sites is intriguing.

The diversified antifungal therapy of the previous cases of human infections by *Diaporthe* has been used. A cutaneous infection by *Diaporthe longicolla* in a renal transplant recipient patient was treated with itraconazole and terbinafine, without response; surgical resection and change treatment to voriconazole resolved such infection [12]. The case of keratitis described in the literature was successfully treated with a combination of keratoplasty and topical voriconazole/amphotericin B therapy. The others cutaneous cases described were also successful with the use of itraconazole [3, 13, 14].

References

- [1] Badiie P, Alborzi A. Invasive fungal infections in renal transplant recipients. *Exp ClinTranspl* 2011; 9: 355-362.
- [2] Thompson SM, Tan YP, Young AJ, Neate SM, Aitken EAB, Shivas RG. Stem cankers on sunflower (*Helianthus annuus*) in Australia reveal a complex of pathogenic *Diaporthe* (*Phomopsis*) species. *Persoonia* 2011; 27: 80–89.
- [3] Iriart X, Binois R, Fior A, Blanchet D, Berry A, Cassaing S, Amazan E, Papot E, Carme B, Aznar C, Couppié P. Eumycetoma caused by *Diaporthe phaseolorum* (*Phomopsis phaseoli*): a case report and a mini-review of *Diaporthe/Phomopsis* spp. invasive infections in humans. 2011; 17:1492-1494.
- [4] Kornerup A, Wanscher JH. 1978. *Methuen Handbook of Colour*. London: Methuen Publishing Ltda; 1978.
- [5] Gilgado F, Cano J, Gené J, Guarro J. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J Clin Microbiol* 2005; 43:4930–4942.
- [6] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215:403–410.
- [7] Sutton, BC. *The Coelomycetes*. Kew, U.K: Commonwealth Mycological Institute, 1980.
- [8] Van der Aa HA, Noordeloos ME, Gruyter J. Species concepts in some larger genera of the Coelomycetes. *Studies in Mycology* 1990; 32: 3-19.
- [9] Santos JM, Phillips AJL. Resolving the complex of *Diaporthe* (*Phomopsis*) species occurring on *Foeniculum vulgare* in Portugal. *Fungal Diversity* 2009; 34: 111-125.
- [10] Santos JM, Vrandecic K, Cosic J, Duvnjak T, Phillips AJL. Resolving the *Diaporthe* species occurring on soybean in Croatia. *Persoonia* 2011; 27:9-19.

- [11] Udayanga D, Liu X, Crous PW, McKenzie EHC, Chukeatirote E, Hyde KD. 2012. A multi-locus phylogenetic evaluation of *Diaporthe* (*Phomopsis*). *Fungal Diversity* 2012; doi 10.1007/s13225-012-0190-9.
- [12] Garcia-Reyne A, Lopez-Medrano F, Morales J, Esteban C, Martin I, Eraña I, Meije Y, Lalueza A, Alastruey-Izquierdo A, Rodriguez-Tudela J, Aguado J. Cutaneous infection by *Phomopsis longicolla* in a renal transplant recipient from Guinea: first report of human infection by this fungus. *Transpl Infect Dis* 2011; 13: 204-207.
- [13] Sutton D, Timm W, Morgan-Jones G, Rinaldi MG. Human phaeohyphomycotic osteomyelitis caused by the coelomycete *Phomopsis* Saccardo 1905: Criteria for Identification, case History, and therapy. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 807–811.
- [14] Mandell KJ, Colby KA. Penetrating keratoplasty for invasive fungal keratitis resulting from a thorn injury involving *Phomopsis* species. *Cornea* 2009; 28: 1167–1169.
- [15] Zhang XD, Hu XP, Yin H, Wang W, Zhang X, Ma LL, Wang Y. *Aspergillus* pneumonia in renal transplant recipients. *Chin Med J (Engl)* 2008; 121:791-479.
- [16] Sutton DA. Coelomycetous fungi in human disease. A review: Clinical entities, pathogenesis, identification and therapy. *Rev Iberoam Micol* 1999; 16: 171-179.

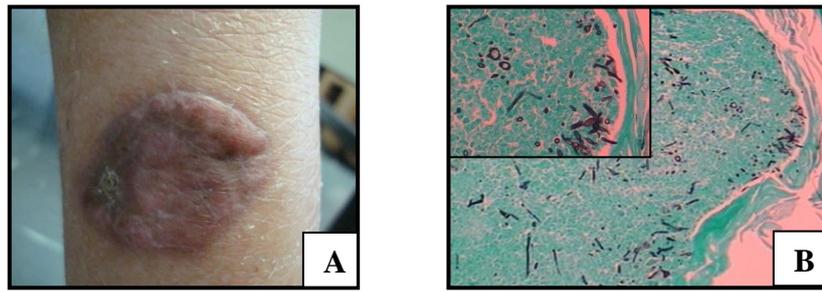


Figure 1: Macroscopic aspect of the lesion in the right arm (A). Grocott-Gomori silver staining revealed the presence of septate hyphae that occasionally branched at 45° angles, and of individual and chain yeast-like thick-walled forms (B).

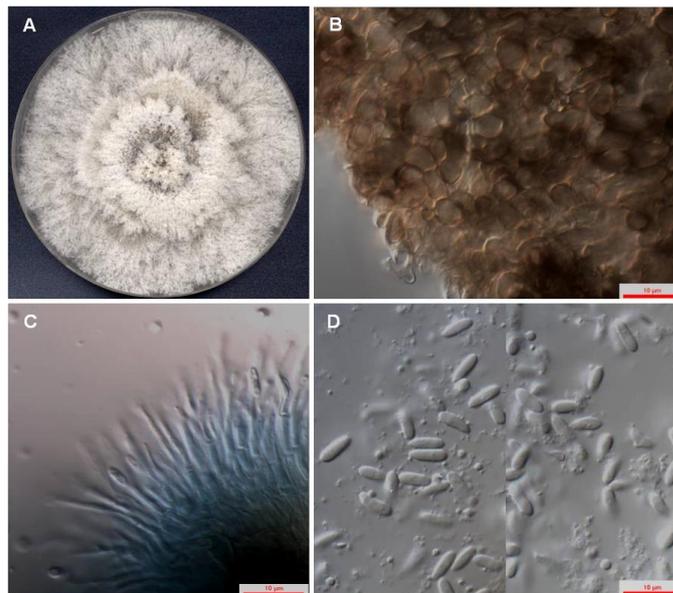


Figure 2. *Diaporthe phaseolorum* (FMR 12294). (A) Colony on PDA after 7 days at 25°C, (B) Pycnidial outer wall of textura globosa, (C) Conidiophores, (D) Conidia.

ANEXOS

ANEXO A. Carta de aceite do artigo “Viabilidade de *Candida albicans* estocada em água destilada a - 20°C” na Revista Brasileira de Análises Clínicas.



Revista Brasileira de Análises Clínicas-RBAC
Brazilian Journal of Clinical Analysis
Sociedade Brasileira de Análises Clínicas-SBAC
Rua Vicente Licínio 99, CEP: 20.270-902
Tijuca, Rio de Janeiro-RJ, Brasil
Tel: (021) 2187-0800, 2187-0819
E-mail: rbac@sbac.org.br, Home Page:

DECLARAÇÃO DE ACEITE

Declaro que, após finalizado o processo de revisão do manuscrito intitulado “**VIABILIDADE DE *Candida albicans* ESTOCADA EM ÁGUA DESTILADA A - 20°C**” de autoria de “**Antonella Souza Mattei, Cecília Bittencourt Severo, Luciana da Silva Guazzeli, Flávio de Mattos Oliveira, Luiz Carlos Severo**”, este foi aceito para publicação na Revista Brasileira de Análises Clínicas [RBAC].

Rio de Janeiro, 10 de dezembro de 2012.



Paulo Murillo Neufeld
Editor-Chefe da RBAC

ANEXO B. Aceite do artigo “Sensibilidad de *Candida albicans* de hemocultivos frente a tres fármacos: estudio retrospectivo en Rio Grande do Sul, Brasil, 1999 a 2009” na Revista Iberoamericana de Micología.

De: **ees.riam.0.1f1dee.4ed9d4c7@eesmail.elsevier.com** en nombre de **Revista Iberoamericana de Micología** (reviberoammicol@elsevier.com)

Enviado: viernes, 08 de febrero de 2013 03:43:28 p.m.

Para: antonella.mattei@hotmail.com

CC: reviberoammicol@ehu.es; guillermo.quindos@ehu.es; guillermoquindos@gmail.com

Dear Dr. Mattei,

We are glad to inform you that your article "SENSIBILIDAD DE *Candida albicans* DE HEMOCULTIVOS FRENTE A TRES FÁRMACOS: ESTUDIO RETROSPECTIVO EN RIO GRANDE DO SUL, BRASIL, 1999 A 2009" (Ref. RIAM-D-12-00094R2) has been accepted for its publication in Revista Iberoamericana de Micología.

Please remember that, before publication, you will receive an e-mail with the galley proofs of your article in pdf format.

Thank you for your contribution to the journal.

Yours sincerely,

Rocío Alonso Vargas
Editorial assistant
Revista Iberoamericana de Micología

(Guillermo Quindós
Editor-In-Chief)