

**OLIVIA COMETTI FAVALESSA**

**Caracterização e perfil de susceptibilidade *in vitro* à drogas antifúngicas de leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* isoladas de pacientes HIV positivos procedentes dos serviços de saúde de Cuiabá e Várzea Grande-MT**

**Universidade Federal de Mato Grosso  
Faculdade de Ciências Médicas  
Programa de Pós-Graduação  
Mestrado em Ciências da Saúde  
Área de Concentração: Doenças Infecciosas e Tropicais**

**Cuiabá – Mato Grosso**

**2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Universidade Federal de Mato Grosso  
Faculdade de Ciências Médicas  
Programa de Pós-Graduação  
Mestrado em Ciências da Saúde  
Área de Concentração: Doenças Infecciosas e Tropicais**

**Caracterização e perfil de susceptibilidade *in vitro* à drogas antifúngicas de leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* isoladas de pacientes HIV positivos procedentes dos serviços de saúde de Cuiabá e Várzea Grande-MT**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Federal de Mato Grosso, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências da Saúde**, Área de Concentração: Doenças Infecciosas e Tropicais.

**Orientadora: Profa. Dra. Rosane Christine Hahn**

**Cuiabá – Mato Grosso**

**2009**

**“Bem aventurados aqueles que sonham sonhos e estão dispostos a pagar o preço de torná-los realidade”**

**“L.F. Cardenal Suenens”**

**“Jamais te será dado um desejo sem que te seja outorgado o poder de torná-lo realidade.”**

**“Richard Bach”**

**Dedico esta Dissertação**

**Aos meus pais, OLÍVIO FAVALESSA E MARIA DE FATIMA C.  
FAVALESSA, grandes responsáveis pelo meu desenvolvimento e que muito  
me apoiaram nesta trajetória.**

**À minha orientadora Profa. Dra. ROSANE CHRISTINE HAHN.**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, OLÍVIO FAVALESSA E MARIA DE FÁTIMA C. FAVALESSA, exemplos da minha vida, por todo incentivo e apoio durante toda minha vida até chegar aqui, obrigada pelo constante estímulo a alcançar meus objetivos mesmos nas dificuldades.

À minha orientadora Profa. Dra. ROSANE CHRISTINE HAHN por esta grande oportunidade me concedida em um momento tão difícil na minha vida, pela confiança, pelos ensinamentos científicos, humanos, sociais, entre muitas outras coisas que eu pude aprender. A senhora com toda a sua sabedoria, com a sua maneira de agir, na suavidade de suas palavras, colaborou muito para o meu desenvolvimento profissional, científico e até mesmo pessoal. Meus sinceros agradecimentos.

Ao Professor Dr. COR JESUS FERNANDES FONTES pela colaboração, pelos seus ensinamentos que muito me ajudaram na realização do meu trabalho.

À MSc. LUCIANA BASILI DIAS pela sua amizade, por todo o seu auxílio prestado nestes dois anos que se passaram, pelo seu carinho e compreensão. A sua ajuda foi importante para o desenvolvimento do meu trabalho, para toda parte laboratorial que você me ensinou, me ajudou, sempre presente nas etapas percorridas por mim neste mestrado.

Ao meu irmão CYRO MATHEUS C. FAVALESSA, pelas suas colaborações na minha dissertação.

Ao SÉRGIO AUGUSTO C. GOMES, meu noivo, que muito me incentivou a fazer este mestrado, pela sua paciência nos momentos mais críticos e, por todas as outras colaborações. Agradeço também a sua família pela amizade e o carinho que tenho recebido.

Ao MSc. LUCIANO CORRÊA RIBEIRO por sua colaboração, companheirismo e amizade neste caminho que percorremos juntos. Agradeço muito pelos artigos e informações cedidas.

À MARILANA DE LOURDES MACHADO, que me recebeu no laboratório de Investigação com muito carinho, agradeço muito pelo seu apoio, amizade e companheirismo!

À MARTA ROCHA pela sua intensa colaboração no preparo dos materiais, pela sua amizade, atenção e companhia nas manhãs do Laboratório de Investigação.

Ao NILSON BOTELHO, técnico do laboratório de investigação, pela ajuda no preparo dos materiais, na rotina de trabalho e, pela companhia.

As minhas colegas de mestrado, DACIENE A. GROSCLAUSS e SARA A. A. SIMÕES, que me acompanharam no início da minha trajetória e que me ajudaram muito no meu desenvolvimento como mestranda. A KATHERINE da SILVA C. PRADO, companheira desde o início do mestrado, agradeço por sua amizade.

À NAIANA FERNANDES LEOTTI pelo suporte de informática.

À farmacêutica-bioquímica, TOMOKO TADANO, por sua contribuição técnico-científica e sua colaboração quanto ao isolamento das amostras clínicas que foram cedidas para realização deste trabalho.

À GLÓRIA MARIA DE MORAES, técnica do CERMAC, por sua colaboração na coleta de materiais clínicos dos pacientes atendidos neste serviço de saúde.

Ao IBERÊ FERREIRA da SILVA JUNIOR, pela sua amizade e pelos livros cedidos.

Ao FÁBIO ALEXANDRE L. DOS SANTOS pelo apoio técnico durante as apresentações e suporte de informática.

Ao RICARDO CRUZ e SEBASTIÃO ARAÚJO pelo apoio de sempre.

A todos os professores da pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas/FCM, que colaboraram com o meu aprendizado.

À Profa. Dra. CARMEM LÚCIA BASSI por sua amizade, atenção durante as aulas de biologia molecular e, pela companhia no laboratório de investigação.

À secretária da pós-graduação ELIANA SILVA, pelas gentilezas prestadas e, a todo pessoal da secretaria da FCM/UFMT, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos colegas do mestrado da farmacologia, química, nutrição em que convivemos juntos na realização dos créditos e, que muito me ajudaram.

Aos colegas do mestrado: ANA CAROLINA YAMAMOTO, JANAÍNA V.R.S. AMÁDIO e DINIZ P.L.J<sup>f</sup> pela oportunidade de crescimento pessoal frente aos obstáculos superados.

Aos acadêmicos de Medicina da UFMT, FLÁVIO BASILI DIAS e BRUNO COELHO, pela contribuição na pesquisa de prontuários.

Aos pacientes atendidos nos serviços de saúde de Cuiabá-MT, no período do desenvolvimento deste projeto, por aceitarem a participar do estudo, cedendo suas amostras clínicas.

À equipe do laboratório de Micologia do Hospital Geral Universitário (HGU), pelos momentos em que participei de aulas e treinamentos para aperfeiçoamento da micologia.

À NICOLINA M<sup>a</sup>. R. DA SILVA, pela atenção e carinho nos momentos em que estive presente no Laboratório de Micologia do HGU.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Humana

AMB – Anfotericina B

ATCC – American Type Culture Collection

Azóis – Agentes antifúngicos sintéticos

Céls/mm<sup>3</sup> – Células por milímetros cúbicos

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CERMAC - Centro Estadual de Referência em Média e Alta Complexidade

CTZ - Cetoconazol

*C. albicans* – *Candida albicans*

*C. dubliniensis* – *Candida dubliniensis*

*C. glabrata* – *Candida glabrata*

*C. guilliermondii* – *Candida guilliermondii*

*C. parapsilosis* – *Candida parapsilosis*

*C. tropicalis* – *Candida tropicalis*

*C. krusei* – *Candida krusei*

*C. albidus* - *Cryptococcus albidus*

*C. laurentii* - *Cryptococcus laurentii*

*C. gattii* – *Cryptococcus gattii*

*C. neoformans* – *Cryptococcus neoformans*

*C. terreus* - *Cryptococcus terreus*

*C. uniguttulatus* - *Cryptococcus uniguttulatus*

CGB - L-canavanina-glicina-azul de bromotimol

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

CMV – Citomegalovírus

C° – Graus Celsius

COF – Candidíase orofaríngea

COFE – Candidíase orofaríngea e esofágica

Cópias/mm<sup>3</sup> – Cópias por milímetro cúbico  
DOPA - 3,4- hidroxifenilamina  
DP – Desvio padrão  
EUA – Estados Unidos da América  
*E. camadulensis* – *Eucalyptus camadulensis*  
*E. tereticornis* - *Eucalyptus tereticornis*  
FCM – Faculdade de Ciências Médicas  
FCZ – Fluconazol  
GAL – Galactose  
GLI – Glicose  
GP 41 – Glicoproteína 41  
GP 120 – Glicoproteína 120  
HAART - Terapia antiretroviral altamente ativa  
HUJM – Hospital Universitário Julio Müller  
*H. capsulatum* – *Histoplasma capsulatum*  
HIV – Human imunodeficiency vírus  
IAL – Instituto Adolfo Lutz  
ITZ - Itraconazol  
Kg – Kilograma  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – Fosfato de potássio monobásico  
KOH – Hidróxido de potássio  
LAC – Lactose  
LBA – Lavado Broncoalveolar  
LI – Laboratório de Investigação  
LCR – Líquido cefalorraquidiano  
MAL – Maltose  
MEL - Melibiose  
mg – Miligrama  
MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – Sulfato de magnésio hepta hidratado

mL – Mililitro

mm - Milímetro

mol – Quantidade de matéria

CIM – Concentração inibitória mínima

*M. tuberculosis* – *Micobacterium tuberculosis*

NCCLS – Committee for Clinical Laboratory Standards

OMS - Organização Mundial de Saúde

PCP – Pneumonia por *Pneumocystis carinii*

*P. brasiliensis* – *Paracoccidioides brasiliensis*

*P. carinii* - *Pneumocystis carinii*

*P. jiroveci* - *Pneumocystis jiroveci*

PCR – Reação em cadeia de polimerase

pH – Potencial hidrogeniônico

R – Resistente

RAF – Rafinose

RAPD – Randomly amplified polymorphic DNA

S – Susceptível

SAC – Sacarose

*S. cerevisiae* - *Sacharomyces cerevisiae*

SDD – Susceptível dose-dependente

TRE - Trealose

UFC – Unidade formadora de colônias

XIL - Xilose

µg – Micrograma

µg/mL – Microgramas por mililitro

SES – Secretária de Estado da Saúde

SNC – Sistema nervoso central

*S. schenckii* – *Sporotrix schenckii*

TB – Tuberculose

*T. gondii - Toxoplasma gondii*

UFMT – Universidade Federal de Mato Grosso

*Var – Variedade*

VVC – Candidíase vulvovaginal

VCZ - Voriconazol

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Distribuição dos pacientes HIV positivos de acordo com a contagem de células TCD4+ para isolados de <i>Candida</i> spp. ....	62
<b>Figura 2</b> – Distribuição das espécies de leveduras do gênero <i>Candida</i> nas distintas amostras clínicas. ....	63
<b>Figura 3</b> - Aspecto micromorfológico de <i>C. tropicalis</i> .....	63
<b>Figura 4</b> – Aspecto micromorfológico de <i>C. albicans</i> .....	64
<b>Figura 5</b> – Aspecto micromorfológico de <i>C. parapsilosis</i> .....	64
<b>Figura 6</b> – Aspecto micromorfológico de <i>C. glabrata</i> .....	65
<b>Figura 7</b> – Aspecto micromorfológico de <i>C. krusei</i> .....	65
<b>Figura 8</b> – Exemplo de galeria do sistema comercial API 20C AUX da BioMérieux mostrando perfil de identificação de leveduras do gênero <i>Candida</i> .....	66
<b>Figura 9</b> – Exemplo de testes <i>in vitro</i> (Etest) para avaliação do perfil de susceptibilidade <i>in vitro</i> frente ao cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B, para leveduras do gênero <i>Candida</i> .....	66
<b>Figura 10</b> – Frequência de resistência dos isolados de leveduras do gênero <i>Candida</i> provenientes de diversas amostras clínicas frente aos antifúngicos testados .....	68
<b>Figura 11</b> – Distribuição de valores de CIM de cetoconazol (A) e fluconazol (B) frente às espécies de leveduras do gênero <i>Candida</i> .....	70
<b>Figura 12</b> – Distribuição de valores de CIM de itraconazol (A) e voriconazol (B) frente às espécies de leveduras do gênero <i>Candida</i> .....	71
<b>Figura 13</b> – Distribuição de valores de CIM de anfotericina B frente às espécies de leveduras do gênero <i>Candida</i> .....	72

<b>Figura 14</b> – Distribuição dos pacientes HIV positivos de acordo com a contagem de células TCD4+ para isolados de <i>Cryptococcus</i> spp .....	73
<b>Figura 15</b> - Distribuição das espécies de leveduras do gênero <i>Cryptococcus</i> em distintas amostras clínicas .....	74
<b>Figura 16</b> - Caracterização das espécies de leveduras do gênero <i>Cryptococcus</i> em meio CGB. A coloração azul indica teste positivo - <i>C.gattii</i> e, a coloração verde indica teste negativo - <i>C.neoformans</i> .....	74
<b>Figura 17</b> - Exemplo de testes <i>in vitro</i> (Etest) para avaliação do perfil de susceptibilidade <i>in vitro</i> frente ao cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B, para leveduras do gênero <i>Cryptococcus</i> .....	75

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Frequência de isolamento de leveduras dos gêneros <i>Candida</i> e <i>Cryptococcus</i> em pacientes HIV positivos dos serviços de Saúde de Cuiabá-MT, 2005-2008 .....	61
<b>Tabela 2</b> – Concentração inibitória mínima das cinco drogas antifúngicas frente às espécies de leveduras do gênero <i>Candida</i> das distintas amostras clínicas .....	69
<b>Tabela 3</b> – Variação da concentração inibitória mínima quanto ao local de isolamento das amostras de <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	77
<b>Tabela 4</b> - Concentração inibitória mínima das cinco drogas antifúngicas frente às espécies de leveduras do gênero <i>Cryptococcus</i> das distintas amostras clínicas .....	78
<b>Tabela 5</b> – Perfil bioquímico (assimilação e fermentação) das espécies de leveduras do gênero <i>Candida</i> .....	104

**RESUMO**

A candidíase é uma das infecções fúngicas mais frequentes entre os pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). A candidíase oral acomete cerca de 80 a 95% desses pacientes. É causada por distintas espécies de leveduras do gênero *Candida*, e atualmente vem atuando como importante marcador prognóstico e na progressão da infecção pelo HIV. A criptococose é uma micose sistêmica grave, sendo considerada atualmente a segunda infecção fúngica oportunista mais comum entre pacientes imunocomprometidos. Essa doença é causada principalmente por duas espécies do complexo *Cryptococcus neoformans*, quais sejam *Cryptococcus neoformans* (sorotipo A, D e AD) e *Cryptococcus gattii* (sorotipo B e C). O presente estudo objetivou a caracterização e a determinação do perfil de susceptibilidade *in vitro* a cinco drogas antifúngicas de leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* de distintas amostras clínicas provenientes de pacientes HIV positivos. A caracterização dos isolados de *Candida* spp foi realizada por meio da metodologia clássica, testes bioquímicos (zimograma e auxanograma) e morfológicos (prova do tubo germinativo e microcultivo em lâmina). A pureza destes isolados foi verificada pela utilização do meio de CHROMagar *Candida*, o qual foi também útil para a confirmação das espécies pela metodologia clássica. Já para os isolados de *Cryptococcus* spp, a caracterização foi realizada através da quimiotipagem em meio L-canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) e a pureza dos isolados avaliada pela semeadura em meio ágar niger. As colônias de todos os isolados confirmados quanto a sua pureza foram submetidos à determinação do perfil de susceptibilidade *in vitro*. Para a determinação desse perfil, foram utilizadas cinco drogas antifúngicas (cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B) e o método comercialmente disponível - Etest. De 160 pacientes infectados pelo HIV, foram identificados 131 isolados de leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* dos quais 105 eram espécies de *Candida* spp e 26 espécies de *Cryptococcus* spp. As seguintes espécies de leveduras do gênero *Candida* foram identificadas: 82 (78,1%) *Candida albicans*, 8 (7,6%) *Candida parapsilosis*, 8 (7,6%) *Candida tropicalis*, 4 (3,8%) *Candida krusei*, 2 (1,9%) *Candida glabrata*, e 1 (0,9%) *Candida guilliermondii*. Das leveduras do gênero *Cryptococcus* foram caracterizados 25 (96,1%) *C. neoformans* e 1 (3,9%) *C. gattii*. Comparando os valores de CIM de cada droga para os isolados de leveduras do gênero *Candida*, observou-se um amplo espectro de variação frente aos antifúngicos testados e frequência elevada de resistência em relação aos valores de CIM<sub>90</sub> para maioria das cepas isoladas. Os isolados de *C. neoformans* em sua maioria apresentaram-se susceptíveis aos cinco antifúngicos testados, enquanto que o isolado de *C. gattii* demonstrou resistência *in vitro* ao cetoconazol e itraconazol. Valores de CIM mais elevados para todos os antifúngicos testados foram observados para o *C. neoformans* isolados de LCR, quando comparados aos outros sítios de isolamento, exceto para anfotericina B que apresentou valores semelhantes em todos os sítios.

**ABSTRACT**

Candidiasis is one of the most frequent fungal infections among patients infected with human immunodeficiency virus (HIV) and oral candidiasis occurs in 80 to 95% of cases. It is caused by distinct yeast species of the *Candida* genus and is currently used as an important marker of prognosis and progression of HIV infection. Cryptococcosis is a systemic mycosis and considered the second most common opportunistic fungal infection among immunocompromised patients. This disease is principally caused by two species of the complex *Cryptococcus neoformans*, *C. neoformans* (serotype A, D and AD) and *C. gattii* (serotype B and C). The study aimed to characterize yeasts of the *Candida* and *Cryptococcus* genera from distinct clinical samples taken from HIV+ patients. Characterization of the *Candida* spp isolates was performed by the classic methodology, biochemical (zimogram and auxanogram) and morphological tests (germinative tube growth test and slide microculture), while isolate purity was verified using *Candida* CHROMagar culture medium, which was also useful for species confirmation by the classic methodology. The *Cryptococcus* spp isolates were characterized by chemotyping in L-canavanine-glycine-bromthymol blue (CGB) medium and isolate purity was verified by seeding in niger seed agar. Colonies of all the confirmed isolates presenting high purity were submitted to *in vitro* susceptibility profile determination. For profile determination, five antifungal drugs (ketoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol and amphotericin B) were used as part of a commercially available method, the Etest. From 160 HIV-infected patients, 131 yeasts isolates from the *Candida* and *Cryptococcus* genera were identified, of which 105 were isolates of *Candida* spp species and 26 were *Cryptococcus* spp. The following *Candida* genus yeast species were identified: 82 *Candida albicans* (78.1%), 8 *C. parapsilosis* (7.6%), 8 *C. tropicalis* (7.6%), 4 *C. krusei* (3.8%), 2 *C. glabrata* (1.9%), and 1 *C. guilliermondii* (0.9%). Of the *Cryptococcus* genus yeast species characterized, 25 (96.1%) were *Cryptococcus neoformans* and 1 (3,9%) was *C. gattii*. Comparing the MIC values of each drug for the *Candida* genus isolates, observation revealed a wide spectrum of variation against the antifungal drugs tested and high resistance in relation to MIC<sub>90</sub> values for the majority of the isolated strains. The *C. neoformans* isolates were susceptible to the five antifungal drugs tested; however, the *C. gattii* isolate showed *in vitro* resistance to ketoconazol and itraconazol. Higher MIC values for all the antifungal drugs tested were observed for *C. neoformans* isolates from cephalorachidian liquid compared to other isolation sites, except for amphotericin B, which presented similar values.

## SUMÁRIO

<b>1 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA</b> .....	1
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	6
<b>2.1 Infecções oportunistas não fúngicas</b> .....	10
<b>2.2 Infecções oportunistas Fúngicas</b> .....	11
2.2.1 Criptococose .....	11
2.2.1.1 Fatores de virulência e patogênese .....	13
2.2.1.2 Caracterização de leveduras do gênero <i>Cryptococcus</i> .....	15
2.2.2 Candidíases .....	16
2.2.2.1 Caracterização de leveduras do gênero <i>Candida</i> .....	18
<b>2.3 Criptococose e HIV (Epidemiologia, distribuição de espécies)</b> .....	20
<b>2.4 Candidíase e HIV (Epidemiologia, distribuição de espécies)</b> .....	24
2.4.1 Candidíase oral .....	24
2.4.2 Candidíase orofaríngea .....	26
2.4.3 Candidíase esofágica .....	27
2.4.4 Candidíase vaginal e infecções sistêmicas .....	27
2.4.5 Onicomicose ocasionada por leveduras do gênero <i>Candida</i> .....	28
<b>2.5 Drogas antifúngicas</b> .....	28
2.5.1 Polienos .....	29
2.5.1.1 Anfotericina B .....	29
2.5.1.2 Equinocandinas .....	31
2.5.2 Agentes antifúngicos sintéticos (Azóis) .....	32
2.5.2.1 Cetoconazol .....	32
2.5.2.2 Fluconazol .....	33
2.5.2.3 Itraconazol .....	33
2.5.2.4 Voriconazol .....	34
2.5.3 Novos antifúngicos em potencial .....	34

<b>2.6 Tratamento das candidíases</b> .....	35
<b>2.7 Tratamento da criptococose</b> .....	38
<b>2.8 Resistência aos antifúngicos</b> .....	39
<b>2.9 Susceptibilidade às drogas antifúngicas</b> .....	42
<b>2.10 Testes de susceptibilidade: Possíveis correlações <i>in vitro</i> e efeitos terapêuticos <i>in vivo</i></b> .....	44
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	45
3.1 Objetivo geral .....	46
3.2 Objetivos específicos .....	46
<b>4.0 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	47
4.1 Tipo de estudo .....	48
4.2 Seleção dos pacientes .....	48
4.3 Coleta e cultivo das amostras de leveduras do gênero <i>Candida</i> .....	49
<b>4.4 Identificação das amostras de leveduras do gênero <i>Candida</i></b> .....	50
4.4.1 Avaliação da pureza das colônias .....	51
4.4.2 Prova do tubo germinativo .....	51
4.4.3 Microcultivo .....	52
4.4.4 Provas bioquímicas (Zimograma e Auxanograma) .....	52
4.4.5 Identificação de <i>C. dubliniensis</i> .....	55
4.5 Coleta das amostras de leveduras do gênero <i>Cryptococcus</i> .....	55
<b>4.6 Identificação de leveduras do gênero <i>Cryptococcus</i></b> .....	55
4.6.1 Exame direto .....	56
4.6.2 Cultura .....	56
4.6.3 Quimiotipagem em meio CGB .....	57
<b>4.7 Testes de susceptibilidade <i>in vitro</i> das leveduras dos gêneros <i>Candida</i> e <i>Cryptococcus</i> aos antifúngicos: cetoconazol, fluconazol, itraconazol, anfotericina B.</b>	57
4.7.1 Teste de susceptibilidade <i>in vitro</i> para leveduras do gênero <i>Candida</i> .....	58
4.7.1.1 Cepas de referência .....	58
4.7.1.2 Etest .....	58
4.7.2 Teste de susceptibilidade <i>in vitro</i> para leveduras do gênero <i>Cryptococcus</i> .....	59

<b>4.8 Procedimento de análise dos resultados .....</b>	<b>59</b>
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>60</b>
<b>5.1 Isolamento de Leveduras dos gêneros Candida e Cryptococcus .....</b>	<b>61</b>
5.2. Isolamento de leveduras do gênero Candida nas amostras clínicas .....	61
5.2.1 Identificação das espécies de leveduras do gênero Candida .....	62
5.2.2 Determinação da concentração inibitória mínima das cinco drogas antifúngicas para os isolados de leveduras do gênero Candida .....	66
5.3 Isolamento de leveduras do gênero Cryptococcus nas amostras clínicas.....	72
5.3.1 Identificação das espécies de leveduras do gênero Cryptococcus .....	73
5.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima das cinco drogas antifúngicas para os isolados de leveduras do gênero Cryptococcus .....	75
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>79</b>
6.1 Frequência de isolamento de leveduras dos gêneros Candida e Cryptococcus.....	80
6.2 Infecção por leveduras do gênero Candida e depressão imune em pacientes portadores de HIV/AIDS.....	82
6.3 Infecção por leveduras do gênero Cryptococcus e depressão imune em pacientes portadores de HIV/AIDS.....	82
6.4 Perfil de distribuição de leveduras do gênero Candida .....	83
6.5 Determinação da concentração de CIM para leveduras do gênero Candida.....	84
6.6 Determinação da concentração de CIM para leveduras do gênero Cryptococcus.....	86
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>89</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>91</b>
<b>9 ANEXOS .....</b>	<b>103</b>
<b>10. APÊNDICES .....</b>	<b>107</b>

## **1. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA**

No cenário mundial, aproximadamente 40 milhões de indivíduos encontram-se hoje infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). No Brasil foram notificados, até junho de 2007, 474.273 casos de pacientes acometidos pela síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), sendo 26.757 casos registrados na região Centro-Oeste. Com o advento da AIDS, houve um importante aumento na frequência de infecções oportunistas, as quais afetam os indivíduos em estágio mais avançado pela infecção do HIV. Ao longo da última década, tem sido observado aumento de infecções bacterianas e fúngicas tais como: tuberculose, pneumocistose, candidíase, diarreia crônica por isosporíase, criptosporidiose, neurotoxoplasmose, neurocriptococose, citomegalovirose, dentre outras.<sup>1</sup>

A pandemia da AIDS representa fenômeno global, dinâmico e instável, cuja forma de ocorrência nas diferentes regiões do mundo depende, entre outros determinantes, do comportamento humano individual e coletivo.<sup>2,3</sup>

Atualmente, novas tecnologias em terapias médicas e cirúrgicas têm sido desenvolvidas para melhorar a qualidade de vida de pacientes imunodeprimidos. Contudo, este aumento de sobrevivência tem contribuído para o aumento das infecções fúngicas oportunistas, em consequência do aumento da exposição a esses microrganismos. A epidemia da AIDS tem agregado uma crescente população de indivíduos imunodeprimidos, susceptíveis às infecções por fungos. Estas infecções fúngicas apresentam caráter grave, de rápida progressão, difícil diagnóstico e tratamento. A incidência de micoses oportunistas invasoras tem aumentado significativamente nos últimos anos. Dentre as infecções fúngicas que mais acometem pacientes com AIDS as candidíases são muito frequentes e a neurocriptococose é considerada uma das mais graves.<sup>4</sup>

A Candidíase orofaríngea (COF) é a infecção fúngica oportunista mais comum encontrada em pacientes HIV positivos. Tem sido estimada em cerca de 90% a proporção

desta afecção entre as infecções oportunistas que ocorrem durante a progressão da AIDS. As lesões provocadas pela candidíase orofaríngea são preditoras da atividade do retrovírus, mesmo quando o processo de imunodepressão ainda não esteja totalmente instalado. Tem sido relatado na literatura que o aparecimento dessa afecção ocorre mesmo com altas taxas de CD<sub>4</sub>, apesar da maioria dos casos ocorrer com taxas menores que 200 cels/mm<sup>3</sup>.<sup>5</sup>

A *C. albicans* é a espécie mais prevalente isolada em quadros de candidíase orofaríngea nesse grupo de pacientes, porém as espécies ditas não-*albicans* estão emergindo com uma frequência cada vez mais expressiva nos últimos tempos. Dentre as espécies não-*albicans*, as mais comumente isoladas de pacientes HIV positivos são: *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii* e mais recentemente *Candida dubliniensis*.<sup>6</sup>

A *C. dubliniensis* é pouco encontrada na prática clínica em função de sua semelhança fenotípica à *C. albicans*. Porém, atualmente, seu isolamento tem sido cada vez mais frequente em orofaringe de pacientes HIV positivos. Embora a maior parte das espécies de *C. dubliniensis* seja susceptível ao fluconazol, tem sido demonstrado na literatura resistência *in vitro* a esse antifúngico. Esse fato pode ser devido aos tratamentos profiláticos das COF.<sup>7,8</sup>

A criptococose vem assumindo papel relevante na história da AIDS por ser considerada uma das micoses mais comumente diagnosticadas entre os pacientes infectados pelo HIV e, também, a principal responsável pela morbidade e mortalidade dos mesmos. Esta doença provoca várias manifestações clínicas graves que acometem principalmente o sistema nervoso central (SNC) e, em particular, as meninges.<sup>9</sup> É causada por duas espécies do complexo *Cryptococcus neoformans*, *C. neoformans* (sorotipo A, D e AD) e *Cryptococcus gattii* (sorotipo B e C).<sup>10</sup>

O tratamento de eleição para candidíases é o fluconazol, por apresentar valores baixos de concentração inibitória mínima, propriedades farmacocinéticas satisfatórias, boa tolerância pelos pacientes e menos efeitos adversos.<sup>11, 12</sup> No entanto, devido ao seu uso em larga escala para profilaxia das infecções fúngicas, tem sido relatado um aumento significativo de resistência de espécies de *Candida* spp a esta droga azólica.<sup>13</sup>

Desde a introdução dos azóis por via oral, sucessivamente vários estudos têm indicado que cepas de *C. albicans* já desenvolveram resistência as drogas azólicas disponíveis, especialmente fluconazol. Além disso, cepas de *C. albicans* e espécies não-*albicans* estão emergindo como sendo menos sensíveis e intrinsecamente resistentes, respectivamente à terapia por azóis.<sup>14,15,16,17,18</sup>

Com o advento da terapia antiretroviral altamente ativa (HAART) eficaz para o tratamento da infecção pelo HIV, observa-se um cenário em que estratégias antifúngicas são mais propícias para a obtenção de resultados eficazes, tendo em vista a melhora do sistema imune em decorrência da terapia antiretroviral.<sup>19,20</sup>

O tratamento da criptococose baseia-se na terapia inicial com anfotericina B, seguida por uma terapia de manutenção com um derivado azólico como fluconazol ou itraconazol. O fluconazol apresenta boa atividade antifúngica frente ao *C. neoformans*. A anfotericina B tem sido usada há mais de 50 anos e continua sendo a primeira opção terapêutica para tratamento das micoses mais graves e disseminadas,<sup>21</sup> sendo reservada para os casos mais graves, devido às frequentes reações adversas.<sup>22</sup>

O estudo da susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos proporciona a obtenção de dados relativamente confiáveis no momento da seleção da terapia a ser empregada para tratamento das infecções fúngicas, principalmente em casos em que na prática clínica ocorram insucessos terapêuticos<sup>22</sup>. Devido ao aumento da incidência das infecções fúngicas, em pacientes com

AIDS, houve um aumento do uso de azóis para o tratamento, assim como seu uso profilático, desencadeando o desenvolvimento de resistência. Por estas razões, também tem sido justificada a necessidade da implantação na rotina laboratorial dos métodos de determinação da susceptibilidade *in vitro* para *C. neoformans* a diferentes antifúngicos. Este procedimento pode ser útil para avaliar a eficácia do tratamento e também acompanhar a evolução da doença.<sup>23</sup>

Nos últimos anos, várias técnicas laboratoriais têm sido empregadas para estudo da resistência *in vitro* a drogas antifúngicas. Houve necessidade de padronização destas técnicas, culminando com a implantação do método padrão de referência, isto é, microdiluição em caldo, proposto pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Métodos alternativos têm sido empregados, sendo o Etest<sup>®</sup> uns dos mais confiáveis representando técnica de fácil aplicação na rotina laboratorial e apresenta boa concordância com CLSI.<sup>24,25</sup>

Diante do exposto, encontra-se justificada a importância da caracterização laboratorial específica das leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*, assim como dos testes de susceptibilidade *in vitro*, para direcionar de maneira mais eficaz e satisfatória a escolha da terapêutica antifúngica, incluindo a avaliação de novas drogas e detecção de cepas resistentes no cenário da AIDS. Vale ressaltar que no Estado do Mato Grosso (Centro-Oeste do Brasil), não foram registrados, até este momento, dados referentes a estes aspectos.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

A síndrome da imunodeficiência adquirida é caracterizada por intensa imunodepressão do hospedeiro, causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), manifestando-se por uma grande variedade de sintomas e sinais clínicos.<sup>26</sup>

A identificação do HIV e da síndrome da AIDS ocorreu há pouco mais de duas décadas, porém o número de pessoas infectadas e doentes tem aumentado vertiginosamente nesse período de tempo.<sup>27</sup>

A síndrome da imunodeficiência adquirida foi reconhecida pela primeira vez nos Estados Unidos da América (EUA) em meados de 1981 em Los Angeles - Califórnia. Logo após, ocorrerem cinco relatos de pneumonias causadas pelo *Pneumocystis carinii* (PCP) em homossexuais jovens, sendo comunicados 26 casos de Sarcoma de Kaposi em homossexuais em Nova York e Califórnia, assim como de outras infecções oportunistas. Em 1982, a doença foi detectada em usuários de drogas injetáveis de ambos os sexos, receptores de transfusão de sangue e hemofílicos. Em 1984 o vírus da imunodeficiência humana foi responsabilizado como o agente etiológico da AIDS. O HIV como todos os retrovírus é um vírus com genoma RNA, pertencente à família *Retroviridae*, subfamília *Lentiviridae*.<sup>3,28,29</sup>

Sua estrutura física foi definida em 1985, caracterizado como um vírus primitivo, de formato esférico, com uma dupla membrana de lipoproteínas (envelope viral) e um código genético de RNA. Além da membrana lipídica, apresenta duas glicoproteínas (gp41 e gp120). Internamente a estas membranas, está à matriz protéica, formada pela proteína p17 e o capsídeo viral, composto pela proteína p24.<sup>28,29</sup>

Duas formas do vírus HIV são conhecidas, o HIV tipo I isolado em 1983, sendo o responsável pela AIDS humana e causador da epidemia mundial apresenta-se distribuído por todo o mundo,<sup>1,12,30</sup> e o HIV tipo II identificado em 1986 em pacientes da África Ocidental, é

mais restrito em regiões da África<sup>1,12,28</sup>, porém há casos diagnosticados na Europa e Américas do Norte e Sul, apresenta estrutura similar ao primeiro, porém parece ser menos virulento.<sup>30</sup>

As doenças retro-virais caracterizam-se pela expressão gênica viral restrita, latência e persistência vitalícia do vírus frente às respostas imune do hospedeiro. A infecção inicial com o HIV tipo I provoca, quando sintomática uma síndrome viral aguda com diversas manifestações caracterizadas por: febre, linfadenopatia, faringite e erupção cutânea. Outros sinais e sintomas que podem ocorrer são: mialgias, artralgias, leucopenia, trombocitopenia, náuseas, diarreias, cefaléia, encefalopatias.<sup>28</sup>

A identificação, em 1981, da síndrome da imunodeficiência adquirida tornou-se um marco na história da humanidade. A epidemia da infecção pelo HIV e da AIDS representa fenômeno global, dinâmico e instável, cuja forma de ocorrência nas diferentes regiões do mundo depende, entre outros determinantes, do comportamento humano individual e coletivo. No Brasil é resultante das profundas desigualdades da sociedade brasileira. A propagação da infecção pelo HIV e da AIDS revela epidemia de múltiplas dimensões e que vem sofrendo transformações epidemiológicas significativas.<sup>3</sup>

Existem atualmente cerca de 40 milhões de indivíduos infectados pelo HIV no mundo, dos quais a metade são mulheres. No Brasil, a prevalência da infecção pelo HIV é de até 0,5%, observando-se uma tendência atual de expansão da epidemia entre as mulheres e um deslocamento dos grandes centros urbanos da região sudeste para as demais regiões geográficas. Desta forma, a razão homem/mulher entre os infectados tem sofrido uma redução gradual de 18,5 na década de 1980 para 1,5 em 2004. A maior taxa de incidência em mulheres foi observada em 2003: 14,1 casos/100 mil mulheres.<sup>1,27</sup>

De 1980 a junho de 2007 foram notificados 474.273 casos de AIDS no País – 289.074 no sudeste, 89.250 no Sul, 53.089 no Nordeste, 26.757 no Centro Oeste e 16.103 no Norte.

Segundo critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS), o Brasil apresenta uma epidemia concentrada, com taxa de prevalência da infecção pelo HIV de 0,6% na população de 15 a 49 anos. Em ambos os sexos, a maior parte se concentra na faixa etária de 25 a 49 anos. No entanto, nos últimos anos houve um aumento percentual de casos na população acima de 50 anos, em ambos os sexos. <sup>1</sup>

Em Mato Grosso, a AIDS foi identificada pela primeira vez em 1984. A partir da década de 90, observou-se disseminação da doença para o interior do Estado. Porém, a capital Cuiabá ainda concentra a maioria dos casos (cerca de 70%). No período de 1984 a junho de 2007, foram notificados no Estado 5.669 casos de AIDS, observando-se aumento progressivo do número de casos, assim como da razão de gênero (feminino/masculino). Dos casos de AIDS notificados, 66% foram do sexo masculino e 34% do sexo feminino. Porém, observa-se que a incidência no sexo feminino vem aumentando consideravelmente, à semelhança de outras regiões do país. Em 1984 a razão masculino/feminino era de 32:1, passando para 1,4:1 em 2003. <sup>31</sup>

Com a introdução da terapia HAART, observaram-se avanços no tratamento da infecção pelo HIV. <sup>32</sup> Pela utilização dessa terapia houve uma supressão da replicação viral em níveis mais baixos e uma recuperação parcial das taxas de linfócitos TCD<sub>4</sub>. Conseqüentemente, a incidência de infecções oportunistas afetando estes pacientes obteve um declínio. No entanto, as infecções oportunistas continuam a ser um problema entre os pacientes com um diagnóstico tardio de infecção pelo HIV e entre os pacientes não-responsivos a terapia HAART. <sup>33</sup>

Essa terapia consiste geralmente em dois análogos nucleosídeos inibidores da transcriptase reversa e pelo menos um inibidor de protease. Ou então inibidores não-nucleosídeos da transcriptase reversa do vírus HIV. Com essa terapia de alta potência houve

uma melhora do sistema imune do hospedeiro, proporcionando o aumento da sobrevida e diminuição da progressão para AIDS.<sup>28</sup> Portanto, com a introdução da HAART e sua distribuição universal e gratuita pelo ministério da saúde, houve uma significativa queda nas taxas de mortalidade por essa doença no país<sup>32</sup>

O regime de tratamento por esta terapia é bastante complexo e possui muitos efeitos colaterais. A aderência é difícil e o tratamento deve ser realizado por toda a vida. O vírus não é erradicado, permanecendo latente no genoma das células T de memória do hospedeiro, pronto para ser reativado quando ocorre suspensão da terapia.<sup>12</sup>

Além disso, na literatura tem sido relatado casos de uma síndrome da reconstituição imunológica em resposta do uso da terapia HAART. Esta síndrome inicia-se após o terceiro mês sob uso dessa terapia, mostrando características de exacerbação da resposta inflamatória, em virtude da recuperação do sistema imunológico contra vários patógenos.<sup>34</sup>

## **2.1 Infecções oportunistas não fúngicas**

São definidas como infecções que dificilmente acometem indivíduos com sistema imunológico hígido, ocorrendo quando um ou mais mecanismos de defesa são inativados por uma determinada patologia ou deficiência imunológica. Desta forma, o individuo torna-se mais susceptível ao aparecimento de infecções.<sup>35</sup> Ao longo da última década têm sido observado aumento de infecções bacterianas e fúngicas tais como: tuberculose, pneumocistose, candidíase, criptosporidiose, neurotoxoplasmose, neurocriptococose, citomegalovirose, dentre outras.<sup>1</sup>

## 2.2 Infecções oportunistas fúngicas

### 2.2.1 Criptococose

É uma infecção fúngica sistêmica, de caráter oportunista, causada pela levedura encapsulada *Cryptococcus neoformans*, a qual possui tropismo pelo sistema nervoso central, respiratório e tegumentar. Afeta com grande frequência os pacientes imunodeprimidos, quase sempre sob a forma de lesões, principalmente nos pulmões e SNC.<sup>36</sup>

Em 1894, Francesco Sanfelice isolou pela primeira vez o *Cryptococcus neoformans*. Este trabalho representou o marco inicial dos estudos sobre criptococose. As leveduras do gênero *Cryptococcus* são classificadas no Reino Fungi, como membros pertencentes à divisão: Eumycota; Filo: Basidiomycota; Ordem: Filobasidiaceae; Gênero: *Cryptococcus*.<sup>36,37</sup>

O gênero *Cryptococcus* é composto por 19 espécies diferentes, entretanto, apenas as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* são passíveis de causar quadros de criptococose humana. Existem outras espécies deste gênero relatadas na literatura que podem ser isoladas da pele humana e que, em raras situações, causam primariamente quadros profundos, de pele e de onicomicoses. Dessa forma, temos as espécies *C. albidus* (quadros de meningites e infecção pulmonar), *C. laurentii* (abscesso pulmonar), *C. terreus* (sapróbico da pele humana), e *C. uniguttulatus* (onicomicose).<sup>39</sup>

Baseando-se nos antígenos específicos da cápsula polissacarídea, o *Cryptococcus neoformans* apresenta cinco sorotipos, (A, B, C, D e AD), sendo subdividido em três variedades: variedade *grubii* (sorotipo A), variedade *neoformans* (sorotipo A, D e AD) e variedade *gattii* (B e C).<sup>39,40</sup> Posteriormente a 2006 ocorreram várias mudanças na taxonomia deste agente, sendo que o *C. neoformans*, que antes compreendia a ordem Filobasidiales, agora foi introduzido na ordem Tremelales. Outra mudança foi baseada em marcadores moleculares, sendo o táxon proposto para este agente o seguinte: a espécie *C. neoformans*

com duas variedades, *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A); *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) e híbridos (sorotipo AD), e *C. neoformans* var. *gattii* – espécie *C. gattii* (sorotipos B e C).<sup>41</sup>

O fungo é denominado *C. neoformans* quando se encontra na fase assexuada e *Filobasidiella neoformans* na fase sexuada. Nos tecidos mostra-se como levedura encapsulada, unibrotante, bibrotante e raramente multibrotante. O *C. neoformans* é um fungo leveduriforme de aproximadamente 5 e 20 µm de diâmetro envolto por uma cápsula espessa composta por polissacarídeos. Esta estrutura morfológica lhe confere defesa perante o processo de fagocitose realizado por macrófagos.<sup>36</sup> O fungo é comumente encontrado na natureza, sendo freqüentemente associada com fezes de pombos e material vegetal. É bastante encontrado em áreas urbanas contaminadas com dejetos de pombos, apresenta distribuição cosmopolita, sendo uma micose oportunista bastante comum em pacientes HIV positivos.<sup>42,43,44</sup>

Já a espécie *C. gattii* apresenta distribuição limitada, sendo encontrado no meio campestre de áreas geográficas de clima tropical e subtropical. O habitat de *C. gattii* vem sendo relacionado ao cultivo de espécies de Eucaliptos, em especial *Eucalipytus camadulensis* e *Eucalipytus tereticornis*, devido à presença de grandes quantidades de lignina e compostos polifenoles contidos nos eucaliptos.<sup>44,45,46</sup> Em geral, essa espécie acomete indivíduos imunocompetentes.<sup>10,47</sup>

Macroscopicamente, as colônias de *C. neoformans*, semeadas em ágar-Sabouraud e/ou extrato de malte incubado a 25°C, apresentam-se como colônias brilhantes, viscosas e úmidas, com tonalidade creme. Após um mês, as colônias apresentam textura mucóide e aspecto de leite condensado. Algumas amostras após sucessivos repiques perdem esse aspecto mucoso e tornam-se secas. O *C. neoformans* desenvolve-se bem à temperatura de 37°C, não formam

micélio nem pseudomicélio. Considerando o metabolismo de carboidratos, não são fermentadoras. Pelo contrário, são assimilativas, possuindo capacidade de utilizar inositol como única fonte de carbono.<sup>36, 47, 48</sup>

O *C. gattii* tem maior capacidade de assimilar creatinina como fonte de nitrogênio do que o *C. neoformans*. Vale ressaltar, também, que as leveduras desse gênero são capazes de produzir melanina através da enzima fenol-oxidase presente em sua parede celular. Esta enzima é capaz de oxidar substâncias fenólicas presentes nos meios de cultura preparados com extratos vegetais (cenoura, batata) ou sementes de niger (*Guizotia abyssinica*), produzindo pigmento tipo melanina. Devido esta produção de melanina pelas colônias de *C. neoformans* semeadas em ágar niger, as colônias de *C. neoformans* podem ser diferenciadas de outras leveduras não pertencentes ao gênero *Cryptococcus*.<sup>36, 49, 50</sup>

A criptococose é adquirida através da inalação de esporos aerossolizados, sendo que, na maioria das vezes, a infecção inicia-se com foco primário pulmonar assintomático. Em indivíduos imunocompetentes o *Cryptococcus neoformans* permanece nos pulmões e geralmente é eliminado pelo sistema imunológico. Já os pacientes infectados pelo HIV são susceptíveis à infecção pelo *C. neoformans* e sua manifestação é progressiva, podendo ocorrer disseminação via hematogênica para órgãos extra-pulmonares<sup>28</sup> tornando-se causa comum de meningite e doença disseminada nestes pacientes.<sup>51</sup>

#### **2.2.1.1 Fatores de virulência e patogênese**

O *C. neoformans* é considerado um patógeno oportunista. Os fatores ligados ao estabelecimento da criptococose não dependem apenas da virulência inerente ao fungo, mas também de como este se esquivava da resposta imunológica do hospedeiro.<sup>52</sup> Os principais

fatores de virulência do *C. neoformans* compreendem: termo tolerância a 37°C, produção de fenoloxidase e presença da cápsula polissacarídea.<sup>36, 48, 53, 54, 55</sup>

A termo tolerância (habilidade do fungo de sobreviver e se multiplicar a temperatura de 37°C) é uma propriedade comum dos fungos patogênicos tais como *C. neoformans*, *H. capsulatum*, *Candida* spp, *S. schenckii* entre outros. A maioria dos isolados de *C. gattii* que não cresce de forma eficiente a 37°C não é capaz de produzir infecção fatal em camundongos, enquanto que isolados de *C. neoformans* germinam e crescem a 37°C produzindo infecção letal.<sup>55,56</sup>

A melanina interfere na virulência da levedura, com grande tropismo pelo SNC, o qual se apresenta rico em catecolaminas como a 3,4- hidroxifenilamina (DOPA). A melanogênese em vários sistemas biológicos inicia-se com a oxidação da tirosina para DOPA. Após uma série de reações ocorre à formação de melanina como produto final da reação. No entanto, outros organismos podem ter a DOPA ou catecolaminas para formar a melanina através de uma fenoloxidase.<sup>55,57</sup> O *C. neoformans* utiliza catecolaminas do cérebro do hospedeiro para produzir melanina protegendo desse modo à arginina da ação oxidativa pela remoção dos radicais livres. As células contendo este pigmento de melanina são menos susceptíveis a ação da anfotericina B.<sup>36,57</sup>

A presença da cápsula mucopolissacarídea é uma característica distinta, sendo considerado importante fator de virulência antifagocítico e imunodepressor. Aproximadamente 90% da cápsula é constituída pelos polissacarídeos glucuronoxilomanana, galactoxilomanana e manoproteína.<sup>53, 54</sup> A diferença na estrutura das glucuronoxilomananas de sua parede celular permitiu a identificação dos cinco sorotipos conhecidos. O tamanho da cápsula é determinado pelo genótipo e condições de crescimento oferecidas sendo que as leveduras mostram cápsulas pequenas quando no ambiente e espessas durante a infecção.<sup>48, 55</sup>

### 2.2.1.2 Caracterização de leveduras do gênero *Cryptococcus*

O diagnóstico da criptococose baseia-se em três fundamentos: a demonstração do fungo no material clínico por meio do exame direto e o isolamento em cultura e através de provas bioquímicas para a diferenciação das espécies e testes sorológicos. As leveduras do gênero *Cryptococcus* coram-se bem por tinta da China ou tinta nanquim na realização do exame direto devido a sua cápsula não permitir a penetração do corante e com isso podem ser visualizadas estruturas que lembram um “céu estrelado” com o fundo negro e as leveduras transluminescentes, <sup>36</sup> pode ser realizado nas mais variadas amostras clínicas como, por exemplo: líquido, sangue, escarro, lavado bronco-alveolar (LBA), urina, secreção de lesões cutaneomucosas, biópsias, secreções prostáticas, punções entre outros. <sup>58,59</sup>

Estas leveduras são cultivadas normalmente em ágar Sabouraud tanto a temperatura ambiente quanto a 37°C; crescem de 48 a 72 horas ou até em uma ou duas semanas. Suas colônias apresentam-se de coloração creme planas ou ligeiramente elevadas, brilhantes, úmidas que logo se tornam mucóides e tendem a assumir uma coloração acastanhada. O *C. neoformans* é freqüentemente cultivado em ágar niger (*Guizotia abyssinica*). Neste meio apresentam coloração marrom escura, pois, o ágar niger é rico em fenóis, os quais são oxidados pela fenoloxidase sintetizada por este fungo caracterizando as colônias com uma coloração marrom escura. As espécies *C. neoformans* e *C. gattii* deste gênero são capazes de produzir melanina quando semeadas em ágar niger formando colônias marrom-escuras. <sup>36, 49, 60, 61</sup>

*C. gattii* cresce bem em ágar composto por substâncias que apresentam canavanina e glicina em sua composição como é o caso do meio L-canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB). Para diferenciar as espécies de *C. neoformans* e *C. gattii* pode ser utilizado o meio CGB sendo este teste baseado em dois parâmetros metabólicos. Isolados da variedade *gattii*:

assimilam a glicina como única fonte de carbono e nitrogênio e são resistentes à canavanina. Portanto, o teste positivo é observado quando a cor amarelo-esverdeada do meio torna-se azul-cobalto como resultado da alcalinização do meio em decorrência da amônia liberada durante a degradação da glicina *C. neoformans* não demonstra mudança na coloração do meio por não usar essa via metabólica.<sup>62</sup>

O teste da urease é uma prova bioquímica utilizada para identificação do gênero *Cryptococcus*, pois, leveduras pertencentes a este gênero são capazes de realizar a hidrólise da uréia com produção de amônia. A alcalinização do meio, por este processo, causando a mudança do indicador de pH neutro para básico evidenciando, uma coloração de tom róseo intenso.<sup>36, 62</sup> Uma diferença existente entre as espécies é a inibição da urease por *C. gattii* na presença de EDTA. Este fato não ocorre com *C. neoformans*.<sup>36</sup>

### 2.2.2 Candidíases

As primeiras infecções causadas por leveduras, em geral, foram descritas a partir do século V antes de Cristo. Porém, somente em 1839 ocorreram as primeiras observações microscópicas de leveduras do gênero *Candida*.<sup>63</sup>

As leveduras são microrganismos predominantemente unicelulares, imóveis e congregam um grupo funcional de organismos heterotróficos que colonizam substratos contendo fontes de carbono. Com relação à faixa de temperatura são classificadas como mesófilos crescendo preferencialmente entre 18° e 45° C. Taxonomicamente pertencem a 100 gêneros entre as classes *Ascomycetes* e *Basidiomycetes*.<sup>64</sup>

As leveduras que compreendem o gênero *Candida* são classificadas no Reino Fungi, como membros do Phylum *Ascomycota*, divisão *Deuteromycetes*, ordem *Saccharomycetales*,

família Saccharomycetaceae.<sup>11</sup> Este gênero compreende aproximadamente 200 espécies que se reproduzem assexuadamente por brotamento. Essas leveduras possuem tanto a capacidade fermentativa quanto assimilativa, sendo capazes de crescer em uma variedade de substratos orgânicos.<sup>65</sup>

São encontradas em vários nichos ecológicos como no meio ambiente, sendo isoladas em solos, água, vegetais e também pode ser encontradas habitando o corpo humano como comensais. Podem estar presentes em amostras clínicas em decorrência de contaminação ambiental, colonização ou por processo infeccioso. Portanto, o significado de sua presença em material biológico, depende do número de amostras positivas com o mesmo organismo em um mesmo paciente, do número de colônias formadas e se o material é proveniente de sítios estéreis ou não.<sup>66</sup>

No homem, a *C. albicans* tem como habitat a mucosa digestiva e por proximidade anatômica a mucosa vaginal. O espectro das candidíases é bastante extenso, indo desde colonização de mucosas até quadros sistêmicos com a invasão de vários órgãos. As mucosas mais freqüentemente envolvidas são as da boca, vagina e esôfago.<sup>38</sup>

A cavidade oral é colonizada por *C. albicans* ou também por outras espécies de leveduras do gênero *Candida* em 40% a 60% nos indivíduos saudáveis. No momento em que houver presença de fatores predisponentes estas leveduras poderão tornar-se patogênicas e provocar candidíases com manifestações agudas ou crônicas.<sup>67, 68</sup>

As diferentes espécies de leveduras do gênero *Candida* possuem suas características próprias de patogênese. Contudo, são freqüentemente observadas em quadros infecciosos essencialmente oportunistas que acometem pacientes com algum tipo de imunodepressão. Uma série de fatores predisponentes vem sendo associados à ocorrência destas candidíases

podendo ser agrupados àqueles inerentes ao hospedeiro e por outro, naqueles extrínsecos ou referentes aos procedimentos médicos iatrogênicos.<sup>48, 69, 70</sup>

As candidíases podem acometer vários tecidos do corpo humano apresentando diversos tipos de apresentações clínicas, podendo ser superficiais, localizadas, profundas ou até mesmo disseminadas. As manifestações clínicas podem ser: agudas, subagudas, crônicas ou espontâneas. Geralmente estão associadas e progridem de acordo com o grau de comprometimento do sistema de defesa do hospedeiro.<sup>69</sup>

### 2.2.2.1 Caracterização de leveduras do gênero *Candida*

Das 200 espécies que compreendem o gênero *Candida* 15 são de importância médica. A espécie isolada em maior frequência principalmente em quadros de candidíase orofaríngea é a *C. albicans*; no entanto outras espécies denominadas “não-*albicans*”, tais como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis* tem aumentado significativamente em distintos quadros de infecção.<sup>33, 71, 72, 73</sup>

As técnicas convencionais para identificação das espécies de leveduras do gênero *Candida* são baseadas principalmente em métodos bioquímicos tais como: fermentação e assimilação de carboidratos segundo Kurtzman & Fel (1998)<sup>64</sup>, habilidade em formar tubo germinativo a 37°C em soro e produzir clamidoconídios em agar fubá acrescido de Tween 80, à exceção de *Candida dubliniensis*, tendo em vista que a mesma apresenta similaridades fenotípicas à *C. albicans*.<sup>64, 71</sup>

*C. dubliniensis* foi descrita por Sullivan et al. (1995)<sup>71</sup>, sendo frequentemente isolada de cavidade oral de pacientes HIV positivos. Sua prevalência varia entre várias regiões, sendo mais encontrada no hemisfério norte e mais raramente na América do Sul segundo alguns estudos.<sup>74, 75, 76</sup> É fenotipicamente semelhante a *C. albicans*, sendo sua

distinção mesmo um desafio para os laboratórios de micologia. A importância da sua correta identificação está fundamentada no perfil epidemiológico e nas intervenções terapêuticas. A maioria dos isolados de *C. dubliniensis* mostraram ser susceptíveis à drogas antifúngicas atualmente utilizadas, porém, têm sido demonstrado que elas podem desenvolver rapidamente resistência *in vitro* ao fluconazol.<sup>77,78</sup>

Diante da impossibilidade dos testes fenotípicos com a finalidade de caracterizar a espécie *C. dubliniensis*, verifica-se a necessidade de recorrer a técnicas moleculares para detecção de características genotípicas. Para tanto, as mais utilizadas são: a reação em cadeia de polimerase (PCR) e a amplificação randômica do DNA (RAPD). Entretanto, métodos moleculares tornam-se restritos aos laboratórios de pesquisa e freqüentemente não são inseridos na rotina laboratorial, devido ao custo. Desta forma, os testes fenotípicos vêm sendo aperfeiçoados com a finalidade de serem utilizados para estratégias de triagem.<sup>79,80</sup>

A espécie *C. albicans* pode ser identificada de forma rápida e presuntiva, primariamente através da prova do tubo germinativo onde se verifica a formação de tubos germinativos na amostra incubada com soro bovino fetal a 37°C por 3 horas. A identificação das outras espécies é confirmada através de provas bioquímicas que consistem na capacidade de cada espécie assimilar e fermentar compostos químicos que representam diferentes fontes de carbono e nitrogênio. Há alguns anos estão disponíveis “kits” comerciais para identificação de leveduras pela técnica de turbidimetria.<sup>48</sup>

O microcultivo em ágar fubá acrescido de Tween 80, incubado a 28° C por até sete dias evidencia a presença de clamidósporos terminais quando o isolado é *C. albicans*. As outras espécies de leveduras do gênero *Candida* nestas condições apresentam características micromorfológicas tais como: tipo de brotamento, presença ou não de pseudo-hifas e distribuição dos blastoconídios ao longo destas estruturas.<sup>81</sup>

O CHROMagar Candida é um meio cultura cromogênico que permite a identificação presuntiva e diferencial de leveduras clinicamente importantes dentro de 24 a 48 horas, com base na formação de cores fortemente contrastantes das colônias.<sup>82</sup> Este meio contém substrato cromogênico que é metabolizado por diferentes enzimas de *Candida* spp como a  $\beta$ -glucosaminidase, a qual permite a formação de colônias em tonalidades distintas: verdes (*C. albicans*), azuis (*C. tropicalis*) e rosadas (*C. krusei*).<sup>83</sup>

Os perfis de assimilação e de fermentação bioquímicas podem ser também ser determinados por sistemas comerciais de identificação como o API ID 32 AUX e o API 20 C AUX (Bio Meriéux).<sup>84</sup> Já foi relatada por Alves et al. (2005)<sup>77</sup> uma porcentagem significativa de isolados de *C. dubliniensis* com perfil duvidoso quando foram submetidas ao API ID 32 AUX. Dos dezenove isolados de *C. dubliniensis* testados, treze culturas foram identificadas como *C. dubliniensis*, mas as demais (seis) evidenciaram perfil duvidoso, embora o software do sistema sugerisse 83,6% de chances das mesmas pertencerem à espécie *C. dubliniensis*. A literatura têm registrado grande variabilidade fenotípica com esta espécie e por isto, as identificações obtidas com este sistema deverão ser consideradas como presuntivas.<sup>77</sup>

### 2.3 Criptococose e HIV (Epidemiologia, distribuição de espécies)

Infecções oportunistas são observadas com bastante frequência em indivíduos imunocomprometidos particularmente nos portadores do HIV. A criptococose, micose de caráter sistêmico mais frequente nestes pacientes é a terceira causa de doença oportunista do sistema nervoso central. Sua prevalência varia de 2,9 a 13,3% representando importante causa de mortalidade na AIDS.<sup>58</sup> O comprometimento da imunidade celular é considerado o principal fator predisponente para infecção pelo *C. neoformans*.<sup>39</sup>

Com o advento da AIDS, os casos de criptococose começaram a ocorrer com maior frequência, acometendo cerca de um terço dos pacientes HIV positivos. Atualmente nos Estados Unidos da América mais de 50% das infecções por *Cryptococcus* spp acometem estes pacientes. O agente etiológico mais comumente encontrado neste grupo de pacientes é o *C. neoformans*. A criptococose em pacientes com AIDS geralmente manifesta-se com febre, cefaléia, mal estar e vômitos. Lesões cutâneas simulando molusco contagioso ocorrem em aproximadamente 7 a 8% dos casos.<sup>36</sup>

A criptococose em pacientes infectados pelo HIV geralmente se desenvolve quando as taxas de CD<sub>4</sub> encontram-se abaixo de 100 céls/mm<sup>3</sup>. O *C. neoformans* apresenta preferência pelo SNC, líquido cefalorraquidiano (LCR), pela alta concentração de nutrientes assimiláveis por este fungo, a falta de atividade do sistema complemento e a fraca ou ausente resposta inflamatória no tecido cerebral. Além disso, o SNC é rico em catecolaminas, que podem ser utilizadas por este fungo para produção de melanina.<sup>36</sup>

A criptococose causada pelo *C. neoformans* vem assumindo papel importante na história da AIDS. É considerada uma das micoses mais comuns nos indivíduos com AIDS afetando principalmente o SNC em particular as meninges.<sup>9</sup>

Em geral o *Cryptococcus* spp adentra no organismo humano através do trato respiratório inicialmente sob forma de células pequenas, não capsuladas. A patogenicidade estaria vinculada à produção de cápsula. Segundo Sukroongreung et al. (1998)<sup>85</sup> há evidências sugestivas de que os basidiosporos sejam uma forma de propágulos infectantes.

Enquanto a capacidade do sistema imune em conter estas leveduras estiver funcionando não haverá manifestação de doença, porém quando o hospedeiro perde esta capacidade as leveduras podem começar a se multiplicar e eventualmente ocasionar a criptococose.<sup>38</sup>

A criptococose manifesta-se em quadros clínicos variados podendo acometer os pulmões, pele, SNC e menos freqüentemente acometem outros órgãos. Sua progressão pode ser aguda, subaguda ou crônica.<sup>86</sup>

As lesões provocadas por *C. neoformans* no SNC são variadas e podem acometer diferentes locais. No entanto, em pacientes portadores do HIV a região mais freqüentemente acometida são as meninges. O início do quadro tende a ser agudo e de rápida progressão. Em geral, a meningite pode ser subaguda ou crônica e suas complicações consistem em: hidrocefalia, aumento da pressão intracraniana associada a edema cerebral e resistência do fluxo liquórico. Os sintomas mais comuns são: febre, cefaléia, náuseas e vômitos, podem ocorrer também rigidez de nuca e, alguns sintomas oculares como fotofobia, perda de visão podem aparecer. Em casos de meningoencefalites podem ocorrer alterações do estado mental (confusão, letargia e alterações de personalidade).<sup>19, 28, 36</sup> A coexistência de infecção extra neurológica é observada em 30 a 75% dos casos acometendo pulmões, sangue, urina e medula óssea.<sup>19</sup>

A infecção pulmonar é bastante variável podendo ser única, primária ou parte de uma disseminação hematogênica. Pode ser desde extremos da colonização saprofítica sem evidências clínicas ou radiológicas ou até uma síndrome de angústia respiratória totalmente desenvolvida em pacientes com AIDS. Os achados radiológicos consistem em: pneumonite focal, nódulos pequenos solitários ou múltiplos em indivíduos assintomáticos ou em sintomáticos com sintomas leves a moderados Estes sintomas incluem: febre, mal estar, tosse, escarro escasso, dor pleurítica ou em raros casos hemoptise.<sup>28</sup>

As lesões cutâneas são relativamente freqüentes em 10 a 15% dos casos e manifestam-se como pápulas, pústulas, nódulos ou úlceras que drenam.<sup>28, 86</sup> Apresentam tropismo pela face e membros e são semelhantes às causadas por *Molluscum contagiosum* ou lesões

herpéticas. O comprometimento cutâneo primário resulta de inoculação traumática da levedura. Entretanto, a maioria dos casos em que se observa comprometimento cutâneo é secundário a uma disseminação secundária da infecção.<sup>36</sup>

A criptococose sistêmica aparece freqüentemente como consequência da disseminação do foco pulmonar principalmente na criptococose não tratada em pacientes imunocomprometidos. A principal via de disseminação é a sanguínea. Contudo, a via linfática pode contribuir para essa disseminação. Outros órgãos também podem ser comprometidos tais como: fígado, rins, baço, gânglios linfáticos e supra-renais, sistema esquelético entre outros.

28, 36, 47

O acometimento genitourinário na criptococose tal como pielonefrite, e lesões do trato genitourinário baixo é considerado raro. Com relação à próstata, a infecção por *C. neoformans* não causa sintomas de prostatite apesar de o agente ser isolado do tecido prostático ocasionalmente.<sup>58</sup> Alguns autores consideram a próstata como uma fonte residual de *Cryptococcus* spp explicando assim as freqüentes recaídas em pacientes imunossuprimidos.<sup>38</sup> A presença desta levedura na urina sem evidência de lesão no trato urinário pode ser relacionada à fungemia, seguida de passagem pelo endotélio vascular e membrana basal glomerular alcançando filtrado tubular onde encontra progressivamente elevada osmolaridade, concentração de uréia e creatinina constituindo condições metabólicas essas favoráveis à sua reprodução.<sup>58</sup>

## 2.4 Candidíase e HIV (Epidemiologia, distribuição de espécies)

### 2.4.1 Candidíase Oral

A candidíase oral é uma das infecções fúngicas oportunistas mais fortemente associadas à infecção pelo HIV. O primeiro relato do paciente com AIDS já mencionava a candidíase bucal. Na infecção pelo HIV o surgimento de candidíase oral é sinal de mau prognóstico com progressão para AIDS em até um ano na maioria dos pacientes. Quando a terapêutica antiretroviral e profilaxia primária desta infecção fúngica não é instituída adequadamente aumenta-se o risco de progressão da doença, sendo ainda maior quando associado à redução da taxa de linfócitos TCD<sub>4</sub>.<sup>28, 87</sup>

A progressão da imunodeficiência mediada por célula aliada à diminuição da contagem de linfócitos CD<sub>4</sub> igual ou menor que 200 células/mm<sup>3</sup> representam um importante fator de risco para o desenvolvimento de candidíases.<sup>89</sup>

As espécies de leveduras do gênero *Candida* são organismos fúngicos comensais em indivíduos hígidos, sendo que estes apresentam imunidade específica para estas leveduras. Porém, quando há um desequilíbrio na resposta imunológica do hospedeiro estas leveduras podem causar infecções fúngicas oportunistas como em pacientes infectados pelo HIV.<sup>5</sup>

A candidíase oral é a manifestação mais prevalente em pacientes infectados pelo HIV bem como o risco de desenvolver esta infecção torna-se maior quando as taxas de CD<sub>4</sub> estão abaixo de 200 células/mm<sup>3</sup> e a carga viral encontra-se em níveis elevados. A *C. albicans* representa a espécie mais comum isolada em candidíase oral, entretanto, as outras espécies têm emergido com frequência. A colonização por *Candida* spp na mucosa oral de pacientes HIV prediz o subsequente desenvolvimento de candidíase oral.<sup>88</sup>

As manifestações clínicas causadas pela infecção por leveduras do gênero *Candida* em pacientes HIV positivos geralmente são superficiais afetando a mucosa orofaríngea, esofágica e vaginal. A candidemia e infecções localizadas em outros órgãos como, por exemplo: sistema nervoso central, pulmões, e olhos são menos freqüentes neste grupo de pacientes.<sup>19</sup>

Em quadros de candidíase oral, a espécie *C. albicans* é responsável por mais de 70% dos isolamentos. Outras espécies componentes deste gênero também têm sido encontradas com freqüência na mucosa oral de pacientes infectados pelo HIV causando a candidíase tais como: *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*.<sup>72</sup>

As manifestações clínicas da candidíase oral são classificadas por alguns autores como: pseudomembranosa (aguda e crônica), eritematosa (aguda e crônica), queilite angular e candidíase mucocutânea. Estas apresentações clínicas são variáveis e muitos pacientes podem desenvolver um ou mais tipos.<sup>19, 28, 68, 72</sup>

A candidíase pseudomembranosa apresenta-se como placas branco-acinzentadas, destacáveis na língua, mucosa gengival e palato.<sup>51</sup> Esta forma clínica é comum entres os pacientes HIV e representa um importante marcador para o desenvolvimento da AIDS nestes pacientes. Clinicamente iniciam-se por pequenos pontos esbranquiçados na mucosa que rapidamente tornam-se confluentes para formar pseudomembranas de coloração esbranquiçada aderidas à mucosa.<sup>89</sup>

A candidíase atrófica também conhecida como eritematosa, apresenta-se na forma de eritemas e atrofia localizadas, sobretudo em palato.<sup>51</sup> É uma lesão secundária a um quadro de candidíase pseudomembranosa caracterizando-se por eritema no dorso da língua.<sup>38</sup> Nos pacientes HIV positivos é a manifestação mais freqüente encontrada nos estágios iniciais da imunodepressão.<sup>72</sup>

Queilite angular caracteriza-se por um enrijecimento das comissuras labiais com a presença de indutos esbranquiçados com o aparecimento de fissuras e formação de crostas.<sup>38, 51, 72</sup> Essas lesões têm início por maceração no ângulo de junção lábio superior com inferior. As fissuras que se formam são recobertas por uma camada cremosa que tende a dessecação, formando as crostas podendo sangrar facilmente. As lesões podem ser ainda unilaterais ou bilaterais e uma extensão da lesão à mucosa bucal e/ou à pele peribucal pode ser produzida.<sup>38</sup>

A candidíase hiperplásica crônica conhecida também como candidíase leucoplásica caracteriza-se pelo aparecimento de placas ou pequenos nódulos aderidos firmemente à cavidade oral principalmente na língua, bochechas e lábios, evidenciando-se um contorno eritematoso das placas. Essas lesões se diferenciam da forma pseudomembranosa em função de sua forte aderência às mucosas.<sup>24, 38, 72</sup>

#### **2.4.2 Candidíase Orofaríngea**

A Candidíase orofaríngea é uma das infecções fúngicas oportunistas mais frequentes entre pacientes com AIDS manifestando-se em 80 a 95% desses pacientes, especialmente quando as contagens de linfócitos T CD4 estão abaixo de 200 células/mm<sup>3</sup>. A natureza prolongada da AIDS predispõe os pacientes a estes episódios recorrentes de COF que pode aumentar em frequência e gravidade com a progressiva infecção pelo HIV.<sup>28</sup> O declínio das taxas de linfócito TCD<sub>4</sub> é rotineiramente empregado como medida de células do sistema imunológico do hospedeiro e funciona como marcador de progressão da infecção pelo HIV.<sup>24, 90, 91</sup> Observa-se inflamação da mucosa orofaríngea podendo ser de origem endógena por algum desequilíbrio entre hospedeiro e leveduras que colonizam a mucosa oral, principalmente *C. albicans*.<sup>92</sup>

Aproximadamente 90% dos pacientes com o vírus da imunodeficiência adquirida apresentarão episódios sintomáticos de COF<sup>88</sup> e em alguns casos, com a progressão da doença, poderão ocorrer episódios recorrentes.<sup>5</sup>

Além disso, foi demonstrado que o aumento da incidência de infecções oportunistas está relacionado paralelamente com aumento progressivo da imunodeficiência ocasionada pelo HIV. Isto parece ser improvável, no entanto o declínio da contagem de CD4 associado à imunodeficiência do hospedeiro é unicamente responsável pelo aumento da incidência de COF.<sup>93</sup>

### **2.4.3 Candidíase Esofágica**

Em muitos pacientes com AIDS a candidíase oral acomete o esôfago. Entretanto, há chances em relação ao desenvolvimento de esofagite por leveduras do gênero *Candida*, mesmo na ausência de candidíase oral. Os sintomas mais frequentes de candidíase esofágica são: odifagia e dor retroesternal.<sup>94</sup>

### **2.4.4 Candidíase vaginal e infecções sistêmicas**

Em contraste, a candidíase vulvovaginal (VVC) e infecções sistêmicas por leveduras do gênero *Candida* são muito menos frequentes nestes pacientes indicando a diversidade e compartilhamento da resposta imune do hospedeiro frente às infecções por estes microrganismos. Tanto a imunidade inata quanto a imunidade adquirida desempenham um papel importante na manutenção da *C. albicans* em seu estado comensal assim como proteção frente à infecções sistêmicas.<sup>5, 25</sup>

#### **2.4.5 Onicomicose ocasionada por leveduras do gênero *Candida***

Pacientes imunodeprimidos fazem parte do grupo de risco para onicomicoses. Alguns autores acreditam que essas infecções estejam presentes em mais de 30% dos indivíduos com sorologia positiva para o HIV. Neste caso, o maior índice ocorre quando esses pacientes apresentam declínio na contagem de linfócitos T CD4+ no sangue periférico.<sup>95</sup>

#### **2.5 Drogas Antifúngicas**

Os fungos são microrganismos que se encontram no meio ambiente em solos, na água, nos vegetais, no ar, nos animais e em detritos em geral. São eucarióticos, heterotróficos e possuem parede celular sendo microrganismos mais complexos e evoluídos.<sup>96</sup>

O grupo das drogas azólicas teve seu uso clínico iniciado em meados da década de 1970 causando grande impacto no cenário da terapia antifúngica devido a seu largo espectro de ação.<sup>97</sup>

A partir de 1970 têm surgido um aumento na incidência das infecções fúngicas sistêmicas secundárias graves. Vários fatores contribuíram para isso sendo que um deles foi o uso generalizado de antibióticos de amplo espectro, que eliminam ou diminuem as populações bacterianas não-patogênicas as quais em certas ocasiões competem com os fungos. Além disso, a disseminação da AIDS, o uso em larga escala de imunossupressores ou agentes quimioterápicos para tratamento de câncer, transplantes renais e de medula óssea, a prática de procedimentos invasivos, como cirurgias, uso de cateteres entre outros também contribuíram para o aumento das infecções fúngicas oportunistas.<sup>12,96</sup>

A maior parte das drogas antifúngicas que compõe o arsenal terapêutico para combate das infecções fúngicas disponíveis até o momento apresentam como alvo os esteróis da membrana celular fúngica. Estas estruturas se assemelham às células humanas e, portanto, como conseqüências destas similaridades bioquímicas e fisiológicas o uso destas drogas antifúngicas tornam-se limitadas em virtude da toxicidade significativa. Poucos são os compostos que exibem seletividade suficiente para uso nas infecções fúngicas que acometem humanos.<sup>97</sup>

Os fármacos antifúngicos atuais podem ser divididos em dois grupos: o primeiro, os antifúngicos que ocorrem naturalmente, tais como os *polienos* e as *equinocandinas* e o segundo, os fármacos sintéticos incluindo os *azóis* e as *pirimidinas fluoradas*.<sup>12</sup>

### **2.5.1 Polienos**

#### **2.5.1.1 Anfotericina B**

Assim como outros antibióticos poliênicos a anfotericina B atua na membrana celular fúngica onde interfere com a permeabilidade e as funções de transporte. A anfotericina B provavelmente possui mais de um mecanismo de ação. Porém, o mais importante é a sua capacidade de formar grandes poros na membrana celular. Ela apresenta uma ação seletiva ligando-se avidamente às membranas dos fungos e de alguns protozoários e menos avidamente às células dos mamíferos. Ela não se liga de forma alguma às bactérias. A base dessa especificidade relativa é a grande afeição do fármaco pelo ergosterol, um esterol da membrana fúngica que não é encontrado nas células animais. A anfotericina B é ativa contra a maioria dos fungos e das leveduras e é considerado padrão-ouro para tratamento das infecções fúngicas disseminadas.<sup>12, 98</sup>

Este fármaco é pouco absorvido por via oral sendo usado neste caso apenas em infecções fúngicas do trato gastrintestinal superior. Pode ser utilizada topicamente com sucesso. Porém, para tratamento das infecções fúngicas sistêmicas é geralmente utilizada por via intravenosa de forma lenta, formando complexos com lipossomos ou com outras preparações lipídicas. Isso melhora a farmacocinética e reduz efeitos colaterais.<sup>12, 99</sup>

A anfotericina B se liga fortemente a proteínas. Ela penetra pouco nos tecidos e em membranas, inclusive a barreira hematoencefálica, embora seja encontrada em altas concentrações nos exsudados inflamatórios e possa atravessar esta barreira mais prontamente quando as meninges encontram-se inflamadas. Sua eliminação ocorre muito lentamente pelos rins, sendo encontrados traços deste medicamento na urina por dois meses ou mais após o fim da administração.<sup>12, 100</sup>

O efeito adverso mais grave da anfotericina B é sem dúvida a toxicidade renal pois algum grau de redução da função renal ocorre em mais de 80% dos pacientes. A hipocalcemia ocorre em 25% dos pacientes necessitando de suplemento de cloreto de potássio. A hipomagnesemia também pode ocorrer e a anemia pode ser um problema adicional. Outros efeitos adversos incluem: o comprometimento da função hepática, trombocitopenia e as reações anafiláticas. A injeção freqüente resulta inicialmente em calafrios, febre, zumbido e cefaléia e cerca de um em cada cinco pacientes vomita. Além disso, as injeções intratecais podem causar neurotoxicidade e aplicações tópicas causam erupções cutâneas. As preparações lipossomo-encapsuladas e com complexos lipídicos não possuem maior eficácia que o convencional, mas provocam menos efeitos adversos.<sup>12, 101</sup>

Lipossomas e outras estruturas lipídicas são utilizados para transportar e aumentar o índice terapêutico de fármacos. Três formulações lipídicas da anfotericina B estão disponíveis para uso médico: lipossomal, em dispersão coloidal e em complexo lipídico. Essas

preparações apresentam menores efeitos adversos, menor toxicidade renal mas possui discreta hepatotoxicidade.<sup>99, 102</sup> Assim, o principal benefício destas preparações é a maior segurança quanto à toxicidade celular no uso prolongado da anfotericina B.<sup>103</sup>

Quanto à formulação lipossomal, inicialmente se recomenda uma dose diária de 1 mg/kg que pode ser aumentada subseqüentemente até 3 mg/kg. Essa formulação deve ser infundida em um período de 30 a 60 minutos e é mais bem tolerada que a apresentação convencional.<sup>102</sup> A maioria dos estudos clínicos, abertos ou controlados, mostraram eficácia comparável entre anfotericina B desoxicolato - 0,6 a 1,5 mg/Kg de peso corporal/dia e formulações lipídicas administradas em doses três vezes maiores.<sup>99, 103, 104</sup>

#### **2.5.1.2 Equinocandinas**

As equinocandinas compõem-se de um anel de seis aminoácidos ligados a uma cadeia lateral lipofílica. Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição da síntese de 1,3- $\beta$ -glicano, um polímero de glicose que é necessário para manter a estrutura das paredes celulares fúngicas. Na ausência deste polímero, as células fúngicas perdem a integridade e a lise rapidamente se segue.<sup>12, 105</sup>

A caspofungina apresenta um amplo espectro de ação contra uma grande variedade de fungos e comprovou-se efetiva no tratamento da candidíase e de formas da aspergilose invasiva que são refratárias à anfotericina B. Sua via de administração é por via intravenosa, uma vez por dia e sua meia-vida plasmática em humanos é de 9-10 horas.<sup>106, 107</sup>

## 2.5.2 Agentes antifúngicos sintéticos (azóis)

Os azóis representam um grupo de agentes fungistáticos sintéticos com amplo espectro de atividade baseado nos núcleos imidazol ou triazol. O mecanismo de ação consiste em inibição da enzima fúngica do citocromo P450, lanosina 14 $\alpha$ -demetilase que é responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol, o principal esterol da membrana fúngica. A depleção resultante de ergosterol altera a fluidez da membrana e desta forma interferindo na ação das enzimas associadas à membrana. A depleção do ergosterol da membrana reduz os locais de ligação para anfotericina.<sup>12</sup>

### 2.5.2.1 Cetoconazol

O cetoconazol foi o primeiro azol administrado por via oral para tratamento das infecções fúngicas sistêmicas. É eficaz contra vários tipos diferentes de microrganismos. No entanto, é tóxico e a recidiva é comum depois tratamento aparentemente bem sucedido. É bem absorvido pelo trato gastrointestinal e é amplamente distribuído através dos tecidos e dos líquidos teciduais, porém não atinge concentrações terapêuticas no SNC. Este fármaco é metabolizado no fígado e eliminado na bile e na urina, sendo sua via plasmática de 8 horas.<sup>12</sup>

97

O maior risco do cetoconazol é a toxicidade hepática, a qual apesar de rara pode ser fatal. Outros efeitos colaterais que ocorrem são os distúrbios gastrintestinais e os pruridos. Pode causar ginecomastia em pacientes do sexo masculino devido à inibição da síntese de esteróides adrenocorticais e de testosterona com seu emprego em altas doses como foi relatado em alguns casos.<sup>12</sup>

### 2.5.2.2 Fluconazol

O fluconazol apresenta boa absorção e pode ser administrado via oral e intravenosa. A via oral é reservada para os casos mais leves e para terapêutica de manutenção em longo prazo. Atinge grandes concentrações no líquido cefalorraquidiano e nos líquidos oculares. Apresenta meia vida de aproximadamente 25 horas sendo que 90% são eliminados sem alterações na urina e 10% nas fezes.<sup>12, 103</sup>

Apresenta amplo espectro de ação para leveduras incluindo *Candida* spp, *Cryptococcus* spp, *H. capsulatum* e *P. brasiliensis*. É ativo contra *C. albicans*, porém cepas de *C. krusei* e *C. glabrata* são menos sensíveis.<sup>102, 103, 108</sup>

Os efeitos adversos do fluconazol são geralmente brandos e incluem náuseas, cefaléia e dor abdominal. Todavia, lesões esfoliativas da pele foram relatadas em alguns indivíduos presentes primeiramente nos pacientes com AIDS.<sup>12, 108</sup>

### 2.5.2.3 Itraconazol

O itraconazol é um derivado triazólico insolúvel em água e altamente lipofílico e é ativo contra dermatófitos. Pode ser administrado oralmente, porém, após a sua absorção ocorre intensa metabolização hepática. Ele é altamente lipossolúvel e uma formulação na qual o fármaco é incorporado dentro de bolsas de  $\beta$ -ciclodextrina está disponível e desta forma pode ser utilizado por via intravenosa. O tempo de meia-vida para administração oral é de 36 horas sendo eliminado na urina. Este fármaco não penetra no líquido cefalorraquidiano.<sup>12</sup>

Seus efeitos adversos incluem os distúrbios gastrintestinais, cefaléia e tonturas. Podem apresentar em menor proporção hepatite, hipocalcemia, e impotência. Podem também ocorrer reações alérgicas. Ainda não foi relatada a inibição da esteroidogênese como no caso do

cetoconazol. As interações medicamentosas ocorrem como resultado da inibição de enzimas do citocromo P450 inclusive interações com inibidores de protease que são utilizados na terapia HAART. Em comparação com o cetoconazol suas vantagens são representadas pelo maior espectro de atividade antifúngica, melhor perfil farmacocinético e menor toxicidade.<sup>12, 91, 107, 109</sup>

#### **2.5.2.4 Voriconazol**

Este fármaco mantém as propriedades gerais dos azólicos, porém bloqueia mais intensamente a síntese de ergosterol dos fungos filamentosos para os quais chega a ser fungicida. É fungistático para espécies de *Candida* spp, inclusive aquelas resistentes ao fluconazol, *Cryptococcus* spp e *Trichosporon* spp.<sup>52</sup> Esta droga está disponível para administração por via oral como comprimidos revestidos por película (50 ou 200mg) ou em pó para suspensão oral, bem como uma formulação intravenosa na dosagem de 200mg utilizando o veículo ciclodextrina para solubilizar a droga.<sup>110</sup>

O voriconazol é utilizado por via oral ou endovenosa na dosagem de 6 mg/Kg de peso a cada 12 horas. A absorção não depende de acidez gástrica e apresenta boa biodisponibilidade. Alcança níveis inibitórios para fungos no encéfalo e líquido cefalorraquidiano. Por ser excretado e metabolizado no fígado é necessário ajustar a dose ou evitá-lo quando há insuficiência hepática.<sup>97, 110</sup>

#### **2.5.3 Novos antifúngicos em potencial**

Números crescentes de fungos patogênicos estão se tornando resistentes aos fármacos antifúngicos disponíveis. As infecções fúngicas estão aumentando principalmente devido aos

tratamentos quimioterápicos para câncer e imunodepressão ocasionada nos transplantes. Portanto, novos compostos estão em desenvolvimento, sendo alguns com novos mecanismos de ação considerando que a perspectiva do uso dos tratamentos combinados foi explorada exaustivamente.<sup>12</sup>

As novas equinocandinas tais como a micafungina e anidulafungina, mostram-se promissoras no tratamento das infecções causadas pelo *Aspergillus* spp e *Candida* spp mesmo nos pacientes imunocomprometidos como na AIDS. Os efeitos colaterais são mais brandos e com menor incidência quando comparados à anfotericina B. Muitos triazóis de nova geração também estão em prospecção. Tanto o posaconazol quanto o ravuconazol possuem boa eficácia em ampla gama de patógenos fúngicos.<sup>12, 16</sup>

## 2.6 Tratamento das Candidíases

Muitas vezes o organismo apresenta leveduras do gênero *Candida* colonizando o sistema digestivo como sendo comensais em indivíduos sadios. No entanto, pode produzir uma gama de infecções graves em indivíduos imunodeprimidos. A terapêutica destas infecções mais graves tem sido difícil devido ao número limitado de drogas antifúngicas disponíveis.<sup>111</sup>

A *C. albicans* tem sido considerada a espécie mais frequentemente envolvida em infecções fúngicas da mucosa oral. Nos últimos anos houve uma mudança na microbiota oral e espécies “não-albicans” estão cada vez mais presentes nestes locais, principalmente em pacientes infectados pelo HIV.<sup>11, 111, 112</sup> Esta mudança segundo Gutierrez et al. (2007)<sup>111</sup> está correlacionada com o freqüente uso de agentes triazólicos como fluconazol, que por sua vez,

apresenta baixa toxicidade sendo no momento a droga azólica mais utilizada para tratamento destas infecções causadas por *Candida* spp.<sup>91,97</sup>

As drogas azólicas são empregadas na terapia primária de infecções fúngicas sistêmicas ou secundariamente após falência e intolerância à anfotericina B desoxicolato.<sup>97</sup>

O tratamento das candidíases orais têm sido bastante discutido na atualidade principalmente nesta população de pacientes HIV positivos com a finalidade de avaliar o uso racional das drogas antifúngicas disponíveis no mercado como os azólicos, destacando o fluconazol.<sup>113</sup> É cada vez mais reconhecido que o desenvolvimento de COF reflete o comprometimento e deterioração do sistema imunológico do paciente HIV positivo. O “leque” de opções terapêuticas é amplo podendo os azóis serem utilizados como aplicações tópicas, orais e sistêmicas e se necessário terapêutica intravenosa por anfotericina B.<sup>91</sup>

As drogas mais comumente utilizadas por via tópica para tratamento de OPC são: nistatina suspensão oral, clotrimazol comprimidos que dissolvem na boca e o miconazol gel.<sup>22,91</sup>

Para tratamento de COF três drogas são comumente prescritas quando há necessidade de tratamento sistêmico: fluconazol, itraconazol e cetoconazol, utilizadas em uma dose diária. Apesar de o cetoconazol ter sido a primeira droga azólica de uso oral é raramente prescrita devido a sua má absorção em decorrência de alterações gástricas, interações medicamentosas e seus efeitos adversos associados.<sup>91</sup>

O itraconazol é considerado a droga de escolha no tratamento da paracoccidiodomicose e da candidíase especialmente em cepas de *Candida albicans* resistentes ao fluconazol e nas infecções cutâneas causadas por dermatófitos.<sup>113</sup>

O fluconazol têm sido amplamente utilizado para tratamento da COF, ao contrário do cetoconazol a sua absorção é independente do pH gástrico e ingestão de alimentos além de apresentar baixa toxicidade.<sup>97</sup> É ativo contra a maioria das leveduras do gênero *Candida* embora algumas cepas de *C. glabrata* apresentem-se resistentes e *C. krusei* mostre-se intrinsecamente resistente.<sup>114</sup> As formulações em suspensão oral dos azóis, fluconazol e itraconazol também foram avaliadas para o tratamento das COF e / ou candidíase esofágica. Dados iniciais sugerem que estas formulações conferem determinadas vantagens incluindo a facilidade de administração em pacientes apresentando dificuldades convencionais em ingerir comprimidos ou cápsulas. Além disso, o perfil farmacocinético e a biodisponibilidade do itraconazol parecem ser melhores quando administrado desta forma, uma vez que a influência do pH gástrico na absorção está consideravelmente diminuída e ao contrário da pílula as suspensões orais não precisam ser tomadas juntamente com alimentos. O itraconazol em suspensão oral parece ser tão eficaz na resolução dos casos típicos de COF como esquemas terapêuticos empregados com fluconazol cápsulas.<sup>91</sup>

A anfotericina B tem sido usada há mais de 50 anos e continua sendo a primeira opção terapêutica para tratamento das micoses mais graves e disseminadas. Não é rotineiramente empregada para o tratamento da OPC, pois apresenta muitos efeitos adversos limitando as suas dosagens. No entanto, a resistência à anfotericina B é extremamente rara e por isso ela continua a ser a droga de escolha para pacientes com doença grave ou recorrente e aqueles com envolvimento esofágico.<sup>91, 115</sup>

Apesar das várias opções de antifúngicos disponíveis para tratamento das infecções fúngicas e devido ao aumento da falha terapêutica, a presença de efeitos adversos significativos e a emergência de espécies fúngicas intrinsecamente ou secundariamente resistentes, novas opções terapêuticas têm surgido como as equinocandinas. Como exemplo, a

caspofungina tem sido empregada em protocolos recentes. Entretanto, têm sido pouco utilizada na prática clínica em razão de possuir elevado custo.<sup>116</sup>

A candidíase vaginal geralmente responde à terapia antifúngica tópica ou oral de curso curto. Em geral, os antifúngicos imidazólicos aplicados topicamente durante 1-3 dias são os agentes mais efetivos alcançando taxas de cura clínica em torno de 85-90% quando comparados com a nistatina, a cura se estabelece em 75-80%. A terapia com agentes orais apresenta uma taxa de cura um pouco superior à terapia tópica, além de oferecer mais conforto em sua administração.<sup>117</sup> Os antifúngicos orais que têm mostrado efeito nestas condições são: cetoconazol, itraconazol e fluconazol. O fluconazol é único antifúngico oral aprovado para o tratamento da candidíase vaginal pelo FDA – Food and Drug Administration.

118

A onicomicose é a micose superficial de tratamento mais difícil e mesmo nos casos em que a medicação é adequada ao agente etiológico identificado nem sempre se obtém cura, sendo frequentes as recidivas. Entre as espécies de *Candida*, a resistência aos antifúngicos têm sido um problema crescente, pois, muitas das espécies não-*albicans*, mais comumente isoladas, são menos susceptíveis aos derivados azólicos. Este fato dificulta o tratamento da candidíase e de outras infecções causadas por leveduras.<sup>119</sup> Essa é uma das razões da crescente importância dos testes de susceptibilidade visto que o seu conhecimento possibilita direcionar de maneira mais eficaz o tratamento.<sup>95, 120</sup>

## 2.7 Tratamento da Criptococose

Tendo em vista a alta mortalidade e morbidade provocada pela criptococose principalmente acometendo SNC em pacientes HIV positivos, torna-se necessário que a terapia seja instituída imediatamente após diagnóstico.<sup>47</sup>

As formas assintomáticas diagnosticadas de forma esporádica podem ser autolimitadas. As formas pulmonares primárias em pacientes hígidos não requerem tratamento a não ser uma conduta expectante por parte do clínico. Entretanto, em pacientes portadores de imunossupressão com manifestações pulmonares primárias ou secundárias a infecções do SNC a conduta terapêutica deve ser semelhante à da neurocriptococose.<sup>38</sup>

O tratamento da criptococose baseia-se na terapia inicial com anfotericina B seguida por uma terapia de manutenção com um derivado azólico como fluconazol ou itraconazol. O fluconazol apresenta boa atividade antifúngica contra *C. neoformans*.<sup>103</sup> Pode ocorrer resistência de cepas de *C. neoformans* a estas drogas antifúngicas tornando a administração destas nestes indivíduos um tanto problemática. Já existem relatos na literatura de resistência de *C. neoformans* a anfotericina B. O fluconazol também se tornou o medicamento eleito na quimioprofilaxia secundária de pacientes recuperados de um evento de meningite criptococócica.<sup>102, 121</sup>

A tendência atual para tratamento da criptococose em pacientes com AIDS na fase inicial da doença é a utilização de altas doses de anfotericina B = 0,7 a 1mg/kg/ dia durante as duas primeiras semanas de tratamento associado a pequenas doses de 5-fluocitosina, 100 mg / kg / dia seguida por altas doses de fluconazol = 800 mg / dia, por oito a doze semanas. Na fase de manutenção é administrado 200 mg/dia de fluconazol e com este esquema há uma significativa redução das taxas de mortalidade por meningite criptococose em pacientes com AIDS de 14-25% para 6%.<sup>120</sup>

## 2.8 Resistência aos antifúngicos

Candidíase orofaríngea e esofágica (COFE) são micoses oportunistas frequentes em pacientes imunodeprimidos. A resistência de *Candida* spp em casos de COFE aos azóis pode

ser uma forma refratária dessa infecção ocorrer, em especial nos pacientes infectados pelo HIV.<sup>122</sup>

Com a incidência prolongada de COF em pacientes infectados pelo HIV houve um desenvolvimento de resistência das candidíases frente aos fármacos utilizados. A resistência das espécies de *Candida* spp aos azóis tem sido freqüentemente atribuída a uma pressão seletiva causada pelo uso destes antifúngicos de forma profilática em casos de COF. O primeiro relato de resistência aos azóis em pacientes soropositivos para o HIV foi relacionado ao cetoconazol.<sup>122 123</sup> No entanto, com a introdução do fluconazol no cenário das infecções fúngicas em especial, para tratamento das COF, a maioria das publicações já relatam resistência a essa droga. A incidência de resistência clínica ao fluconazol é estimada em 6 a 36% dependendo do grupo de pacientes e definição do caso estudado.<sup>33, 112, 124, 125, 126</sup>

Por muitos anos a resistência de isolados de leveduras do gênero *Candida* frente a agentes antifúngicos foi um problema menos relevante na clínica. Contudo, recentemente tem sido relatado cada vez mais o aumento da freqüência de resistência de *C. albicans* frente ao fluconazol no cenário da candidíases orais em pacientes infectados pelo HIV.<sup>127</sup>

Em casos de candidíase esofágica a *C. albicans* é comumente isolada, embora outras espécies também possam ser responsáveis. A resistência ao fluconazol, droga de escolha para tratamento, têm sido um problema emergente.<sup>122</sup> Essa emergência de cepas resistentes tornou-se cada vez mais evidente desde a introdução recente das terapias orais por drogas azólicas. As COFs que não respondem a terapêutica antifúngica podem ser resultado do advento do uso profilático desta terapia em especial o fluconazol no combate de doenças oportunistas nos pacientes HIV positivos.<sup>91</sup>

Segundo Rex et al (1995)<sup>16</sup>, existem três vias possíveis pelas quais os pacientes adquirem espécies de fungos resistentes ao tratamento. Um microrganismo colonizando ou

causando infecção é susceptível a mutações e pode torna-se resistente, o paciente é colonizado ou infectado por várias cepas ou espécies e uma delas é resistente e assim selecionada, ou então o paciente é infectado por uma espécie intrinsecamente resistente. A falha terapêutica é de difícil interpretação, pois, alguns pacientes apresentam melhora clínica, porém as leveduras continuam persistindo.

O desenvolvimento de resistência ao fluconazol é um processo complexo nos quais diversos fatores interferem tanto do hospedeiro quanto do fungo. Entre os fatores dependentes do fungo, figuram mecanismos celulares, moleculares como alteração da expressão das bombas de efluxo da droga bem como alteração da biossíntese do ergosterol. Dessa forma, diminuem a concentração do fluconazol e também outros azóis.<sup>112, 128</sup>

Outros fatores estão presentes, como a substituição da população sensível de *C. albicans* por outra espécie que, inicialmente, são sensíveis e que se tornam resistentes de forma intrínseca por alterações genéticas como é o caso da *C. glabrata* e *C. krusei* notadamente ao fluconazol. Deve se considerar igualmente a expressão genética transitória que origina uma cepa temporariamente resistente em presença do antifúngico e por último as alterações que ocorrem na mesma população fúngica (microevolução).<sup>127, 124</sup>

Portanto, há necessidade de realizar mais estudos com a finalidade de correlacionar o grau de imunodeficiência com os valores de concentração inibitória mínima (CIM) no intuito de compreender de maneira mais eficaz a interação destes fatores no desenvolvimento de COF refratária ao tratamento. Embora exista uma razoável correspondência entre resistência *in vitro* e resposta clínica surge inúmeros fatores relacionados e circunstâncias farmacocinéticas que podem estar influenciando de forma direta a eficácia clínica e logo a rotina de determinação da susceptibilidade *in vitro* pode ser prejudicada.<sup>91</sup>

## 2.9 Susceptibilidade às drogas antifúngicas

Estudos estão sendo voltados para os testes de susceptibilidade à antifúngico devido esse ser um assunto de grande interesse e valia na micologia médica. Estes testes podem ser úteis para avaliar novas drogas para fins epidemiológicos e, sobretudo para prever os resultados terapêuticos.<sup>129, 130</sup>

Os estudos da susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos oferecem a possibilidade de obter dados confiáveis no momento de selecionar a terapia para tratamento de infecções fúngicas. Mediante este procedimento adquirem-se valores quantitativos, valores de concentração inibitória mínima, e características do isolamento clínico frente a um antifúngico de forma qualitativa. Estes parâmetros podem auxiliar na detecção de quadros de resistência ou susceptibilidade dos microrganismos perante os antifúngicos utilizados para seu combate.<sup>112</sup>

A magnitude do aumento da resistência das infecções fúngicas frente a antifúngicos, bem como o advento de novas drogas antifúngicas, têm gerado um grande interesse no desenvolvimento dos testes de susceptibilidade a estas drogas. Ao contrário dos testes de susceptibilidade a antibacterianos, os testes de susceptibilidade a drogas antifúngicas não são comumente realizados na maioria dos laboratórios clínicos. Contudo, têm-se obtido importantes avanços na utilização dos testes de susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos, devido ao crescente surgimento de cepas patogênicas resistentes sendo algumas até mesmo de forma intrínseca principalmente pelo uso de terapia antifúngica profilática para infecções oportunistas em pacientes HIV positivos. Por este motivo, houve aumento da necessidade do desenvolvimento e padronização dos testes de susceptibilidade a antifúngicos.<sup>91, 131, 132, 133</sup>

O esforço para padronização dos testes de susceptibilidade culminou na elaboração do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) que aprovou o primeiro padrão para estudar a susceptibilidade dos antifúngicos frente a leveduras em 1999 (documento M27-A) modificadas posteriormente e aprovado no ano 2003 o padrão (documento M27-A2) (NCCLS, 2002). Em 2005, passou a ser denominado Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (CLSI, 2005). Com CLSI, tornou-se possível a comparação e validação dos resultados dos testes de susceptibilidade contribuindo para o conhecimento de cepas resistentes, que em muitas vezes são preditoras de insucesso terapêutico. Várias técnicas vêm sendo desenvolvidas e empregadas para o estudo do perfil de susceptibilidade *in vitro* a antifúngicos dos quais o método de micro diluição em caldo é considerado o método de referência pelo CLSI.<sup>131, 134</sup>

Métodos alternativos estão sendo implantados para facilitar a utilização destes testes na rotina laboratorial, como técnicas de difusão em ágar, utilizando-se fitas impregnadas com gradiente de concentração de antifúngicos – Etest<sup>®</sup>. Este é um método comparável ao proposto pelo CLSI, porém, mais simples e de fácil incorporação à rotina laboratorial.<sup>135, 136, 137, 138, 139</sup> Este método tem sido utilizado com frequência, pois permite discernir uma cepa resistente de uma sensível, determinar os valores de concentração inibitória mínima, além de ser uma técnica de fácil e rápida execução que apresenta satisfatória correlação com o método de referência (CLSI).<sup>24</sup>

O Etest<sup>®</sup> é um método comercial (AB Biodisk, Solna, Suécia) de difusão em ágar que utiliza uma tira plástica com vários gradientes de concentração crescente do antifúngico empregado. Dessa forma, permite a determinação de valores de CIM mediante uma leitura visual. Diversos estudos têm descrito um nível de concordância satisfatório entre 86 a 100% comparando Etest<sup>®</sup> com método de referência CLSI.<sup>25, 129, 140</sup>

## 2.10 Testes de susceptibilidade: possíveis correlações *in vitro* e efeitos terapêuticos *in vivo*

A realização dos testes de susceptibilidade a antifúngicos possuem a finalidade de detectar cepas de fungos resistentes e sensíveis para proporcionar a escolha correta da terapia a ser empregada, com intuito de reduzir casos de falha terapêutica. Atualmente, a resistência de cepas de *Candida* spp aos antifúngicos existentes encontra-se em ascensão. Tanto a ocorrência de espécies com resistência intrínseca quanto secundárias têm justificado a importância da utilização destes testes.<sup>91, 129, 132, 133</sup>

Entretanto, estabelecer a relevância clínica dos resultados *in vitro* – *in vivo*, têm sido tarefa difícil, tendo em vista que os testes de susceptibilidade são realizados em condições padronizadas utilizando uma fase constante de crescimento do microrganismo, condições fixas de pH, temperatura, umidade e concentração de oxigênio. No tratamento de infecções fúngicas não há uma padronização destes fatores relacionados tanto ao microrganismo quanto ao hospedeiro e também fatores farmacocinéticos que variam para cada indivíduo tipo de doença de base, grau de imunodeficiência. Em síntese, vários são os fatores que podem influenciar os resultados encontrados.<sup>91, 132, 133</sup>

### **3. OBJETIVOS**

### 3.1 Objetivo geral

Caracterizar e determinar o perfil de susceptibilidade *in vitro* à drogas antifúngicas de leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*, isoladas de pacientes HIV positivos procedentes dos serviços de saúde de Cuiabá e Várzea Grande-MT.

### 3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Realizar o isolamento de leveduras do gênero *Candida* e *Cryptococcus* em distintas amostras clínicas provenientes de pacientes HIV positivos.

3.2.2 Realizar a identificação de espécies de leveduras do gênero *Cryptococcus* (*C. neoformans* e *C. gattii*) utilizando o método da quimiotipagem (CGB).

3.2.3 Realizar a identificação específica das leveduras por meio de técnicas laboratoriais padronizadas (tubo germinativo, microcultivo, zimograma e auxanograma).

3.2.4 Discriminar *Candida dubliniensis* de *Candida albicans* isoladas a partir de secreções de orofaringe e raspado bucal utilizando técnicas específicas

3.2.5 Determinar a frequência de infecções fúngicas provocadas por espécies de leveduras do gênero *Candida* e *Cryptococcus* em pacientes HIV positivos dos serviços de saúde de Cuiabá e Várzea Grande.

3.2.6 Determinar o perfil de susceptibilidade *in vitro* das espécies de leveduras do gênero *Candida* e *Cryptococcus* isoladas à cinco antifúngicos pela metodologia comercialmente disponível (Etest).

#### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1 Tipo de estudo**

Estudo descritivo, transversal, realizado no período compreendido entre janeiro/2005 a outubro/2008.

#### **4.2 Seleção dos pacientes**

Este estudo foi previamente aprovado pelo comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos do Hospital Universitário Julio sob o número 247/CEP-HUJM/06.

Os indivíduos infectados pelo HIV foram procedentes da demanda de pacientes atendidos nos serviços de saúde do estado do Mato Grosso. Foram incluídas neste estudo sete unidades hospitalares, sendo cinco hospitais públicos (dois hospitais universitários, hospital Santa Casa de Misericórdia, e dois pronto-socorros municipais), um hospital privado e o Centro Estadual de Referência em Média e Alta Complexidade (CERMAC) da Secretaria de Estado da Saúde (SES).

Os dados clínicos foram obtidos da revisão de prontuários, compilados pelos profissionais médicos por meio de entrevistas com os pacientes incluídos, seguindo questionário específico (Apêndice1) previamente elaborado, para identificar fatores predisponentes associados às infecções fúngicas em questão, elucidação do agente etiológico e uso prévio de terapêutica antifúngica.

Todos os pacientes incluídos no estudo possuíam diagnóstico confirmado de infecção pelo HIV ou em estágio avançado da doença. Estes pacientes foram acompanhados pelos respectivos serviços de saúde nos quais estavam internados. A participação dos pacientes no estudo foi de forma voluntária e as coletas só foram realizadas após assinatura pelo paciente

ou seu acompanhante responsável do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) aprovado pelo CEP (anexo 2).

O número amostral foi definido por conveniência, incluindo-se todos os pacientes HIV positivos e/ou com AIDS, apresentando sintomas clínicos de infecção criptocócica ou por leveduras do gênero *Candida*, quer em pacientes internados ou atendidos no serviço de referência (CERMAC).

#### **4.3. Coleta e cultivo das amostras de leveduras do gênero *Candida***

As amostras clínicas de raspado bucal e secreção de orofaringe coletadas dos pacientes foram obtidas pó meio de raspado das placas esbranquiçadas aderidas a cavidade bucal e orofaríngea, com auxílio de *swab* estéril. Essa amostra clínica, imediatamente após coleta foi introduzida no interior de dois tubos contendo ágar Sabouraud Dextrose e dois contendo Mycobiotic ágar, ambos comercializados pela DIFCO – Lepont de Claix – France.

As secreções vaginais foram coletadas através de *swabs* estéreis; que foram posteriormente introduzidos no interior de dois tubos contendo ágar Sabouraud Dextrose e dois contendo Agar Mycobiotic. Outro *swab* contendo a amostra clínica foi utilizado para realizar dois esfregaços em lâmina lapidada lisa, objetivando identificação micromorfológica após coloração de Gram. Este mesmo *swab* foi acondicionado em um tubo de salina estéril para realização do exame à fresco, cujo objetivo também foi observar a presença ou ausência de células ovaladas/arredondadas e pseudo-hifas com características morfológicas sugestivas de leveduras do gênero *Candida*.

As amostras (pele e fragmentos de unhas) foram coletadas com auxílio de espátulas e/ou lâminas de bisturi e acondicionadas em placas de Petri descartáveis e estéreis.

As amostras clínicas (escarro, lavado bronco-alveolar e urina) foram devidamente coletadas e encaminhadas ao laboratório de micologia do HUIJM, com posterior encaminhamento ao laboratório de investigação da FCM/UFMT.

Todas as amostras clínicas coletadas foram acondicionadas em caixas térmicas, em seguida encaminhadas ao Laboratório de Investigação da Faculdade de Ciências Médicas da UFMT. Os tubos de ensaio de vidro, contendo as amostras de raspado bucal e secreção de orofaringe, foram incubados na estufa BOD a 27°C. Os raspados de pele e fragmentos de unhas foram examinados em primeiro lugar, por exames diretos e, posteriormente cultura para fungos, utilizando procedimento anteriormente descrito para amostras de mucosa oral e orofaríngea.

#### **4.4 Identificação das amostras de leveduras do gênero *Candida***

Após a incubação das amostras clínicas na estufa BOD, nos tubos em que houve o aparecimento de colônias foi realizado um esfregaço delgado das mesmas colônias, para posterior coloração pela técnica de Gram e visualização de características morfotintoriais. A partir dos resultados pós-coloração de Gram, as leveduras foram submetidas à identificação específica.

A caracterização em nível de gênero e espécie foi baseada na produção de tubo germinativo, micromorfologia segundo a técnica de Ridell e perfil bioquímico por meio da assimilação e fermentação, segundo Kurtzman & Fell.<sup>64</sup> A discriminação da espécie *C.*

*albicans* de *C. dubliniensis* foi realizada por meio do teste de temperatura a 45°C e confirmada pela metodologia comercial API 20C AUX da BioMeri ux (Marcy L'Etoile – France) segundo informações do fabricante.

#### 4.4.1 Avaliação da pureza das colônias

Após isolamento, as colônias foram avaliadas quanto a sua pureza, por meio de plaqueamento em meio cromog nico CHROMagar Candida (BBL). Esse procedimento foi útil para isolar e identificar presuntivamente: colônias de coloração verde claro – sugestivas de *C. albicans*, colônias de cor azul – sugestivas de *C. tropicalis*, colônias apresentando coloração rosa em diferentes tonalidades e aspectos – sugestivas de outras espécies de leveduras do gênero Candida. O fundamento desse método preconiza a utilização do substrato  $\beta$  glicosaminidase<sup>83, 141</sup> e a diferenciação das leveduras de acordo com a morfologia e a cor das colônias.<sup>142, 143</sup>

#### 4.4.2 Prova do tubo germinativo

Em relação às características micromorfológicas, foi verificado, em primeiro momento, a habilidade de formação de tubo germinativo ou efeito Reynolds-Braude. Para visualização dessa característica, uma pequena quantidade da colônia foi transferida para um tubo, previamente esterilizado, contendo 0,5 mL de soro bovino fetal e incubada a 37  C em banho Maria, por três horas. Após este período, uma gota dessa suspensão foi examinada ao microscópio, entre lâmina e lamínula. A evidenciação de tubo germinativo configura teste positivo e, presuntivamente, diagnóstico de *C. albicans* e *C. dubliniensis*.<sup>81</sup>

#### 4.4.3 Microcultivo

O microcultivo ou técnica de Ridell <sup>143</sup> foi realizado com o objetivo de visualizar as estruturas morfológicas típicas de cada espécie do gênero. O meio de cultura ágar fubá, acrescido de Tween 80, com pH ajustado entre 5,8 e 6,2, foi distribuído em camada fina sobre lâminas previamente preparadas em câmara de microcultivo com auxílio de pipeta estéril. Após solidificação do meio, cada amostra foi semeada em três linhas finas, horizontais e paralelas na superfície do ágar e coberta com lamínula. O sistema foi fechado e em seguida incubado a 27° C, por até três dias.

A leitura foi executada observando-se a presença de estruturas características como pseudomicélio, arranjo dos blastosporos (ocorrendo em grupos ou cachos, no início da hifa e/ou ao longo dessa, isolados ou aos pares, nos pontos de constrição ou irregularmente distribuídos no pseudomicélio). A presença de clamidósporos foi anotada como diagnóstico presuntivo de *C. albicans* e *C. dubliniensis*. As outras espécies do gênero foram avaliadas conforme características morfológicas específicas. O meio de cultura ágar fubá foi obtido comercialmente – Agar Corn Meal (DIFCO – Lepont de Claix - France) e seu preparo obedeceu às orientações do fabricante.

#### 4.4.4 Provas bioquímicas (Zimograma e Auxanograma)

No teste de fermentação de carboidratos (zimograma) foi utilizado o meio basal, segundo fórmula abaixo, acrescido de azul de bromotimol e distribuídos em alíquotas de 2 mL em tubos de Kahn contendo tubos de Durham invertidos, para visualização de gás. As amostras foram avaliadas quanto à capacidade de fermentar glicose, galactose, maltose, sacarose, lactose, trealose, xilose, melibiose e rafinose. Para tanto, foi adicionado 1 mL da

solução de cada carboidrato, preparadas à concentração de 6%, a cada tubo de meio de cultura autoclavado.

### **Meio Basal**<sup>144</sup>

- Peptona ..... 7,5 g
- Extrato de levedura ..... 4,5 g
- Azul de bromotimol ..... 0,4 g
- Água destilada ..... 1000,00 mL

O pH foi acertado para 6,5. Logo após, o azul de bromotimol foi dissolvido em etanol e adicionado, aos poucos, a esse meio até obtenção de coloração verde intensa.

Para a preparação do inóculo, uma pequena porção da levedura foi ressuspensa em 5 mL de salina estéril. A concentração celular foi avaliada através do cartão de Wickerham. Trata-se de uma técnica que permite uma estimativa da densidade de células de uma suspensão, tendo sido estabelecidos quatro níveis de concentração celular, com avaliação feita comparativamente, observando-se o crescimento baseado no seguinte critério: 0 (poucas células – linhas totalmente visíveis), 1 (densidade fraca – linhas visíveis, um pouco embaçadas), 2 (densidade média – linhas embaçadas e difusas), 3 (densidade forte – linhas não visíveis).

Foram transferidos 0,1 mL da suspensão conforme o critério 2 para cada um dos nove tubos de meio basal, contendo os diferentes açúcares. A bateria de testes foi incubada a 27°C e as leituras foram realizadas periodicamente, observando-se a produção de ácido através da mudança de coloração do meio basal para amarelo e a formação de gás capturado no interior

do tubo de Durham. As observações foram feitas por um período máximo de sete dias.<sup>144</sup> Os resultados foram considerados positivos em função da produção de gás.

O auxanograma foi realizado para observar o padrão de assimilação de nove carboidratos (glicose, galactose, maltose, sacarose, lactose, trealose, xilose, melibiose e rafinose) como única fonte de carbono. Para isto, foi preparado o meio C, conforme descrito a seguir.

**Meio C**<sup>143</sup>

- Sulfato de amônio ..... 5,0 g
- Fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) ..... 1,0 g
- Sulfato de magnésio hepta hidratado (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) ..... 0,5 g
- Agar ..... 20 g
- Água destilada ..... 1L

Placas de Petri de vidro, de 140 mm de diâmetro, foram esterilizadas e marcadas no fundo, em nove pontos equidistantes, com as siglas correspondentes aos carboidratos utilizados. Em cada placa foram dispensados 4 mL da suspensão de leveduras preparada em salina esterilizada, correspondendo ao critério 2 do cartão de Wickerham e aproximadamente 45 mL de meio C fundido e resfriado (aproximadamente 45° C).<sup>144</sup>

O inóculo correspondeu a uma concentração celular de 1 – 6 x 10<sup>6</sup> UFC/mL, de acordo com experimentos preliminares. A mistura obtida na placa foi cuidadosamente homogeneizada, evitando-se a formação de bolhas e deixada solidificar a temperatura ambiente. Após solidificação, os carboidratos foram distribuídos em quantidades mínimas nos

pontos previamente marcados,<sup>145</sup> com auxílio de palitos esterilizados. A incubação foi feita à temperatura de 27°C, por até 72 horas e a leitura foi realizada diariamente. O resultado foi considerado positivo quando da evidenciação do halo de crescimento em torno de cada carboidrato.

#### **4.4.5 Identificação de *C. dubliniensis***

Para possível identificação de *C. dubliniensis* foi utilizada a técnica micromorfológica (Técnica de Ridell) e sistema comercial API 20 C AUX (Biomérieux – Marcy L’Etoile - France).

#### **4.5. Coleta das amostras de leveduras do gênero *Cryptococcus***

A maioria dos isolados clínicos de *Cryptococcus* spp foram cedidos pelo laboratório de micologia do HUJM e uma pequena parte cedida pelo laboratório do Pronto Socorro Municipal de Cuiabá. Algumas amostras de LCR foram coletadas em frascos tipo penicilina estéreis, acondicionadas em caixas térmicas e imediatamente transportadas ao laboratório de investigação (LI) da UFMT, onde foram devidamente processadas.

#### **4.6 Identificação de leveduras do gênero *Cryptococcus***

Os isolados que foram encaminhados ao LI foram devidamente repicados em agar Sabouraud dextrose (DIFCO) e, a seguir, foram caracterizados por quimiotipagem em meio CGB, para diferenciação das espécies. As amostras clínicas de LCR que foram encaminhadas

ao LI em frascos tipo penicilina estéreis sendo imediatamente realizados: exame direto, cultura e quimiotipagem em meio CGB.

#### **4.6.1 Exame direto**

As amostras foram centrifugadas em 14.000 rpm por 10 minutos e, após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado. Em seguida, o precipitado foi homogeneizado e foram preparadas duas lâminas. O método da tinta nanquim foi empregado para detecção das leveduras, as quais foram visualizadas em microscópio ótico a objetiva de 40, com evidência de leveduras de tamanho regular, globosas, arredondadas, encapsuladas, com ou sem brotamento, sem hifas ou pseudo-hifas.

#### **4.6.2 Cultura**

Foi realizada a semeadura nos meios de cultura apropriados (ágar Sabouraud Dextrose, ágar Mycobiotic e Fava Netto). Ausência de crescimento em ágar mycobiotic é sugestivo de *Cryptococcus* spp. As amostras foram incubadas a 27°C em estufa BOD por um período de 48 a 72 horas.

Após o crescimento das colônias de coloração creme e aspecto cremoso em ágar Sabouraud dextrose ou Fava-Netto, foi realizado o repique em meio ágar niger para purificação das colônias de *Cryptococcus* spp, ou seja, para obtenção de colônias puras representadas pela coloração marrom-escuras, pois, as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* são as únicas deste gênero que produzem melanina. A produção de melanina ocorre através da presença de tirosina e ácido clorogênico no meio ágar niger (sementes de *Guizottia abyssinica*) que são oxidados pela fenoloxidase produzida pelo fungo, tornando a coloração

das colônias de *Cryptococcus* spp marrom-escuras. Estas colônias marrom-escuras foram repicadas em meio ágar Sabouraud dextrose e armazenadas sob refrigeração a 4° C.

#### 4.6.3 Quimiotipagem em meio CGB

Para diferenciar as espécies de *C. neoformans* e *C. gattii* foi utilizado o meio CGB. Este teste é baseado em dois parâmetros metabólicos observados em isolados de *C. gattii*: assimila a glicina como única fonte de carbono e nitrogênio e resistente à canavanina. O teste positivo é observado quando, a coloração amarelo-esverdeada do meio torna-se azul-cobalto, como resultado da alcalinização do meio pela da amônia liberada durante a degradação da glicina, enquanto que *C. neoformans* não demonstra mudança na coloração do meio, por não usar essa via metabólica.<sup>62</sup>

#### 4.7 Testes de susceptibilidade *in vitro* das leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* aos antifúngicos (cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B)

O perfil de susceptibilidade foi realizado pela técnica de difusão em ágar, Etest (AB Biodisk – Solna, Sweden) seguindo as instruções do fabricante.<sup>146</sup> Foi utilizado ágar Sabouraud Dextrose sem cloranfenicol, considerando este ser o meio de cultura de uso habitual na rotina laboratorial, em se tratando de amostras micológicas. Os pontos de corte empregados foram os recomendados pelo CLSI utilizados para técnica de microdiluição em caldo.

Os antifúngicos testados foram: cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B (AB Biodisk - Solna , Sweden). A atividade das drogas antifúngicas e a

reprodutibilidade dos resultados foram assegurados pela inclusão de cepas de referência. O critério de leitura considerado foi o valor da concentração inibitória mínima como sendo capaz de inibir 50% do crescimento para os azólicos e 90% para os poliênicos.

#### **4.7.1 Teste de susceptibilidade *in vitro* para leveduras do gênero *Candida***

##### **4.7.1.1 Cepas de referência**

As amostras de referência utilizadas nesse estudo corresponderam à *C. parapsilosis* – ATCC 22019 e *C. krusei* – ATCC 6258, que foram gentilmente cedidas pela Dra. Márcia S. C. Melhem - Instituto Adolfo Lutz - SP.

##### **4.7.1.2 Etest<sup>®</sup>**

O Etest foi utilizado de acordo com instruções do fabricante (AB Biodisk - Solna, Sweden). O meio utilizado foi o ágar Sabouraud dextrose sem cloranfenicol em placas estéreis (140 mm) descartáveis, próprias para realização do Etest. Cada colônia de *Candida* spp a ser testada foi repicada em ágar Sabouraud dextrose sem cloranfenicol e incubada por 24 h a 27°C. Após esse período, foram realizadas as suspensões individuais de cada isolado em 5 mL de salina estéril (0,85 %) correspondendo a 0,5 da escala de McFarland. Com o auxílio de um *swab* estéril, a suspensão de leveduras foi inoculada em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose, estriando de forma homogênea toda a superfície do ágar. Após 15 min. as fitas Etest impregnadas com os antifúngicos cetoconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B, em concentração de 32 a 0,002 µg/mL e o antifúngico fluconazol na concentração de 256 a 0,016 µg/mL, foram aplicadas sobre a superfície do ágar com o auxílio de uma pinça estéril. A CIM dos compostos foi determinada como a

concentração mais baixa da droga que a elipse conseguiu inibir e interceptar a tira de antifúngico, após incubação à 35° C e leitura realizada após 24 h.

#### **4.7.2 Teste de susceptibilidade *in vitro* para leveduras do gênero *Cryptococcus***

O procedimento utilizado foi o mesmo descrito anteriormente para leveduras do gênero *Candida*, porém o tempo de incubação foi igual a 48 h à 35°C, tanto para o repique quanto para a incubação contendo as fitas de Etest. A leitura foi realizada após a incubação em 48 h a 35°C.

#### **4.8 Procedimento de análise dos resultados**

Os dados foram tabulados e analisados com auxílio da planilha eletrônica Microsoft-Excel, versão 97/2003. Os valores das CIMs referentes aos antifúngicos testados foram apresentados considerando-se a distribuição das espécies de leveduras do gênero *Candida*, em gráficos de dispersão, para melhor visualizar o seu perfil de suscetibilidade.

## **5. RESULTADOS**

### 5.1 Isolamento de Leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*

O número total de pacientes avaliados correspondeu a 160, sendo que desses foram obtidos 105 isolados de leveduras do gênero *Candida* referentes a 102 pacientes, e 26 de leveduras do gênero *Cryptococcus* referentes a 26 pacientes, resultando em uma frequência (IC 95%) de isolamento de 65,6% (57,7%-72,8%) e 16,3% (11,1%-23,1%) para candidíase e criptococose, respectivamente (Tabela 1).

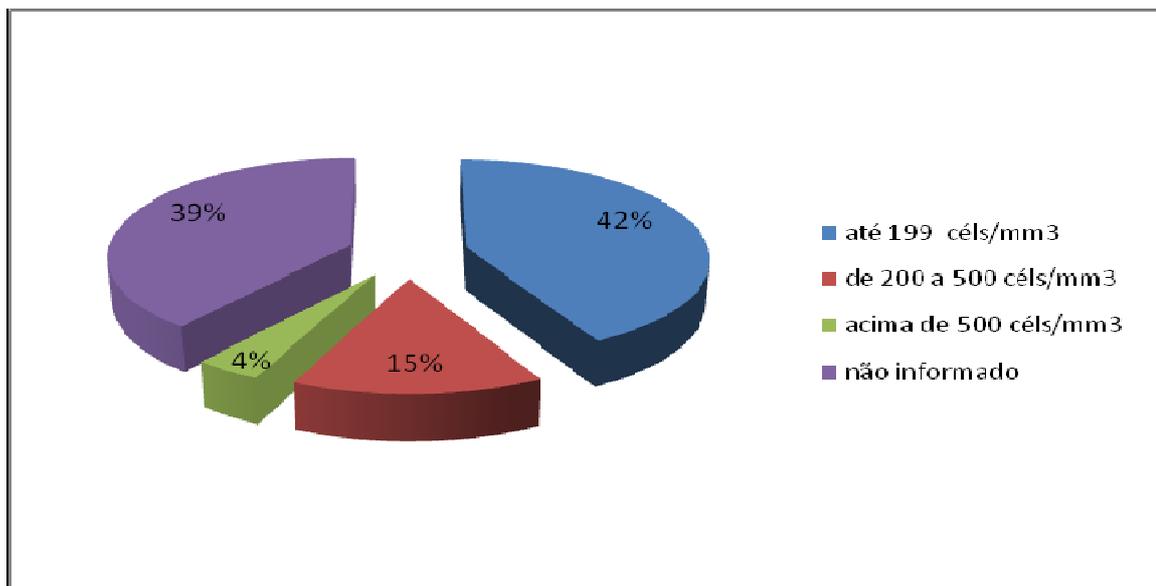
**Tabela 1** – Frequência de isolamento de leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* em pacientes HIV positivos procedentes dos serviços de Saúde de Cuiabá-MT, 2005-2008.

<b>Leveduras</b>	<b>Pacientes HIV positivos</b>	<b>Frequência de isolamento (IC 95%)</b>
<i>Candida</i> spp	102	77,9% (69,6%-84,5%)
<b>Mais de um isolamento de <i>Candida</i> spp</b>	03	2,3% (0,6% - 7,1%)
<i>Cryptococcus</i> spp	26	19,9% (13,6%-27,9%)

### 5.2 Isolamento de leveduras do gênero *Candida* nas amostras clínicas

A média (DP) de idade dos pacientes nos quais foram isoladas leveduras do gênero *Candida* foi igual a 40,2 (10,9) anos, variando de 4 a 68 anos, sendo que 58 (56,8%) pacientes pertenciam ao sexo masculino e 44 (43,2%) ao feminino. A variação de idade para o sexo masculino foi de 23 a 68 anos e para o sexo feminino foi de 4 a 62 anos.

Para os isolados de *Candida* spp, a contagem de linfócitos TCD<sup>4+</sup> variou de 2 a 626 céls/mm<sup>3</sup>, com média (DP) de 170 (161,8) céls/mm<sup>3</sup>. Dos pacientes HIV positivos analisados, 43% dos pacientes estavam com contagem de células CD4+ abaixo de 200 céls/mm<sup>3</sup> e 18,6% dos pacientes estavam acima de 200 céls/mm<sup>3</sup>. No entanto, é importante ressaltar que em 40% dos pacientes estudados não foi possível obter informações referentes aos valores de TCD4+ (Figura 1). A média (DP) da carga viral foi de 287.113, (731.315,5) 5 cópias/mm<sup>3</sup>. Dos 102 pacientes estudados, 38,2% estavam em uso de HAART.

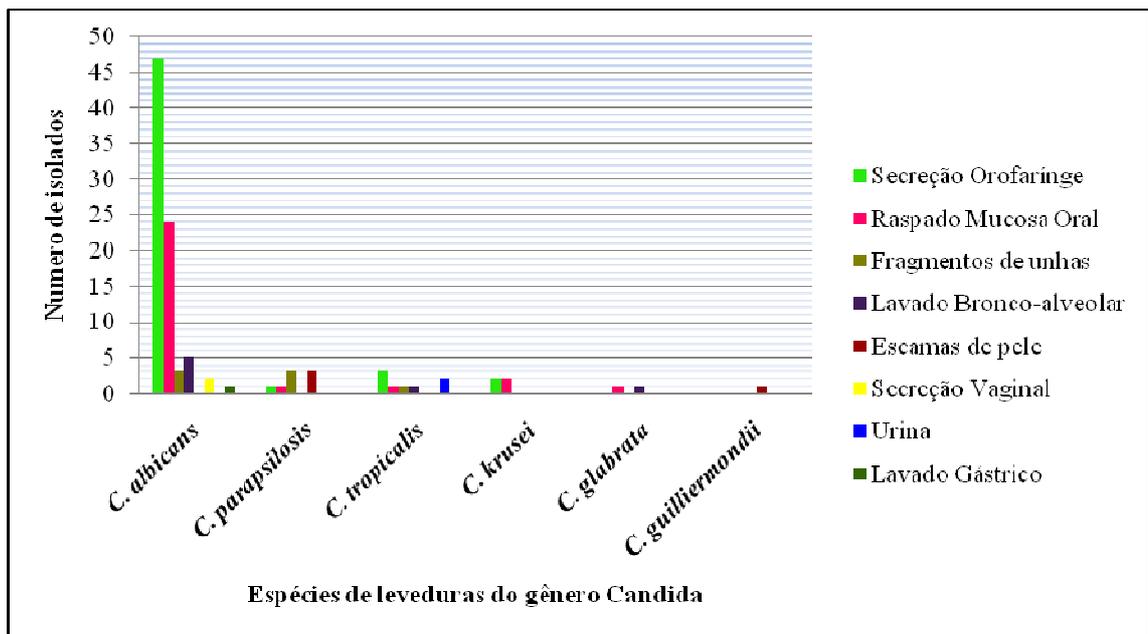


**Figura 1.** Distribuição dos pacientes HIV positivos de acordo com a contagem de células TCD4+ para isolados de *Candida* spp.

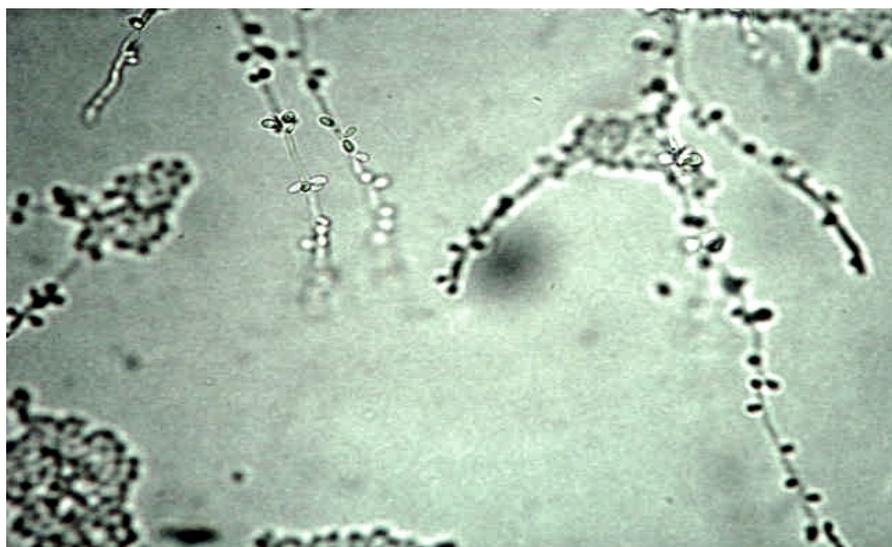
### 5.2.1 Identificação das espécies de leveduras do gênero *Candida*

Das 105 espécies de *Candida* spp isoladas de amostras clínicas de secreção de orofaringe, raspado de mucosa oral, lavado bronco-alveolar, fragmentos de unha, escamas de pele, secreção vaginal, urina e lavado gástrico foi obtida a seguinte

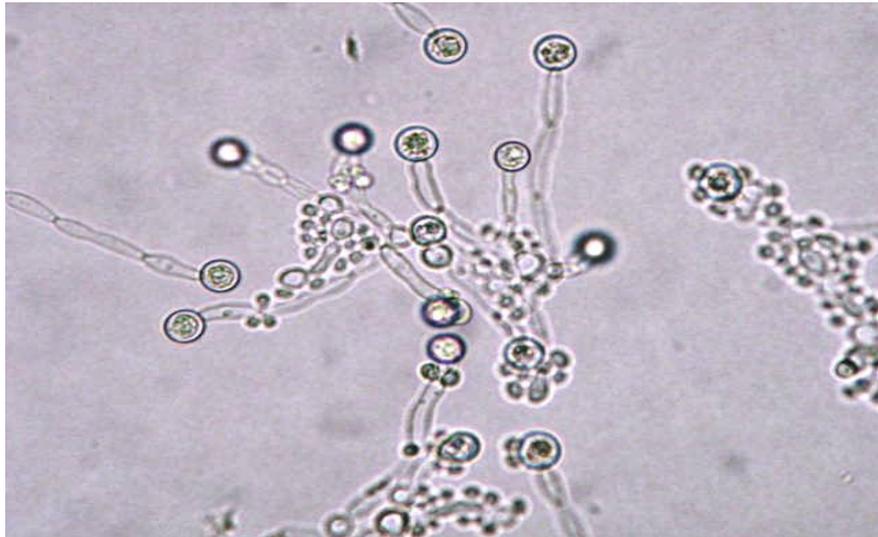
caracterização: 82 (78,1%) *Candida albicans*, 8 (7,6%) *Candida parapsilosis*, 8 (7,6%) *Candida tropicalis*, 4 (3,8%) *Candida krusei*, 2 (1,9%) *Candida glabrata*, e 1 (0,95%) *Candida guilliermondii* (Figuras 2, 3,4,5,6,7).



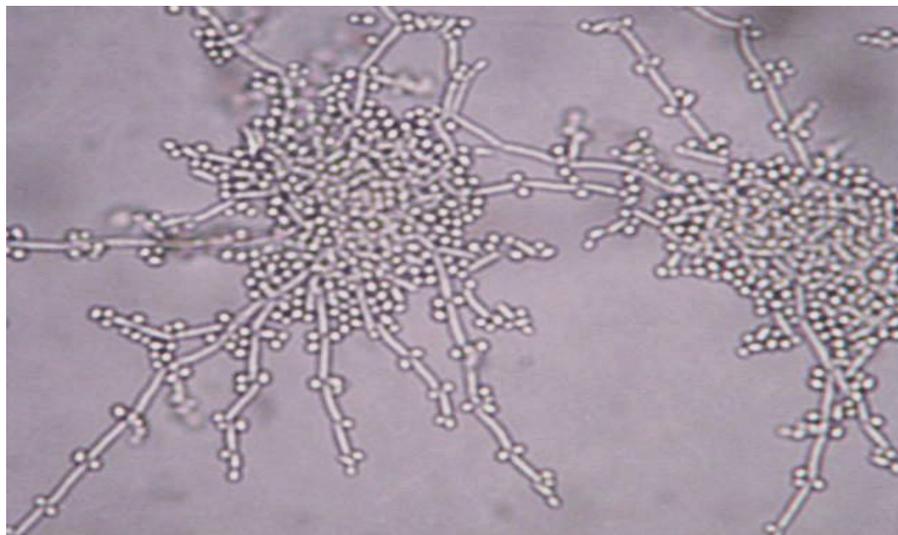
**Figura 2.** Distribuição das espécies de leveduras do gênero *Candida* nas distintas amostras clínicas.



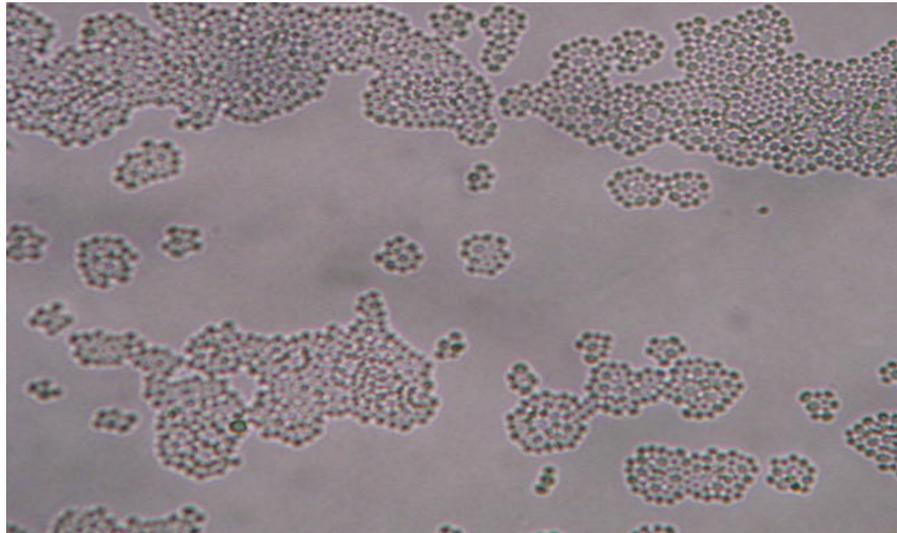
**Figura 3** - Aspecto micromorfológico de *C. tropicalis*  
 Fonte: Imagem obtida pela autora, Laboratório de Micologia – LI-FCM - Amostra: 145/08



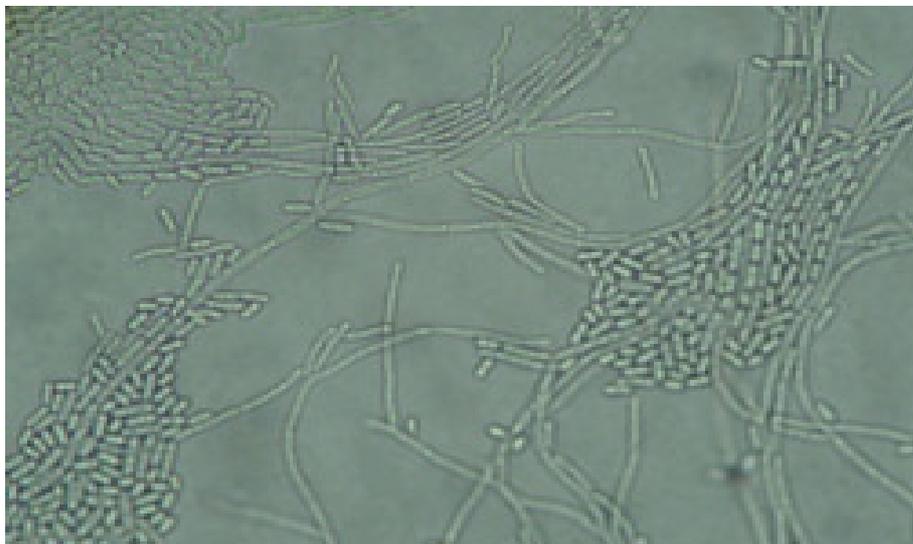
**Figura 4** - Aspecto micromorfológico de *C. albicans*  
Fonte: Imagem obtida pela autora, Laboratório de  
Micologia – LI-FCM - Amostra: 85/08



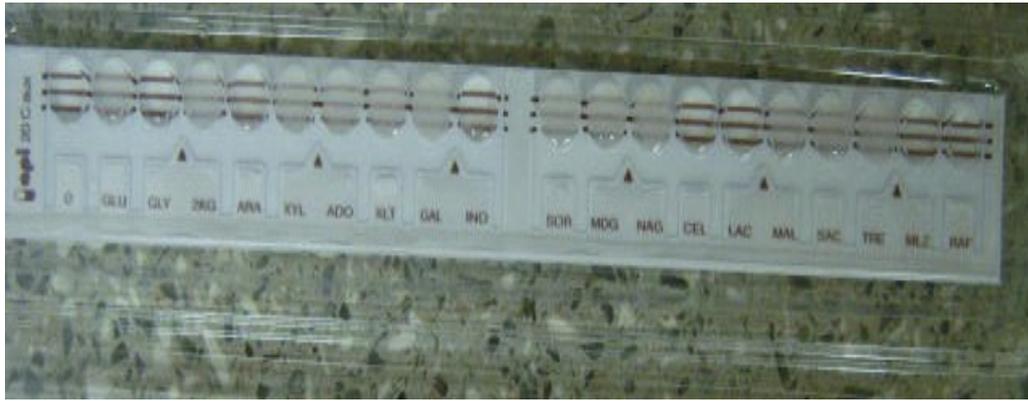
**Figura 5** - Aspecto micromorfológico de *C. parapsilosis*  
Fonte: Imagem obtida pela autora, Laboratório de  
Micologia – LI-FCM - Amostra: 134/08



**Figura 6** - Aspecto micromorfológico de *C. glabrata*  
Fonte: Imagem obtida pela autora, Laboratório de  
Micologia – LI-FCM - Amostra: 101/08



**Figura 7** - Aspecto micromorfológico de *C. krusei*  
Fonte: Imagem obtida pela autora, Laboratório de  
Micologia – LI-FCM - Amostra: 111/08



**Figura 8** – Exemplo de Galeria do sistema comercial API 20C AUX da Biomeri ux mostrando perfil de identifica o de leveduras do gênero *Candida*.

### 5.2.2 Determina o da concentra o inibitória mínima das cinco drogas antifúngicas para os isolados de leveduras do gênero *Candida*

As concentra es inibitórias mínimas dos antifúngicos cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B foram determinadas para os 105 isolados de leveduras do gênero *Candida* provenientes de pacientes HIV positivos utilizando a metodologia comercial Etest  (Figura 9).



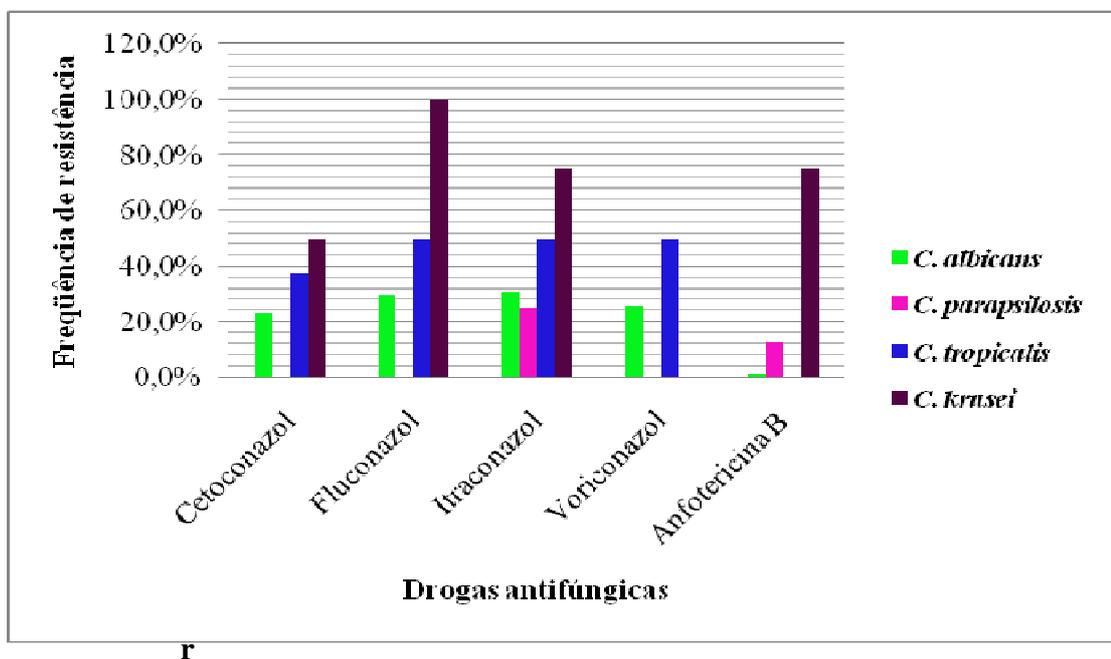
**Figura 9-** Exemplo de testes *in vitro* (Etest) para avalia o do perfil de susceptibilidade *in vitro* frente ao cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B, para leveduras do gênero *Candida*.

Os resultados das CIMs obtidas frente às cinco drogas, a variação entre os valores mínimos e máximos das CIMs e os valores da CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> dos isolados das espécies de *Candida* spp estão apresentados na tabela 2. Os valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> corresponderam, respectivamente, às concentrações das drogas que inibiram o crescimento de 50% e 90% dos isolados.

O teste de susceptibilidade não foi realizado para o único isolado de *C. guilliermondii*, devido à contaminação da amostra.

Comparando os valores de CIM de cada droga, observou-se um amplo espectro de variação frente aos antifúngicos testados e frequência elevada de resistência em relação aos valores de CIM<sub>90</sub> para maioria dos isolados. O isolado caracterizado como *C. krusei* demonstrou resistência para valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> para todos os antifúngicos testados, exceto para o voriconazol. Foram observados elevados valores de CIM<sub>s</sub>, indicando resistência, para *C. albicans*, sendo estes valores iguais a 29,7% (fluconazol), 28,4% (itraconazol), 24,7% (voriconazol) , 22,2% (cetoconazol) e 1,23% para a anfotericina B. Considerando todos os antifúngicos testados, o fluconazol foi aquele que contribuiu com maiores valores, sugerindo resistência para a maioria dos isolados, como se segue: *C. krusei* (100%), *C. albicans* (29,7%), *C. tropicalis* (37,5%). Também foi observado um número elevado de isolados resistentes ao itraconazol e cetoconazol, para as espécies: *C. krusei* (75%), *C. albicans* (28,4%), *C. tropicalis* (37,5%), e *C. krusei* (50%); *C. albicans* (22,2%) e *C. tropicalis* (37,5%) respectivamente. A espécie *C. parapsilosis* mostrou-se resistente apenas ao itraconazol (25%) e anfotericina B (12,5%). Também foram encontrados isolados resistentes a anfotericina B, destacando a *C. krusei* (75%) como ilustra a figura 10. As espécies de *C. glabrata* mostraram-se susceptíveis à quatro antifúngicos testados, porém exibiram resistência ao itraconazol.

A porcentagem de isolados susceptíveis (S) e resistentes (R) frente ao cetoconazol e anfotericina B respectivamente, esta apresentada na tabela 2. Porém, para o itraconazol, fluconazol e voriconazol, os valores referentes à susceptibilidade dose-dependência foram considerados. A distribuição de valores de CIM dos antifúngicos testados para as leveduras do gênero *Candida* está apresentada nas figuras 11, 12, 13.



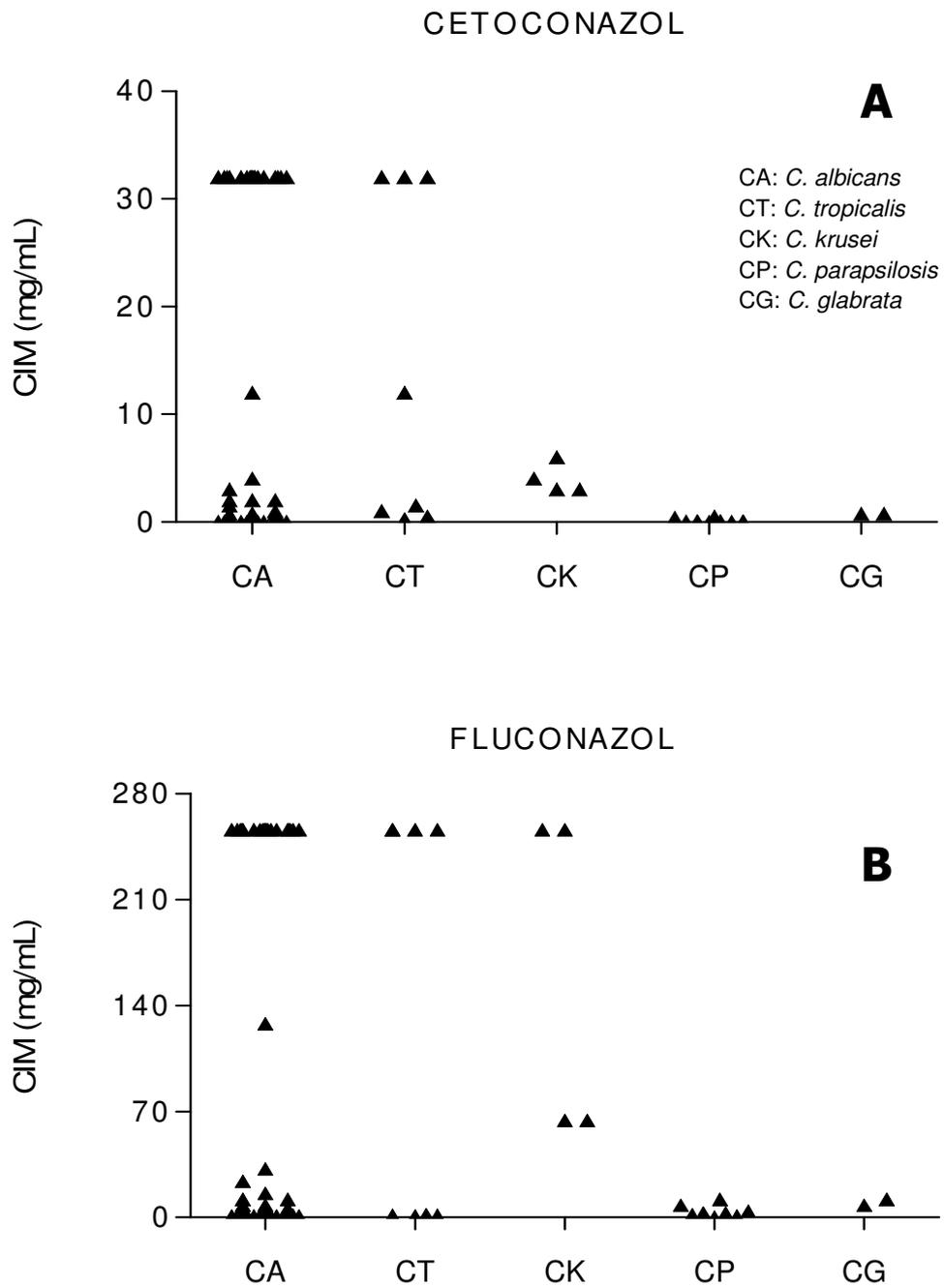
**Figura 10.** Frequência de resistência dos isolados de leveduras do gênero *Candida* provenientes de diversas amostras clínicas frente aos antifúngicos testados.

**Tabela 2** - Concentrações inibitórias mínimas das cinco drogas antifúngicas frente às espécies de leveduras do gênero *Candida* das distintas amostras clínicas.

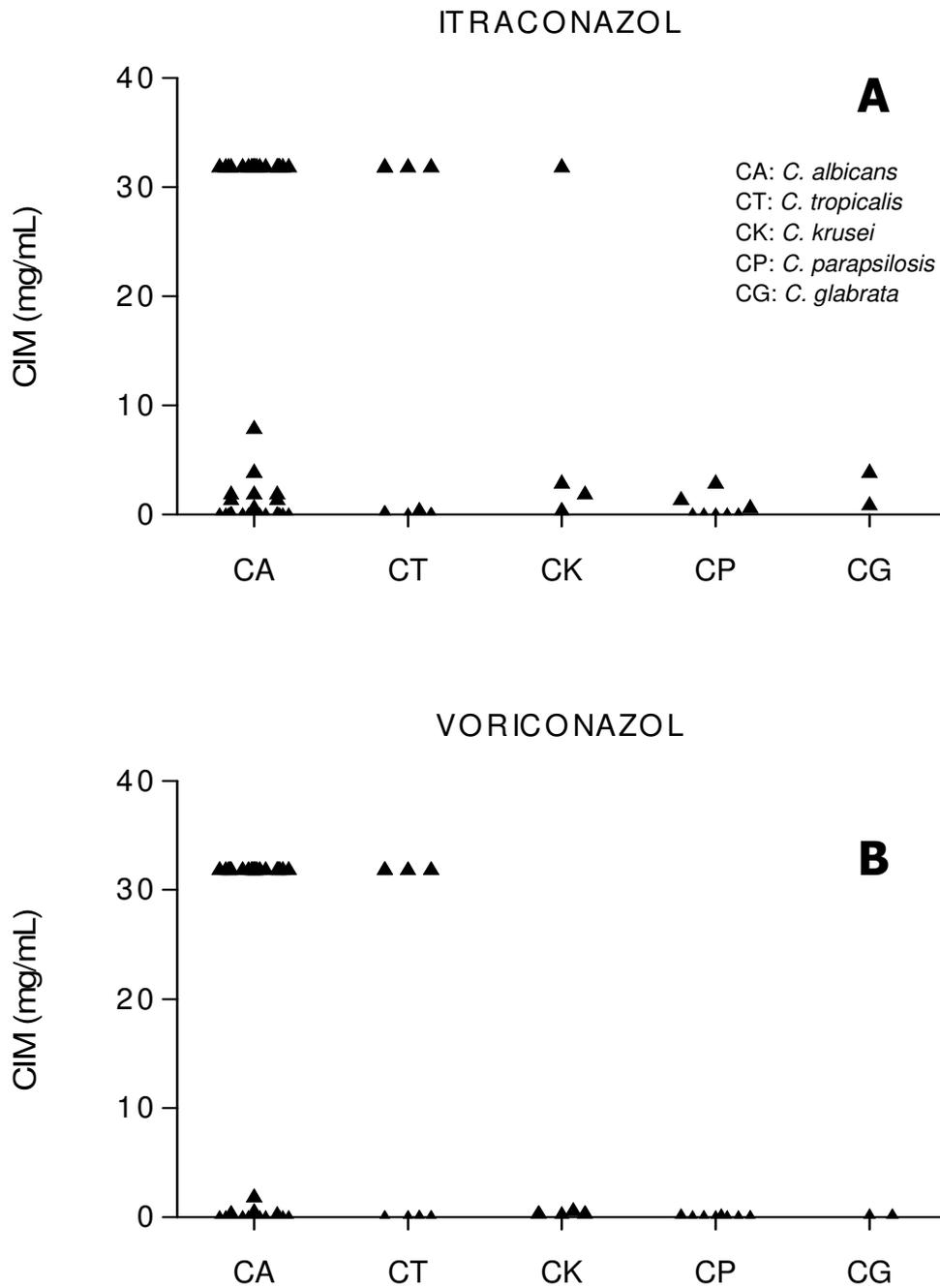
Droga Antifúngica	<i>Candida</i> spp	Variação	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )		Perfil de susceptibilidade		
			50	90	S(%)*	SDD(%)**	R(%)***
Cetoconazol	<i>C. albicans</i> (n=82)	0,002 a >32	0,19	>32	76,5	-	23,4
	<i>C. parapsilosis</i> (n=8)	0,016 a 0,75	0,125	0,50	100,0	-	0,0
	<i>C. tropicalis</i> (n=8)	0,25 a >32	1,5	>32	62,5	-	37,5
	<i>C. krusei</i> (n=4)	3,0 a 6,0	3	4	50,0	-	50,0
Fluconazol	<i>C. albicans</i> (n=82)	0,023 a >256	4	>256	66,7	3,8	29,6
	<i>C. parapsilosis</i> (n=8)	0,19 a 12,0	2	8	87,5	12,5	0,0
	<i>C. tropicalis</i> (n=8)	1,0 a >256	2	>256	50,0	0,0	50,0
	<i>C. krusei</i> (n=4)	64 a >256	64	>256	0,0	0,0	100,0
Itraconazol	<i>C. albicans</i> (n=82)	0,003 a >32	0,032	>32	67,9	1,23	30,8
	<i>C. parapsilosis</i> (n=8)	0,004 a 3,0	0,032	1,5	62,5	12,5	25,0
	<i>C. tropicalis</i> (n=8)	0,012 a >32	0,5	>32	25,0	25,0	50,0
	<i>C. krusei</i> (n=4)	0,50 a >256	2	>32	0,0	25,0	75,00
Voriconazol	<i>C. albicans</i> (n=82)	0,012 a >32	0,064	>32	72,8	1,2	25,9
	<i>C. parapsilosis</i> (n=8)	0,012 a 0,032	0,032	0,19	100,0	0,0	0,0
	<i>C. tropicalis</i> (n=8)	0,047 a >32	0,094	>32	50,0	0,0	50,0
	<i>C. krusei</i> (n=4)	0,38 a 0,75	0,50	0,75	100,0	0,0	0,0
Anfotericina B	<i>C. albicans</i> (n=82)	0,38 a 0,50	0,125	0,5	98,7	-	1,23
	<i>C. parapsilosis</i> (n=8)	0,25 a 3	0,50	0,75	87,5	-	12,5
	<i>C. tropicalis</i> (n=8)	0,012 a 1,0	0,38	1	100,0	-	0,0
	<i>C. krusei</i> (n=4)	1,0 a 4,0	2	3	25,0	-	75,0

\*Susceptível (S); \*\*Susceptível dose-dependente (SDD);\*\*\*Resistente (R).

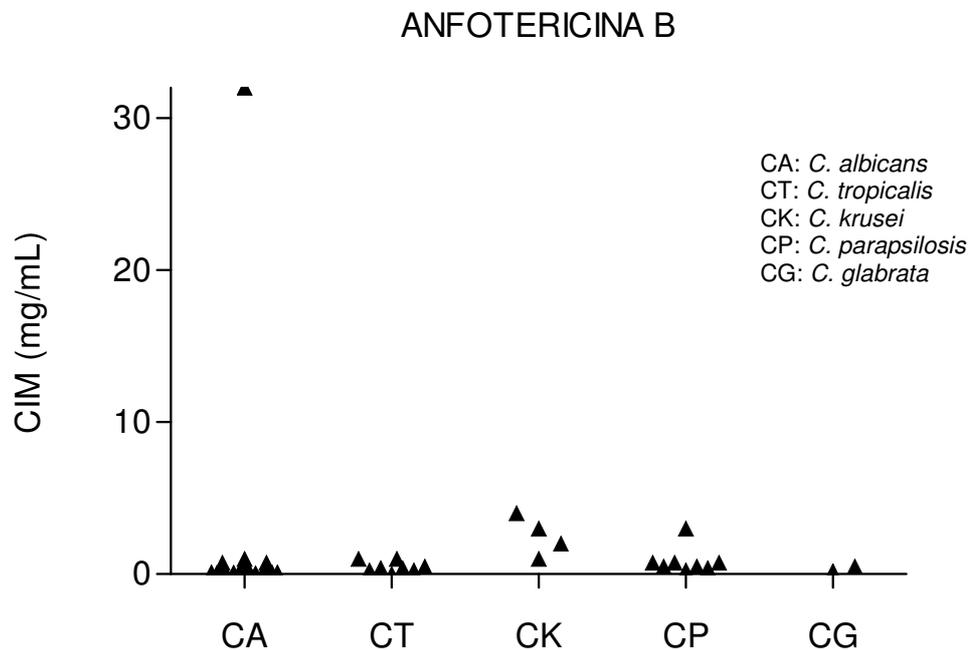
CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub>, concentração capaz de inibir o crescimento dos isolados em 50% e 90% respectivamente.



**Figura 11** - Distribuição de valores de CIM de cetoconazol (A) e fluconazol (B) frente às espécies de leveduras do gênero *Candida*.



**Figura 12** - Distribuição de valores de CIM de itraconazol (A) e voriconazol (B) frente às espécies de leveduras do gênero *Candida*.



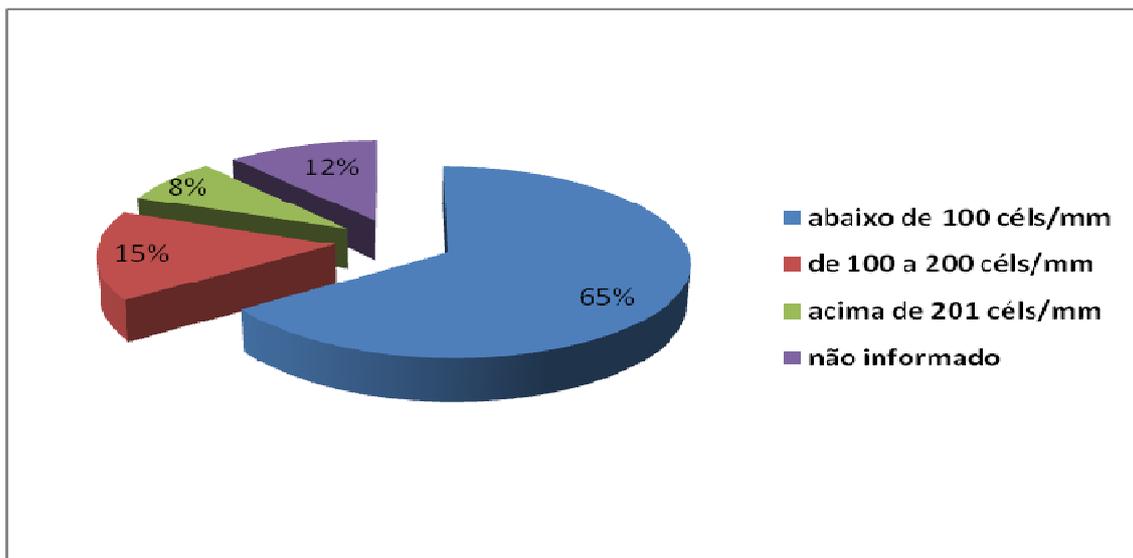
**Figura 13** - Distribuição de valores de CIM de anfotericina B frente às espécies de leveduras do gênero *Candida*.

### 5.3 Isolamento das leveduras do gênero *Cryptococcus* nas amostras clínicas

Considerando os 26 pacientes em que foram isolados *Cryptococcus* spp a média (DP) de idade foi de 40,2 (8,7) anos, variando de 25 a 62 anos Destes pacientes, 17 pertenciam ao sexo masculino e nove ao sexo feminino.

Para os isolados de *Cryptococcus* spp, a contagem de linfócitos TCD<sup>4+</sup> variou de 8 a 293 céls/mm<sup>3</sup>, com média (DP) de 74,4 (75,7) céls/mm<sup>3</sup>. Dos pacientes HIV positivos analisados, 65,4% dos pacientes estavam com contagem de células CD4+ abaixo de 100 céls/mm<sup>3</sup>. Para 15,4% dos pacientes, os valores estiveram compreendidos

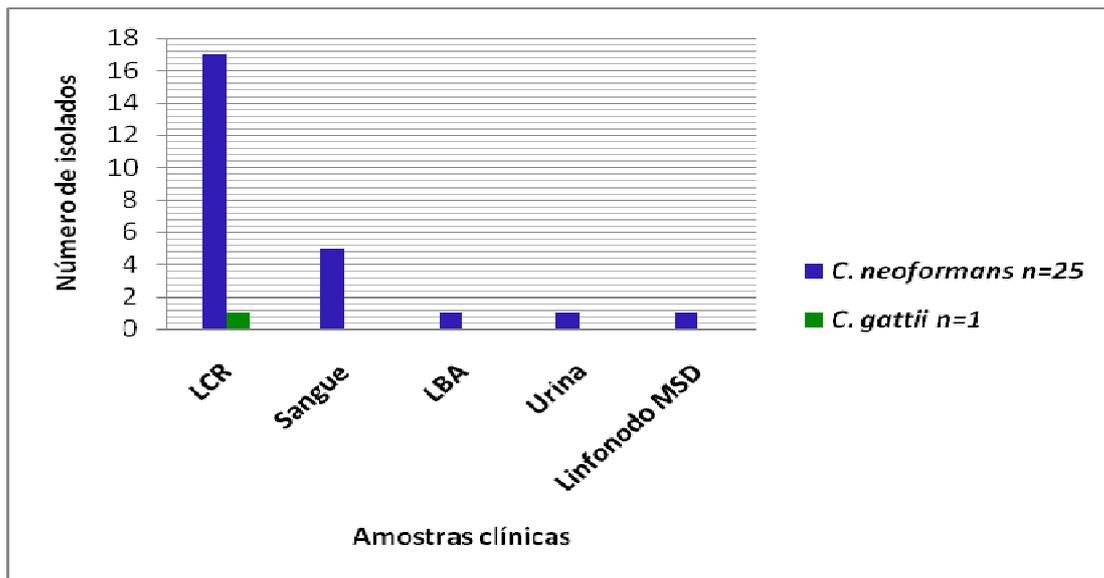
entre 100 a 200 céls/mm<sup>3</sup> e para 7,7% acima de 200 céls/mm<sup>3</sup>. Em 11,5% dos pacientes estudados não foram obtidas informações relacionadas aos valores de CD4+ (Figura 14). A média (DP) da carga viral foi de 148.398,1 (181.694,8) cópias/mm<sup>3</sup>. Dos 26 pacientes estudados, 50,0% estavam em uso de terapia HAART.



**Figura 14.** Distribuição dos pacientes HIV positivos de acordo com a contagem de células TCD4+ para isolados de *Cryptococcus* spp.

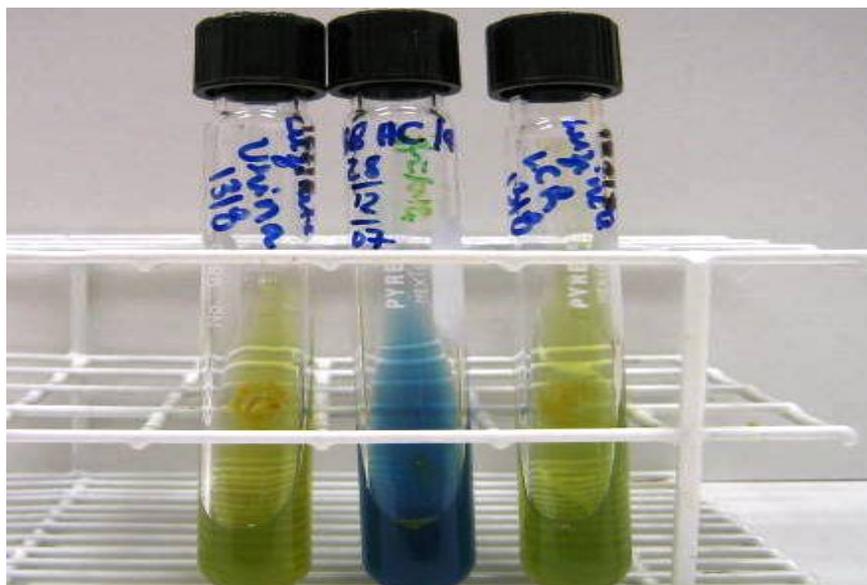
### 5.3.1 Identificação das espécies de leveduras do gênero *Cryptococcus*

Vinte e seis isolados clínicos de *Cryptococcus* spp foram isolados a partir dos materiais clínicos: líquido, sangue, escarro, urina e linfonodo de membro superior direito (Figura 15).



**Figura 15.** Distribuição das espécies de leveduras do gênero *Cryptococcus* em distintas amostras clínicas.

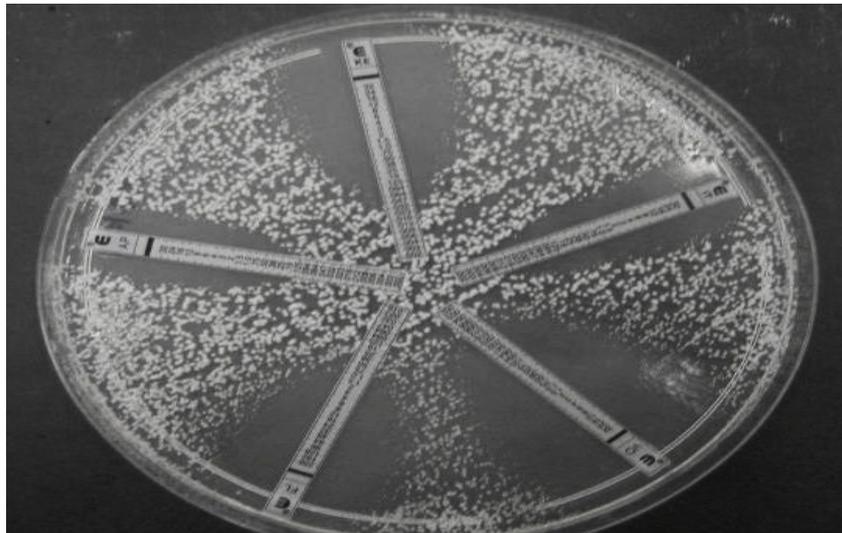
As espécies de leveduras do gênero *Cryptococcus* foram caracterizadas em *C. neoformans* (n=25 - 96,1%) e *C. gattii* (n=1 - 3,8%) (Figura 16).



**Figura 16 -** Caracterização das espécies de leveduras do gênero *Cryptococcus* em meio CGB. A coloração azul indica teste positivo - *C.gattii* e, a coloração verde indica teste negativo - *C.neoformans*.

### 5.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima das cinco drogas antifúngicas para os isolados de leveduras do gênero *Cryptococcus*

As concentrações inibitórias mínimas dos antifúngicos cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B foram determinadas para os 26 isolados de leveduras do gênero *Cryptococcus* isolados de pacientes HIV positivos utilizando a metodologia comercial Etest® (Figura 17).



**Figura 9-** Exemplo de testes *in vitro* (Etest) para avaliação do perfil de susceptibilidade *in vitro* frente ao cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B, para leveduras do gênero *Cryptococcus*.

Os resultados das CIMs obtidas frente às cinco drogas, a variação entre os valores mínimos e máximos das CIMs e os valores da CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> dos isolados das espécies de *Candida* spp estão apresentados na tabela 4. Os valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> corresponderam, respectivamente, às concentrações das drogas que inibiram o crescimento de 50% e 90% dos isolados. A CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> do isolado de *C. gattii* não foram determinadas devido ao número restrito. Os valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) encontrados

para a espécie *C. gattii* frente aos antifúngicos foram: cetoconazol - 3,0; fluconazol - >256; itraconazol - 3,0; voriconazol - 0,5; anfotericina - B 0,064.

A maioria dos isolados de *C. neoformans* mostraram-se susceptíveis aos cinco antifúngicos testados, 8% mostraram-se resistentes e 20% susceptíveis dose-dependentes frente ao fluconazol. Considerando o itraconazol, 8,0% mostraram-se resistentes e 16% susceptíveis dose dependentes. Enquanto que o isolado de *C. gattii* apresentou resistência *in vitro* ao fluconazol (CIM >256 µg/mL) e itraconazol (CIM 3,0 µg/mL).

A porcentagem de isolados susceptíveis (S) e resistentes (R) frente ao cetoconazol e anfotericina B respectivamente, estão apresentados nas tabelas 2. Porém, para o itraconazol, fluconazol e voriconazol, os valores referentes à susceptibilidade dose-dependência foram considerados.

Quanto ao local de isolamento, os isolados de *C. neoformans* provenientes do LCR apresentaram valores de CIM mais elevados para todos os antifúngicos testados quando comparados aos outros sítios de isolamento, exceto para anfotericina B (Tabela 3).

**Tabela 3** - Variação da concentração inibitória mínima quanto ao local de isolamento de amostras de *Cryptococcus neoformans*.

---

---

<b>Variação da CIM (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>				
<b>Antifúngico</b>	<b>Local de isolamento de <i>Cryptococcus neoformans</i> e n° de amostras</b>			
	<b>LCR</b>	<b>Sangue</b>	<b>Escarro</b>	<b>LNF MSD</b>
	<b>n=17</b>	<b>n=6</b>	<b>n=1</b>	<b>n=1</b>
<b>Cetoconazol</b>	0,064 - 1,5	0,25 - 0,75	0,5	0,25
<b>Fluconazol</b>	1,0 - >256	2,0 - 16,0	12	2
<b>Itraconazol</b>	0,008 - 1,5	0,064 - 0,25	0,19	0,012
<b>Voriconazol</b>	0,012 - 0,25	0,016 - 0,064	0,064	0,023
<b>Anfotericina B</b>	0,094 - 1,0	0,38 - 1,0	0,38	0,75

---

**Tabela 4** - Concentração inibitória mínima das cinco drogas antifúngicas frente às espécies de leveduras do gênero *Candida* em distintos espécimes clínicos.

<i>Cryptococcus spp</i>	Antifúngico	Variação	CIM (µg/ml)		Perfil de susceptibilidade		
			50%	90%	S (%)*	SDD (%)**	R (%)***
<i>C. neoformans</i>	Cetoconazol	0,064 a 1,5	0,5	0,75	100,0	-	0,0
	Fluconazol	1,0 a > 256	8	16	52,4	20,0	8,0
	Itraconazol	0,008 a 1,5	0,064	0,38	61,9	16,0	8,0
	Voriconazol	0,012 a 0,25	0,032	0,064	100,0	0,0	0,0
	Anfotericina B	0,094 a 1,0	0,50	0,75	100,0	0,0	0,0

\*Susceptível (S); \*\*Susceptível dose-dependente (SDD);\*\*\*Resistente (R).

°CIM<sub>50</sub> e °°CIM<sub>90</sub>, concentração capaz de inibir o crescimento dos isolados em 50% e 90% respectivamente.

## **6. DISCUSSÃO**

De forma usual, a resistência de fungos aos antimicrobianos ocorre como consequência da utilização destes agentes na prática médica. A partir do aumento da população de pacientes imunodeprimidos e elevação da ocorrência de infecções fúngicas nesses pacientes, têm sido registradas elevadas taxas de resistência aos antifúngicos. Dentre os microorganismos do Reino fungi, o gênero mais estudado, considerando os mecanismos de resistência aos antifúngicos, é *Candida* spp. Entretanto, alguns desses mecanismos podem ser semelhantes a outros gêneros, dentre eles, *Cryptococcus* spp.<sup>47</sup>

Em pacientes HIV positivos e com AIDS, o desenvolvimento de meningite criptocócica é freqüente. Durante a terapia de manutenção com o azólico fluconazol, o fungo gera um mecanismo capaz de driblar a ação da droga antifúngica, possibilitando recidivas da infecção.

47

### **6.1 Freqüência de isolamento das leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* em pacientes com HIV/AIDS**

Alguns trabalhos têm sido realizados com o objetivo conhecer a distribuição de espécies de leveduras do gênero *Candida* em pacientes HIV positivos e com AIDS. Em 2002, um grupo de pesquisadores brasileiros registrou a distribuição de espécies desse gênero em pacientes com AIDS, procedentes de diferentes regiões do Brasil. Eles também analisaram o perfil de susceptibilidade ao fluconazol, itraconazol e cetoconazol.<sup>33</sup> A população avaliada correspondeu a 130 pacientes com AIDS e 142 isolados foram recuperados da cavidade oral dos mesmos. A idade dos pacientes variou de 18 a 65 anos, com média de 34 anos, sendo que 94 foram pertencentes ao sexo masculino (72%). Neste estudo, a média de idade detectada foi pouco superior, igual a 40,2 anos, sendo que 56,8% pertenciam ao sexo masculino de um total de 102 pacientes avaliados.

Considerando o isolamento de leveduras do gênero *Cryptococcus*, dos 160 pacientes avaliados neste estudo, em 26 (16,3%) o diagnóstico laboratorial de criptococose foi confirmado.

Recentemente (2008), em um total de 104 pacientes com suspeita clínica de meningoencefalite, foi registrada uma prevalência igual a 12,5% (13/104) demonstrando infecção pelo vírus HIV e criptococose. Na Colômbia foi realizado um estudo clínico-epidemiológico sobre a criptococose e os resultados obtidos foram decorrentes de uma avaliação realizada no período compreendido entre 1997 – 2005. Foram analisadas 93 amostras procedentes de 76 centros. Destas, 891 (95,7%) corresponderam a caso de neurocriptococose, 27 (2,9%) as formas pulmonares, 5 (0,5%) à lesões cutâneas, 2 (0,2%) a formas ganglionares, 2 (0,2%) a úlceras orofaríngeas e 1 (0,1%) para cada uma das seguintes formas clínicas: peritonite, lesão hepática, celulite de membros inferiores e infecção das vias urinárias. Em relação ao sexo, 82,7% foram homens com predomínio de adultos jovens. No entanto, foram registrados 25 (2,7%) casos em crianças.<sup>147</sup>

Na última década, a incidência da criptococose em pacientes com AIDS foi estimada de 6 a 10% nos Estados Unidos, oeste da Europa e Austrália e de 15 a 30% na África. A incidência é praticamente alta no sudeste dos Estados Unidos e na África equatorial.<sup>47</sup>

É forçoso considerar que os dados obtidos neste estudo não devem ser comparados diretamente a outros trabalhos disponíveis na literatura, considerando peculiaridades da população incluída.

## **6.2 Infecção por leveduras do gênero *Candida* e depressão imune em pacientes portadores de HIV/AIDS**

Sant'Ana et al. (2002)<sup>33</sup> no Brasil, registraram que em 115 de 130 pacientes, a contagem de linfócitos TCD<sub>4</sub><sup>+</sup> apresentaram valores oscilando entre 0 a 454 céls/mm<sup>3</sup>, e média de 42 céls/mm<sup>3</sup>. Apenas 10 pacientes mostraram valores elevados superiores a 200 céls/mm<sup>3</sup>. Esses valores contrastam com os encontrados neste estudo, pois a média de células encontradas foi de 170 céls/mm<sup>3</sup>. No entanto, vale ressaltar que, neste estudo, em 40% dos pacientes não foi possível obter informações referentes aos valores de TCD<sub>4</sub><sup>+</sup>. Já em relação à terapia HAART, taxas muito próximas foram encontradas por aqueles autores (37%) e neste estudo (38,2%).

## **6.3 Infecção por leveduras do gênero *Cryptococcus* e depressão imune em pacientes portadores de HIV/AIDS**

Poucos trabalhos foram encontrados na literatura abordando este tópico. Entretanto, em 2007, trabalho interessante foi publicado por um grupo francês, no que se refere à prevalência, determinantes de positividade e utilidade clínica da antigenemia criptocócica em pacientes HIV do Camboja. Em área endêmica, foram avaliados 327 pacientes e a prevalência de criptococose foi igual a 18% nessa população. As conclusões desse trabalho apontam que detecção de polissacarídeo da membrana criptocócica em pacientes com AIDS e contagem de linfócitos TCD<sub>4</sub> inferior a 100 céls/mm<sup>3</sup>, podem ser úteis em áreas endêmicas para criptococose, permitindo o diagnóstico precoce e o tratamento desta infecção oportunista.<sup>148</sup>

Neste estudo, não foi realizada a pesquisa de antígeno criptocócico, devido ao alto custo do teste. No entanto, foi observado que em 65,4% dos pacientes a contagem foi inferior a 100 céls/mm<sup>3</sup>. Este percentual corresponde, portanto a maioria dos indivíduos infectados pelas

leveduras do gênero *Cryptococcus*. Para este grupo, haveria indicação da detecção do antígeno criptocócico, objetivando diagnóstico precoce da infecção fúngica, não raramente fatal. Vale ressaltar que o diagnóstico pela detecção de antígenos é mais sensível (sensibilidade =95%) do que a cultura (sensibilidade=75%) ou a microscopia direta utilizando o método da tinta nanquim (sensibilidade=50%).<sup>59</sup> Em pacientes com AIDS e criptococose, o status imunológico permanece inalterado ao longo do tempo, isto é, contagens de CD4 freqüentes  $\leq 100$  céls/mm<sup>3</sup>.<sup>47</sup>

#### 6.4 Perfil de distribuição de leveduras do gênero *Candida*

Neste estudo foram identificadas espécies distintas referentes às leveduras do gênero *Candida*, sendo a *C. albicans* a mais prevalente.

Sant Ana et al. (2002)<sup>33</sup> também registraram que a espécie *C. albicans* foi a mais freqüentemente isolada (91%) sendo que 70% dessas pertenciam ao sorotipo A. Neste estudo, o método da sorotipagem não foi realizado, impossibilitando desta forma a comparação em relação à prevalência dos sorotipos. Considerando as espécies não albicans, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* foram identificadas neste estudo e, de forma coincidente, no primeiro estudo multicêntrico realizado no Brasil.<sup>33</sup> Em contraste, as espécies *C. glabrata* e *C. guilliermondii* só foram identificadas em nosso estudo, correspondendo apenas à 3,8% e 0,9%, respectivamente da população total avaliada. Um grupo de pesquisadores espanhóis avaliou a cavidade oral de 307 pacientes infectados pelo vírus HIV e obtiveram 135 isolamentos referentes à *C. albicans*, três à *C. krusei* e dois à *C. glabrata*.<sup>107</sup> Estas espécies são coincidentes com aquelas encontradas em nosso estudo. Silva et al. (1998)<sup>149</sup>, isolaram leveduras do gênero *Candida* em 59 (68,6%) a partir de 86 amostras clínicas de mucosa oral

de pacientes com AIDS. Destas, 88,1% corresponderam a *C. albicans*, 6,7% à *C. tropicalis* e 5,1 a *C. krusei*. Estes achados corroboram a alta prevalência de *C. albicans* em mucosa oral, dado semelhante ao achado em nosso estudo. Vale salientar que o maior número de isolamentos referentes às leveduras do gênero *Candida* foi detectado neste estudo em raspados de mucosa oral e secreção de orofaringe, achado este similar aos registros encontrados na literatura.<sup>33, 112, 149, 150</sup>

### **6.5 Determinação da concentração inibitória mínima para leveduras do gênero *Candida***

Em Mato Grosso, não foram registrados até o momento dados referentes ao perfil de susceptibilidade dos isolados de *Candida* spp provenientes de pacientes HIV positivos e com AIDS. Os resultados encontrados neste estudo evidenciaram resistência *in vitro* aos antifúngicos testados, com ênfase ao fluconazol. Dados publicados por Sánchez-Vargas et al. (2005)<sup>68</sup>, evidenciaram que 10,8% das leveduras isoladas a partir de 111 pacientes mexicanos infectados pelo vírus HIV, mostraram-se resistentes a um ou mais derivados azólicos. Ao considerarmos a espécie *C. albicans* em nosso estudo, verificamos que foram obtidos percentuais superiores, sugerindo resistência dessa espécie ao fluconazol, itraconazol, e anfotericina B.

Considerando o voriconazol, foram obtidos dados neste estudo que mostraram 24,7% de resistência à *C. albicans*. Em trabalho publicado por Wingeter et al. (2007)<sup>22</sup>, avaliando 100 pacientes infectados pelo HIV, 58 apresentaram culturas positivas para *Candida* spp, sendo a espécie *C. albicans* a mais frequentemente isolada, como neste estudo. De forma geral, a susceptibilidade foi alta, mais de 60% dos isolados foram susceptíveis a todos os antifúngicos

testados, sendo que para o cetoconazol foi observado maior número de isolados resistentes em oposição ao presente estudo, que aponta o maior número de isolados resistentes ao itraconazol. Wingeter et al. (2007)<sup>22</sup>, também apontaram que para o cetoconazol e itraconazol, foi observada uma variação maior de susceptibilidade entre as amostras testadas, isto é 72% dos isolados apresentaram CIM < 1µg/mL para o cetoconazol, enquanto 77 % foram susceptíveis ao itraconazol com CIM 1 µg/mL.

Por outro lado, alguns autores relatam que o uso profilático de antifúngicos em pacientes com AIDS foi associado à redução da susceptibilidade ao fluconazol para espécies isoladas de *C. albicans*, em episódios de candidíase oral ou recorrente.<sup>151</sup>

Na Colômbia, Gutiérrez et al. (2007)<sup>111</sup>, avaliaram a susceptibilidade ao fluconazol e voriconazol a partir de isolamentos da mucosa oral provenientes de 54 pacientes com AIDS. Os resultados mostraram 72% das cepas isoladas de *Candida* spp, susceptíveis ao fluconazol, 6,3% suscetíveis dose-dependentes e 20,8 % resistentes. Resultados semelhantes foram encontrados em nosso estudo, apontando 66,7% de susceptibilidade. Já considerando as cepas susceptíveis dose dependentes, foram encontrados valores inferiores (3,8 %), e superiores em se tratando de resistência (29,6 %).

A maioria dos trabalhos disponíveis na literatura avalia o perfil de susceptibilidade *in vitro* aos derivados azólicos, mas é forçoso considerar o valor correspondente à resistência para anfotericina B igual a 1,23 %.

## 6.6 Perfil de susceptibilidade a drogas antifúngicas para leveduras do gênero *Cryptococcus*

Uma série ampla de estudos tem sido registrada e visa determinar a susceptibilidade *in vitro* de *C. neoformans*, utilizando, para tanto, diferentes metodologias.

A partir do emprego da metodologia da macrodiluição, Fernandes et al. (2003)<sup>9</sup> determinaram a susceptibilidade à três antifúngicos (fluconazol, itraconazol e anfotericina B) de 56 isolados de *C. neoformans* e de 4 *C. gattii*.

As oscilações de CIMs referentes aos isolados de *C. gattii* foram para o fluconazol, itraconazol e a anfotericina B, respectivamente, 24 a 256 µg/mL, 0,19 a 0,75 µg/mL e 0,75 a 1 µg/mL. Em nosso estudo, a partir da utilização da metodologia do Etest, o único isolado de *C. gattii* apresentou resistência *in vitro* ao fluconazol (CIM > 256 µg/mL) e itraconazol (CIM = 3,0 µg/mL).

Alves et al. (2001)<sup>152</sup>, utilizando a metodologia empregada por Fernandes et al (2003)<sup>9</sup>, apenas com acréscimo de 2% de glicose ao meio líquido de RPMI, determinaram a susceptibilidade de 82 amostras (isolados clínicos e ambientais) de *C. neoformans* para 4 drogas antifúngicas: fluconazol, itraconazol, cetoconazol e anfotericina B. Observaram variações de CIMs entre 0,125 a 16 µg/mL para o fluconazol, para isolados clínicos e ambientais. Em nosso estudo, foi observada variação igual a 1,0 - >256 µg/mL, considerando os isolados clínicos de *C. neoformans* provenientes do LCR, sendo então este valor superior ao encontrado por Alves et al, em (2001)<sup>152</sup>.

Para efeito de comparação entre metodologias utilizadas, Aller et al. (2000)<sup>23</sup>, utilizaram a metodologia comercial Etest e o método da microdiluição para avaliar *C. neoformans* a quatro antifúngicos. Estes isolados clínicos foram provenientes de 16 pacientes e recolhidos a partir

de distintas amostras clínicas (21 LCR, 11 hemoculturas, um aspirado bronco-alveolar, uma biópsia pulmonar e um aspirado de medula óssea). Em três casos, múltiplos isolados foram obtidos de um mesmo paciente, sendo os isolados oriundos de diferentes episódios de meningite. Cinco isolados foram considerados resistentes ao fluconazol. Em nosso estudo, foi observado percentual igual a 9,5 %, sugerindo resistência ao fluconazol e 38,5 % sugerindo susceptibilidade dose-dependência.

Quando se considera a metodologia do Etest, deve-se registrar os achados de Maxwell et al. (2003)<sup>153</sup>. Esses autores avaliaram tal metodologia para determinar as concentrações inibitórias mínimas frente ao voriconazol e anfotericina B para 162 isolados clínicos de *C. neoformans*. Os resultados encontrados permitem sugerir boa correlação entre a metodologia Etest e o método de referência proposto pelo CLSI. Esses autores relatam, naquele estudo, que esta seria a primeira evidência de que as concentrações inibitórias mínimas obtidas para o voriconazol são comparáveis àquelas obtidas pelo NCCLS. Além disso, esses pesquisadores reconhecem a utilidade do método Etest para determinação *in vitro* de CIMs frente à anfotericina B.

Em Goiânia, Fernandes et al. (2003)<sup>9</sup> determinaram as características das antigas variedades de *C. neoformans* (*C. neoformans* var *neoformans* e *C. neoformans* var *gattii* provenientes de pacientes com AIDS. Em relação ao perfil de susceptibilidade *in vitro*, foi observado que os valores de CIMs para *C. neoformans* var *neoformans* foram inferiores àqueles encontrados para *C. neoformans* var *gattii*. Foi registrada resistência ao fluconazol para três isolados de *C. neoformans* var *gattii*, mas não para *C. neoformans* var *neoformans*. Porém, no presente estudo, foi detectada resistência ao fluconazol (9,5 %), para *C. neoformans*, em contraste com os resultados encontrados em Goiânia, os quais apontam ausência de resistência a esta droga para essa espécie.

Outro estudo reforçando a utilidade do método Etest para testar *in vitro* a susceptibilidade de *C. neoformans* ao voriconazol foi publicado por Chandener et al. (2004)<sup>154</sup>. Além disso, mostra a primeira evidência demonstrando boa atividade da anfotericina B, fluconazol e voriconazol frente aos isolados no Camboja. Esses dados são importantes, pois, apontam, mais uma vez, que a utilização do método Etest é registrada na literatura, e em termos de aplicabilidade no laboratório de rotina, é exequível ao contrário do método de referência (CLSI).

No Brasil, os dados registrados por Trilles et al. (2004)<sup>155</sup> também mostram a menor susceptibilidade de *C. gattii* em relação ao *C. neoformans* para várias drogas antifúngicas testadas, com exceção da anfotericina B e 5-flucitosina.

Registro bastante interessante foi publicado por Larsen et al. (2007)<sup>156</sup>, quando esse grupo conseguiu demonstrar as medidas quantitativas *in vitro* referentes à susceptibilidade para anfotericina B e as respostas quantitativas observadas nos pacientes.

De forma geral, este trabalho nos permitiu conhecer os primeiros dados laboratoriais referentes ao perfil de distribuição das espécies de leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* e de susceptibilidade à drogas antifúngicas em Mato Grosso.

A utilização da metodologia do Etest na rotina laboratorial torna-se adequada frente às necessidades clínicas considerando candidoses e criptococoses em pacientes HIV positivos e/ou com AIDS. Para tanto, a equipe profissional deve ser bem treinada para a correta leitura dos testes realizados, buscando alcançar maior paralelismo entre dados obtidos *in vitro* e resposta terapêutica *in vivo*.

## **7. CONCLUSÕES**

- 1) Das amostras clínicas obtidas, para isolamento de leveduras do gênero *Candida*, as que apresentaram maior frequência de positividade foram os raspados de mucosa oral e secreções de orofaringe.
- 2) A *Candida albicans* foi a espécie mais frequentemente isolada em mucosa oral e orofaríngea na população avaliada.
- 3) Foi observada baixa frequência de isolamento de espécies de *Candida* não *albicans*.
- 4) Os valores de CIMs das espécies de leveduras do gênero *Candida* mostraram uma tendência à resistência *in vitro* para os antifúngicos azólicos, em especial para o fluconazol.
- 5) As espécies de *Candida* “não-*albicans*”, tais como *C. tropicalis* e *C. krusei*, apresentaram tendência à valores mais elevados de CIMs referentes, aos azóis.
- 6) Os valores de CIM encontrados para *C. krusei* em relação à anfotericina B sugerem resistência.
- 7) A espécie *C. neoformans* foi absolutamente predominante em relação a *C. gattii*.
- 8) Os isolados de *C. neoformans* mostraram-se susceptíveis em sua grande maioria aos azólicos e anfotericina B *in vitro*.

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Portal do Ministério da Saúde. Disponível em: <http://WWW.aids.gov.br/data/pages/LUMIS13F4BF21PTBRIE.htm>, 2007.
2. Nunes CLX, Gonçalves LA, Silval PT, Bina JC. Clinical-epidemiological characteristics of a group of HIV/AIDS infected women in Salvador-Bahia. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2004; 37(6):436-440.
3. Brito AM, Castilho EA, Szwarcwald CL. AIDS e infecção pelo HIV no Brasil: uma epidemia multifacetada. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2000; 34(2):207-217.
4. González A, Tobón AM. Fungal opportunistic infections in HIV/AIDS patients. Infectio 2006; 10(4): 279-288.
5. Fidel PL. Immunity to Candida. Oral diseases. 2002; 8(Supl. 2):69-75.
6. Rodrigues GMC, Capobianco TD, Atique TSC, Conceição LM, Fraga VD, Giannini MJSM, e col. Estudo de colonização por *Candida* spp. na cavidade oral de indivíduos soropositivos e soronegativos para HIV-I no Nordeste paulista, Brasil. Rev. Panam. Infectol. 2007; 9(3):26-31.
7. Martinez M, Lopez-Ribot JL, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Bachmann SP, Patterson TF. Replacement of *Candida albicans* with *C. dubliniensis* in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients with Oropharyngeal Candidiasis Treated with Fluconazole. J. Clin. Microbiol. 2002; 40(9):3135–3139.
8. Moran GP, Sullivan DJ, Henman MC, McCreary CE, Harrington BJ, Shanley DB, Coleman DC. Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives in vitro. Antimicrob. Agents Chemother. 1997, 41:617–623.
9. Fernandes OFL, Costa TR, Costa MR, Soares AJ, Pereira AJSC, Silva MR. *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes com AIDS. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2000; 33(1):75-78
10. Lindenberg ASC, Chang MR, Paniago AMM, Lazéra MS, Moncada PMF, Bonfim GS, et al. Clinical and Epidemiological features of 123 cases of cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev. Inst. Med. trop. 2008; 50(2):75-78.
11. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Micoses superficiais. In: Tratado de Micologia Médica. 9 ed. São Paulo: Sarvier; 2002. p.252-340.
12. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. Farmacologia. 6 ed. São Paulo-SP: Elsevier; 2007 p.692-697.
13. Johnson EM, Warnock DW, Luker J, Porter SR, Scully C. Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidosis. J. Antimicrob. Chemother. 1995; 35:103-114.
14. Barchiesi F, Arzeni D, Del Prete MS, Sinicco A, Di Francesco LF, Pasticci MB, et al. Fluconazole susceptibility and strain variation of *Candida albicans* isolates from HIV-infected patients with oropharyngeal candidosis. J. Antimicrob. Chemother. 1998; 41:541-548.

15. Johnson EM, Warnock DW, Luker J, Porter SR, Scully C. Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 1995; 35:103-114.
16. Rex JH, Rinaldi MG, Pfaller MA. Resistance of *Candida* Species to Fluconazole. *Antimicrobial. Agents. Chemother.* 1995; 39(1):1-8.
17. Boken DJ, Swindells S, Rinaldi M G. Fluconazole resistant *Candida albicans*. *Clin. Infect. Dis.* 1993, 17:1018-21.
18. Johnson EM, Warnock DW, Luker J, Porter SR, Scully C. Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 1995, 35:103-14.
19. Jáuregui JMS, Sulibarria ZZ. Las micosis em los pacientes infectados por El VIH em La era de los tratamientos antirretrovirales de gran eficacia. *Rev. Iberoam. Micol.* 2002; 19:5-8.
20. Murphy EL, Collier AC, Kalish LA, et al. Highly active antiretroviral therapy decreases mortality and morbidity in patients with advanced HIV diseases. *Ann. Intern. Med.* 2001; 135: 17-26.
21. Andreo CMF, Machín GM, Zaragoz MTI, Lancha MRP, Sánchez AA, Galloso MB. Sensibilidad *in vitro* de cepas de *Candida* frente a fluconazol y anfotericina B. *Rev. Cub. Med. Trop.* 2007; 59(2).
22. Wingeter MA, Guilhermetti E, Shinobu CS, Takaki I, Svidzinski TIE. Microbiological identification and *in vitro* sensitivity of *Candida* isolates from the oral cavity of HIV-positive individuals. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2007; 40(3):272-276.
23. Aller AI, Martín-Mazuelos E, Gutiérrez MJ, Bernal S, Chávez M, Recio FJ. Comparison of the Etest and microdilution method for antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* to four antifungal agents. *J. Antimic. Chemother.* 2000; 46:997-1000.
24. Ballesté R, Arteta Z, Barloco A, Mier C, Fernández N, Mousqués N, et al. Evaluación Del desempeño diagnóstico Del método de difusión em Agar Etest para El estudio de sensibilidad a los antifúngicos. *Rev. Med. Urug.* 2006; 22:128-135.
25. Tapia C, Gonzáles P, Pereira A, Pérez J, Noriega LM, Palavecino E. Susceptibilidad antifúngica de *Candida albicans* recuperadas de pacientes con SIDA y Candidiasis orofaríngea y esofágica. Experiencia con Etest®. *Rev. Med. Chile* 2003; 131:515-519.
26. Cavassani VGS, Sobrinho JA, Homem MGN, Rapoport A. Oral Candidiasis as prognostic marker of HIV-infected patients. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 2002; 68(5):630-634.
27. Oliveira PM, Mascarenhas RE, Ferrer SR, Oliveira RPC, Travessa IEM, Gomes MVC, Grassi MFR. Vulvovaginites em mulheres infectadas pelo vírus da inmunodeficiencia humana. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 2008; 30(3):121-6.
28. Goldman-Bennett. Cecil Tratado de Medicina Interna. 21ed.V.2. São Paulo:Guanabara Koogan, 2001; p.2117-2118.

29. Gallo RC, Montagnier L. The Discovery of HIV as the cause of AIDS. *The New England Journal of Medicine* 2003; 349(24): 2283- 2285.
30. Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 1986; 233: 343-6.
31. Ribeiro LC. Fatores associados ao óbito por micoses sistêmicas em pacientes acompanhados nas unidades especializadas para assistência ao portador de hiv/aids de cuiabá, 2005-2008 [Dissertação de Mestrado]. Cuiabá (MT): Universidade Federal de Mato Grosso – Faculdade de Ciências Médicas; 2008.
32. Ministério da Saúde. DST/AIDS / Área Técnica / epidemiologia/ AIDS.
33. Sant’Ana PL, Milan EP, Martinez R, Queiros-Teles F, Ferreira MS, Alcântara AP, Crvalho MT, Colombo AL. Multicenter Brazilian Study of Oral *Candida* Species Isolated from Aids Patients. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* 2002; 97(2): 253-257.
34. Shelburne SA, Montes M, Hamill RJ. Immune reconstitution inflammatory syndrome: more answers, more questions. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006;58(5):167-170.
35. Zaremba ML. The essence of infection by opportunistic microorganisms. *Przeegląd epidemiologic.* 2001; 55(SUPL. 3):91-9.
36. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. *Criptococose*. In: *Tratado de Micologia Médica*. 9 ed. São Paulo: Sarvier; 2002. p.416-435.
37. Alexopoulos CI, Mims CW, Blackwell M. Phylum Basidiomycota other Basidiomycetes. in. – (Eds). *Introductory Mycology*. 4. ed. New York: John Wiley & Sons; 1996; p. 658-682.
38. Sidrim JJC, Moreira JLB. Sidrim JJC, Moreira JLB. *Micoses oportunistas*. In: *Fundamentos clínicos laboratoriais da micologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.171-191.
39. Franzot SP, Salkin LF, Casadeval A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* separate status for *C. neoformans* serotype A isolates. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37:838-840.
40. Moreira TA, Ferreira MS, Ribas RM, Borges AS. *Criptococose: estudo clínico-epidemiológico, laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2006; 39(3):255-258.
41. Wanke B, Lázera MS, Monteiro PCF, Londero AT. *Micologia Médica*. [Apostila Fiocruz] – Rio de Janeiro, 2006.
42. Emmons CW. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columbia livia*). *Am. J. Hyg.* 1955; 62:227-232.
43. Kwon-Chung KJ, Bennett J. Distribution of a mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. *Am. J. Epidemiol.* 1978; 4:337-339.
44. Baroni FA, Paula CR, Silva EG, Viani FC, Rivera ING, Maria Tereza Barreto de Oliveira MTB, Gambale W. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro city, RJ, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. P.* 2006; 48(2):71-75.

45. Lazéra MS, Wanke B, Nishikawa MM. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J. Med. Vet. Mycol.* 1993; 31:449-454.
46. Sorrell TC, Ellis DH. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Rev. Iberoam. Micol.* 1997; 14:42-43.
47. Mitchell TG, Perfect, JR. Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical Microbiology Reviews*, v.8, n.4, p. 515-48, 1995.
48. Know-chung KJ, Bennett JE. *Medical Mycology*. Philadelphia:Lea e Figiber, 1992. p. 866p.
49. Pedroso RS, Costa KRC, Ferreira JC, Candido RC. Evaluation of melanin production by *Cryptococcus* species in four different culture media. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2007; 40(5):566-568.
50. Denning DW, Stevens DA, Hamilton JR. Comparison of Guizotia abyssinica Seed Extract (Birdseed) Agar with Conventional Media for Selective Identification of *Cryptococcus neoformans* in Patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28(11):2565-2567.
51. Schechter M, Marangoni DV. Criptococose. In:Doenças Infecciosas, Conduta Diagnóstica e Terapêutica. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;1998.p. 476-479.
52. Barluzzi R, Brozetti A, Delfino D, Bistoni F, Blasi E. Role of the capsule in microglial cell—*Cryptococcus neoformans* interaction: impairment of antifungal activity but not of secretory functions. *Med. Mycol.* 1998; 36(4):189-197.
53. Lazera MS, Pires FDA, Nishikawa CCMM, Becerra CF, Trilles L. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. *J. Med. Vet. Mycol.*1996; 34(2):127-131.
54. Nishikawa MM, Lazéra MS, Barbosa GG, Trilles L, Balassiano BR, Macedo RCL, Bezerra CCF, et al. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolated from clinical and environmental sources in Brazil: Analysis of host and regional patterns. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(1):73-77.
55. Hogan LH, Klein BS, Levitz SM. Virulence Factors of Medically Important Fungi. *Clin Microbiol Reviews* 1996; 9(4):469–488.
56. Kurokawa CS, Sugizaki MF, Peraçoli MTS. Virulence Factors in Fungi of Systemic Mycoses. *Rev. Inst. Med. trop.* 1998; 40(3).
57. Polacheck VJ, Kwon-Chung KJ. Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. *J. Bacteriol.* 1982; 150: 1212-1220.
58. Pinto Junior VL, Galhardo MCG, Lazéra MS, Wanke B, Reis RS e Perez M. Criptococose associada à AIDS. A importância do cultivo da urina no seu diagnóstico. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2006: 39(2): 230-232.

59. Moreno-Sanches ME, Cortez-Franco F, Quijano-Gomero E, Serrano-Guillén G, Crayhua-Pérez D. Manifestaciones Cutáneas de Criptococosis Diseminada en um Paciente com VIH/SIDA. *Dermatol. Perú.* 2007; 17(3): 184-192.
60. Denning DW, Stevens DA, Hamilton JR. Comparison of Guizotia abyssinica Seed Extract (Birdseed) Agar with Conventional Media for Selective Identification of Cryptococcus neoformans in Patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28(11):2565-2567.
61. Hamilton JD, Holdom MD. Antioxidant systems in the pathogenic fungi of man and their role in virulence. *Med. Mycol.* 1999; 37:175-189.
62. Kwon-chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved diagnostic Medium for Separation of Cryptococcus neoformans var. neoformans (Serotypes A and D) and Cryptococcus neoformans var. gattii (Serotypes B and C). *J. Clin. Microbiol.* 1982; 15(3):535-537.
63. Hazen KC. New and Emerging Yeast Pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8(4):462-478.
64. Kurtzman CP, Fell JW. *The Yeast: A taxonomic Study.* 4ª ed. New York: Elsevier; 1998.
65. Segal E, Baum GL. *Pathogenic yeasts and Yeast infections.* Florida: CRC Press; 1994. p. 227.
66. Mendes-Giannini MJS, Melhem MSC. Infecções fúngicas. In: Ferreira AW, Ávila SLM. *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996. p.226, 246-50.
67. Sgarbi FC, Cavalcante ASR, Cabral LAG. Candidíase bucal: Aspectos de interesse ao cirurgião-dentista. *Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.* 2006; 60(4):324-327.
68. Sánchez-Vargas LO, Ortiz-López NG, Villar M, Moragues MD, Aguirre JM, Cashat-Cruz M, Lopez-Ribot JL, et al. Point prevalence, microbiology and antifungal susceptibility patterns of oral *Candida* isolates colonizing or infecting Mexican HIV/AIDS patients and healthy persons. *Rev. Iberoam. Micol.* 2005; 22: 83-92.
69. Odds FC. *Candida and Candidosis.* 2ª ed. London: Bailliere Tindall; 1988.
70. Rippon JW. Candidiasis and the pathogenic yeast. In: *Medical Mycology. The pathogenic fungi and pathogenic actinomycetes.* 3ª ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1988a. p. 532-81.
71. Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes K, Bennett DE, Coleman DC. *C. dubliniensis* sp. Nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidiasis in HIV-infected individuals. *Microbiol.* 1995; 14(1):1507-1521
72. Delgado, W. Aguirre, JM. Las micosis orales en la era del sida. *Rev. Iberoam. Micol.* 1997; 14:14-22.
73. Barchiesi F, Maracci M, Radi B, Arzeni D, Baldassarri I, Giacometti A, Scalise G. Point prevalence, microbiology and fluconazole susceptibility patterns of yeast isolates

- colonizing the oral cavities of HIV-infected patients in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Antimicrob. Chemother.* 2002; 50: 999-1002.
74. Milan EP, Sant'ana PL, Melo ASA, *et al.* Multicenter prospective surveillance of oral *Candida dubliniensis* among adult Brazilian human immunodeficiency virus-positive and AIDS patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2001; 41: 29-35.
  75. Rodero LM, Losso C, Canteros F, Hochenfellner C, Davel G. *Candida dubliniensis*: primer aislamiento en Argentina. *Rev. argent. Microbiol.* 1998;30: 39-41.
  76. Sano A, Vilela MMS, Takahashi I, *et al.* Isolation of *Candida dubliniensis* from the oral cavity of a positive child in Brazil. *Jap. J. med. Mycol.* 2000; 41: 177-181.
  77. Alves SH, Horta JÁ, Milán EP, Scheid LA, Vainstein MH, Santurio JM, Colombo AL. Carbohydrate assimilation profiles of Brazilian *Candida dubliniensis* isolates based on ID 32C Sistem. *Rev. Inst. Med. trop.* 2005; 47(2): 109-111.
  78. Moran GP, Sullivan DJ, Martin C, Henman MC, McCreary CE, Harrington BJ, Shanley DB, Coleman DC. Antifungal Drug Susceptibilities of Oral *Candida dubliniensis* Isolates from Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Infected and Non-HIV-Infected Subjects and Generation of Stable Fluconazole-Resistant Derivatives In Vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997, 41(3):617-623.
  79. Gee SF, Joly S, Soll DR, Meis JFGM, Verweij PE, Polacheck I, Sullivan DJ, Coleman DC. Identification of Four Distinct Genotypes of *Candida dubliniensis* and Detection of Microevolution In Vitro and In Vivo. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(2):556-574.
  80. Diaz-guerra TM, Martinez-suarez JV, Laguna F, Rodriguez-tudela JL. Comparison of Four Molecular Typing Methods for Evaluating Genetic Diversity among *Candida albicans* Isolates from Human Immunodeficiency Virus-Positive Patients with Oral Candidiasis. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35(4):856-861.
  81. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. *Diagnóstico Microbiológico*. 5 ed. São Paulo: Médica e Científica; 2001. p. 1053-4.
  82. Jabra-Rizk MA, Brenner TM, Romagnoli M, Baqui AAMA, Merz WG, Falkler jr WA, Meiller TF. Evaluation of a Reformulated CHROMagar *Candida*. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(5):2015-2016.
  83. Cooke VM, Miles RJ, Price RG, Midgley G, Khamri W, Richardson AC. New Chromogenic Agar Medium for the Identification of *Candida* spp. *Apl. Environmen. Microbiol.* 2002; 68(7):3622-3627.
  84. Pincus DH, Coleman DC, Pruitt WR, Padhye AA, Salkin IF, Geimer M, Bassel A, Sullivan DJ, Clarke M, Hearn V. Rapid Identification of *Candida dubliniensis* with Commercial Yeast Identification Systems. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37(11):3533-3539.
  85. Sukroongreung S, Kitiniyon K, Nilakul C, Antimavanich S. Pathogenicity of basidiospores of *filobasidiella neoformans* var. *neoformans*. *Med. Mycol.* 1998; 36:419-424.
  86. Hay RJ. Overview of the treatment of disseminated fungal infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 1991; 28:17-25.

87. Mesquita RA, Aguiar MCF, Tarquino SBC et al. Candidíase oral Ca infecção HIV. Rev. CROMG. 1998; 4(1):27-31.
88. Yang YL, Lo HJ, Hung CC, Li Y. Effect of prolonged HAART on oral colonization with *Candida* and candidiasis. BMC Infect. Dis. 2006; 6:8.1-4.
89. Rodríguez LEMC, Osornio JS. Infecciones oportunistas en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida:La história em México a 20 años Del inicio de La epidemia. Rev. Invest. Clin. 2004; 56(2):169-180.
90. Bravo IM, Correnti M, Escalona L, Perrone M, Brito A, Tovar V, et al. Prevalence of oral lesions in HIV patients related to CD4 cell count and viral load in Venezuelan population. Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal. 2006; 11:33-9.
91. Coogan MM, Greenspan J, Challacombe SJ. Oral lesions in infection with human immunodeficiency virus. Bull. World. Health. Organ. 2005;83:700-6.
92. Puerto JL, Garcia-Martos P, Márquez A, Garcia-Agudo L, Mira J. Candidiasis orofaríngea. Rev. Diag. Biol. 2001; 50(4).
93. Powderly WG, Mayer KH, Perfect JR. Diagnosis and treatment of oropharyngeal Candidiasis in Patients Infected with HIV: A Critical Reassessment. AIDS Res. Hum. Retrov. 1999; 15(16):1405-1412.
94. Olmos MA, Araya V, Concetti H, Ramallo J, Piskorz E, Pérez H, Cahn P, et al. Candidiasis esofágica: análisis clínico y Micológico. Acta. Gastroenterol. Latinoam. 2005; 35(4):211-218.
95. Lima KM, Delgado M, Rego RSM, Castro CMMB. *Candida albicans* e *tropicalis* isoladas de onicomicose em pacientes hiv-positivos:co-resistencia *in vitro* aos azólicos. 2008;Vol. 37 (1): 57-64.
96. Trabulsi LR. - Microbiologia. 2a ed. Rio de Janeiro, Atheneu. p.386. 1991.
97. Martinez, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. J. Bras. Pneumol. 2006; 32(5):449-460.
98. Neto MM, Figueiredo JFC. Terapêutica das micoses profundas em pacientes transplantados renais. J. Bras. Nefrol. 1996; 18(4): 369-374.
99. Filippin FB, Souza LC. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. Braz. J. Pharmaceut. Scienc. 2006; 42(2):167-194.
100. Martinez R, Castro G, Moya MJ, Quaglio AS, Figueiredo JFC, Machado AA, et al. Anfotericina B lipídica como terapia seqüencial da anfotericina B convencional: redução da toxicidade sem perda da eficácia. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1998; 31(1):127-7.
101. Moysés NM, Figueiredo JM. Terapêutica das micoses profundas em pacientes transplantados renais. J Bras Nefrol 1996;18:369-374.
102. Santos Jr ID, Souza IAM, Borges RG, Souza LBS, Santana WJ, Coutinho HD. Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. Scient. Med. 2005; 15(3):189-197.

103. Janknegt R, de Marie S, Bakker-Woudenberg IA, Crommelin DJA. Liposomal and lipid formulations of amphotericin B. *Clin. Pharmacokinet.* 1992; 23(4):279-291.
104. Diomedi AP. Nuevos antifúngicos: Las equinocandinas. *Rev. Chil. Infect.* 2004; 21(2): 89-101.
105. Mora-Duarte, J., R. Betts, C. Rotstein, A. L. Colombo, L. Thompson-Moya, J. Smietana, R. Lupinacci, C. Sable, N. Kartsonis, and J. Perfect. 2002. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *N. Engl. J. Med.* 347:2020–2029.
106. Villanueva, A., E. G. Arathoon, E. Gotuzzo, R. S. Berman, M. J. Di Nubile, and C. A. Sable. 2001. A randomized double-blind study of caspofungina versus amphotericin for the treatment of candidal esophagitis. *Clin. Infect. Dis.* 33:1529–1535.
107. Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudella JL. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in filamentous fungi. *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.* 2002; 20: 523-9.
108. Gupta AK, Kohli, Sauder DN, Shear NH. Antifungal agents: an overview. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1994a; 30(Pt 1): 677-98.
109. Pfaller MA, Diekema DJ, Rex JH, Espinel-Ingroff A, Johnson EM, Andes D, Chaturvedi V, ET al. Correlation of MIC with Outcome for *Candida* Species Tested against Voriconazole: Analysis and Proposal for Interpretive Breakpoints. *J. Clin. Microbiol.* 2006; p. 819–826.
110. Bergold AM, Georgiadis S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. *Visão acadêmica* 2004; 5(2):159-172.
111. Gutiérrez C, Bedout C, Tobón AM, Cano LE, Arango M, Tabares AM, Restrepo A. Sensibilidad a fluconazol y voriconazol de aislamientos de *Candida* spp., obtenidos de mucosa oral de pacientes con sida. *Infectio* 2007;11(4):183-189.
112. Salobreña AC, Cepeda LAG, Cañada FO, Barrionuevo DO, García LC, Quindós G. Resistência in vitro a los antifúngicos en *Candida albicans* de pacientes infectados por el VIH con y sin candidosis oral. *Ver. Iberoam. Micol.* 16:194-197, 1999.
113. Lyman CA, Walsh TJ. Systemically administered antifungal agents. A review of their clinical pharmacology and therapeutic applications. *Drugs.* 1992; 44: 9-35.
114. Darouiche RO. Oropharyngeal and esophageal candidiasis immunocompromised patients: treatment issues. *Clin. Infect. Dis.* 1998; 26:259-274.
115. Pfaller MA, Messer AS, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ. Caspofungin activity against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida*. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41:5729-5731.
116. Sobel JD, Faro S, Force RW, Foxman B, Ledger WJ, Nyirjesy PR, et al. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1998; 178: 203-11.
117. Val ICC, Almeida Filho GL. Abordagem Atual da Candidíase Vulvovaginal. *DST – J. Bras. Doenças Sex. Transm.* 2001; 13: 3-5

118. Sojakova M, Liptajova D, Borovsky M, Subik J. Fluconazole and itraconazole susceptibility of vaginal yeast isolates from Slovakia. *Mycopathol.* 2004; 157:163-169.
119. Tosti A, Hay R, Arenas-Guzman R. Patients at risk of onychomycosis risk factor identification and active prevention. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2005; 19(1): 13-16.
120. Saag MS, Graybill RJ, Larsen RA, *et al.* Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. Infectious Diseases Society of America. *Clin. infect. Dis.* 2000;30: 710-718.
121. Alves SH, Lopes JO, Costa JM, *et al.* Development of secondary resistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* isolated from a patient with AIDS. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 1997; 39:359-62.
122. Walsh TJ, Gonzalez CE, Piscitelli S, Bacher JD, Peter J, Torres R, *et al.* Correlation between in vitro and in vivo antifungal activities in experimental fluconazole-resistant oropharyngeal and esophageal candidiasis. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(6):2369-73.
123. Tavitian A, Raufman JP, Rosenthal LE, Weber J, Webber CA, Dincsoy HP. Ketoconazole-resistant *Candida* esophagitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Gastroenterol.* 1986; 90(2):443-445.
124. Pfaller MA, Diekema DJ, Sheehan DJ. Interpretive Breakpoints for Fluconazole and *Candida* Revisited: a Blueprint for the Future of Antifungal Susceptibility Testing. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; 19(2): 435-447.
125. Barchiesi F, Najvar LK, Luther MF, Scalise G, Rinaldi MG, Graybill JR. Variation in fluconazole efficacy for *Candida albicans* strains sequentially isolated from oral cavities of patients with AIDS in an experimental murine candidiasis model. *Antimicrob. Agent. Chemother.* 1996; 40(5):1317-1320.
126. Ruhnke M, Schimtd-Westhausand A, Engelmann E, Trautmann M. Comparative evaluation of three antifungal susceptibility test methods for *Candida albicans* isolates and correlation with response to fluconazol therapy. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34(12):3208-3211.
127. Odds FC. Resistance of clinically important yeasts to antifungal agents. *Internat. J. Antimicrob. Agent.* 1996; 6:145-147.
128. Sanglard D, Odds FC. Resistance of candida species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *The Lancet. Infect. Dis.* 2002;2(2):79-83.
129. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Gosey LL, Odds FC, Rinaldi MG, Sheehan DJ, Warnock DV. Antifungal Susceptibility Testing: Practical Aspects and Current Challenges. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001; 14(4):643-658.
130. Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Bartlett MS, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Lancaster M, *et al.* Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. *Clin. Infect. Dis.* 1997, 24:235-247.

- 131.Colombo AL, Matta D, Almeida LP, Rosas R. Fluconazole Susceptibility of Brazilian *Candida* Isolates Assessed by a Disk Diffusion Method. *Braz. J. Infect. Dis.* 2002; 6(3):118-123.
- 132.Cuenca-Estrela M, Rodriguez-Tudella JL. Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos em los estudios de sensibilidad. *Rev. Iberoam. Micol.* 2002; 19: 133-8.
- 133.Cuenca-Estrela M, Lee-Yang W, Ciblak MA, Arthington-Skaggs BA, Mellado E, Warnock DW, et al. Comparative Evaluation on NCCLS M27-A and EUCAST Broth Microdilution Procedures for Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46: 3644-7.
- 134.Pfaller MA. Antifungal susceptibility testing methods. *Curr Drugs Targets* 6:929-43, 2005.
- 135.Crocco, Ei, Mimica LMJ, Muramatu LH, Garcia C, Souza VM, Ruiz LRB, Zaitz C. Identificação de espécie de *Candida* e susceptibilidade antifúngica *in vitro*: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. *An bras Dermatol* 2004; 79(6):689-697.
- 136.Ambler JE, Kerawala M, Yaneza A, Drabu YJ. Evaluation of Chromagar *Candida* for rapid identification and Etest for antifungal susceptibility testing in a district general hospital laboratory. *J. Clin. Pathol.* 2001; 54:158-159.
- 137.Li J, Nong H, Nong D, Cheng L. Study on susceptibility test of pathogenic fungi from otorhinolaryngology by Etest method. *J. clin. Otorrhinolaringol.* 2001; 15: 77-79.
- 138.Matar M, Ostrosky-Zeichner L, Paetznick VL, et al. Correlation between Etest, disk diffusion, and microdilution methods for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47: 1647-1951.
- 139.Morace G, Amato G, Bistoni F, et al. Multicenter comparative evaluation of six commercial systems and the National Committee for clinical laboratory standards M27-A broth microdilution method for fluconazole susceptibility testing of *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40: 2953-2958.
- 140.Sanchez ML, Jones RN. E-test, an antimicrobial susceptibility testing method with broad clinical and epidemiology application. *Antimicrob. News.* 1992; 8: 1-7.
- 141.Quindós G, Alonso-Vargas R, Helou S, Arechavala A, Mazuelos EG, Negroni R. Evaluación de um nuevo medio de cultivo cromógeno (*Candida* ID) para el aislamiento e identificación presuntiva de *Candida albicans* y otras levaduras de interes médico. *Rev. Iberoam Micol.* 2001; 18: 23-8.
- 142.Carrillo Muñoz AJ, Quindós G, Cárdenes GD, Vargas RA, Arévalo P, Brió S, et al. Evaluación del medio Chromalbicans Agar para la identificación presuntiva de *Candida albicans*. *Rev. Iberoam. Micol.* 2001; 18: 501-8.
- 143.Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. Leveduroses profundas com especial referência às infecções por *Candida*. In *Micologia Médica*. São Paulo: Servier; 1991. p. 216-25.
- 144.Van Der Walt JP, Yarrow D. Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeast. In: Kreger-van NJW. editores. *The Yeast*. Amsterdam: Elsevier Publishers. B. V; 1984. p. 45-104.

145. Campbell MC, Stewart JL. Identification of individual fungal isolates. In: The Medical Mycology Handbook. New York: John Wiley & Sons; 1980. p. 210-348.
146. AB BIODISK. Etest Technical guide 4b: Antifungal susceptibility testing of yeasts. Piscataway, New Jersey: AB BIODISK, 1994.
147. Lizarazo J, Melva L; Bedout C, Restrepo Á, Agudelo CI, Castañeda E. Estudio clínico y epidemiológico de la criptococosis en Colombia: resultados de nueve años de la encuesta nacional, 1997-2005 / Results of nine years of the clinical and epidemiological survey on cryptococcosis in Colombia, 1997-2005. *Biomédica Bogotá* 2007; 27(1):94-109.
148. Micol R, Iorthoraly O, Laureillard D, Ngeth C, Dousset JP, Chanroeun H, Ferradini L, et al. Prevalence, determinants of positivity, and clinical utility of cryptococcal antigenemia in Cambodian HIV-infected patients. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2007; 45(5):555-559.
149. Silva MRR, Paula CR, Silva SC, Costa TR, Costa MR. Drug resistance of yeast isolated from oropharyngeal candidiasis in AIDS patients. *Rev. Microbiol.* 1998; 29(4):1-7.
150. López-Ribot, J. L., R. K. McAtee, W. R. Kirkpatrick, and T. F. Patterson. Comparison of DNA-based typing methods to assess genetic diversity and relatedness among *Candida albicans* clinical isolates. *Rev. Iberoam. Micol.* 2000; 17:49-54.
151. Goldman M, Cloud GA, Smedema M, Lemonte A, Connolly P, McKinsey D, Kauffman CA, et al. Does long-term itraconazole prophylaxis result *in vitro* azole resistance in mucosal *Candida albicans* isolates from persons with advanced human immunodeficiency virus infection? *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2000; 44:1585-1587.
152. Alves SH, Oliveira LT, Costa JM, Lubeck I, Casali AK, Vainstein MH. *In vitro* susceptibility to antifungal agents of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in southern of Brazil. *Rev. Inst. Trop. S. Paulo.* 2001; 43(5):267-270.
153. Maxwell MJ, Messer SA, Holli RJ, Diekma DJ, Pfaller MA. Evaluation of Etest method for Determining Voriconazole and Amphotericin B MICs for 162 Clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(1):97-99.
154. Chandanier J, Adou-Bryn KD, Douchet C, Kombila BSM, Swinme D, Thérizol-Ferly, Buisson Y, et al. *In vitro* activity of amphotericin B, fluconazole and voriconazole against 162 *Cryptococcus neoformans* isolates from Africa and Cambodia. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* 2004; 23:506-508.
155. Trilles L, Fernandez-Torres B, Lázera MS, Wanke B, Guarro J. *In vitro* antifungal susceptibility of *Cryptococcus gattii*. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(10):4815-4817.
156. Larsen RA, Bauer M, Brouwer AE, Sanches A, Thomas AM, Rajanuwong A, Chierakul W. *In vitro*-Clinical correlations for Amphotericin B susceptibility in AIDS-Associated Cryptococcal meningitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51(1):343-345.

## **8. ANEXOS**

## ANEXO 1.

**Tabela 5** – Perfil bioquímico (assimilação e fermentação) das espécies de leveduras do gênero *Candida* segundo Kwon-Chung & Bennett, 1992; Kurtzman & Fell, 1998.

Espécies	Assimilação										Fermentação								
	GLI	MAL	SAC	GAL	LAC	RAF	TRE	XIL	MEL		GLI	MAL	SAC	GAL	LAC	RAF	TRE	XIL	MEL
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	-		+	+	-	+(v)	-	-	+	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	-		+	-(v)	-(v)	+/- (v)	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+(v)	+	-	-	+	+	-		+	+	+(v)	+(v)	-	-	+/-	+/-	-
<i>C. krusei</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. glabrata</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-		+	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>C. dubliniensis</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	-		+	+	-	+(v)	-	-	+	-	-
<i>C. guilliermondi</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+		+	-	+(v)	-	-(v)	-(v)	+	-	-(v)

GLI: Glicose, MAL: Maltose, SAC: Sacarose, GAL: Galactose, LAC: Lactose, RAF: Rafnose, TRE: Trealose, XIL: Xilose, MEL: Melibiose

## ANEXO 2

**Protocolo nº 247/2006 Comitê de ética em pesquisa do HUJM**

Ministério da Educação  
**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO**  
 HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JÚLIO MÜLLER

**Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Júlio Müller**  
 Registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa em 25/08/97

**TERMO DE APROVAÇÃO ÉTICA  
 DE PROJETO DE PÊSQUISA**

**REFERÊNCIA: Projeto de protocolo Nº 247/CEP-HUJM/06**

**"COM PENDÊNCIAS"**

**APROVADO "ad referendum"**

**APROVAÇÃO FINAL**

**NÃO APROVADO**

O projeto de pesquisa intitulado: "Estudo do Perfil de Susceptibilidade a medicamentos com ação antifúngica em pacientes portadores do HIV que demandam os serviços de saúde de Cuiabá, MT", encaminhado pelo(a) pesquisador(a), Rosane Christine Hahn, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUJM, em reunião realizada em 16 de fevereiro de 2006 que concluiu pela aprovação final, tendo em vista que atende a Resolução CNS 196/96 do Ministério da Saúde para pesquisa envolvendo seres humanos.

Cuiabá, 16 de fevereiro de 2006.

*Maria Aparecida Munhoz Gaíva*  
**Profa. Dra. Maria Aparecida Munhoz Gaíva**  
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HUJM

Hospital Universitário Júlio Müller  
 Rua L, SN. Jardim Alvorada. CEP 78048-790 Cuiabá -MT, Brasil  
 Fone: 65-615-7302. e-mail: [cephujm@cpd.ufmt.br](mailto:cephujm@cpd.ufmt.br)  
[http://www.ufmt.br/cep\\_hujm](http://www.ufmt.br/cep_hujm)

## **9. APÊNDICE**

## APÊNDICE 1

**Termo de consentimento Livre e Esclarecido****Termo de consentimento Livre e Esclarecido**

**Estudo do perfil de susceptibilidade a medicamentos com ação antifúngica em pacientes portadores do HIV que demandam os serviços de saúde de Cuiabá, Mato Grosso**

Os responsáveis por esta pesquisa esclareceram-me que a mesma tem a finalidade de melhorar o conhecimento sobre a eficácia do tratamento da micose que pode estar me acometendo. Isto porque é sabido que o micróbio que causa essa micose pode ser resistente ou sensível ao remédio que eles irão utilizar, caso eu esteja mesmo com a micose.

Além dos exames médicos que venho recebendo do meu médico, estou ciente de que a equipe de pesquisa irá me examinar também, fazer perguntas sobre a minha vida e a minha doença e, posteriormente, irá colher material para exame, que pode ser sangue, escarro, urina, fragmento de pele, cabelo, unha, para futuros exames, que poderão ser realizados aqui mesmo em Cuiabá, ou em Goiânia. A equipe deixou claro que os procedimentos de coleta de material para exame serão realizados por médico ou bioquímico devidamente treinados e que não oferecem risco. Além disso, os pesquisadores comprometem-se em entregar o resultado do exame ao meu médico, tão logo esteja pronto.

Foi também esclarecido que todas as informações obtidas nesta pesquisa serão utilizadas exclusivamente para atender aos objetivos da mesma. As informações serão confidenciais, ficando sob o poder da equipe responsável pela pesquisa, a qual garantirá o sigilo do meu nome.

Foi também informado que qualquer informação adicional que eu queira saber sobre o estudo pode ser solicitada por mim a qualquer momento. E que a minha participação é voluntária. Isto quer dizer que tenho todo o direito de não participar da pesquisa, e que isto não acarretará em qualquer tipo de penalidade, e que terei garantido o meu tratamento, conforme a rotina do serviço.

Eu, \_\_\_\_\_, entendi o que me foi explicado sobre o estudo e concordo em participar do mesmo.

\_\_\_\_\_  
(paciente)

Assinaturas: do participante (ou responsável, caso seja menor de idade; ou sua impressão digital, caso não saiba assinar o nome)

\_\_\_\_\_  
(pesquisador)

## APÊNDICE 2

**FICHA EPIDEMIOLÓGICA PROJETO DST/AIDS**

Nome: \_\_\_\_\_

<b><u>Número</u></b>
<b><u>Prontuário</u></b>

Data Coleta: \_\_\_\_\_ Sexo: F ( ) M ( ) Idade: \_\_\_\_\_

Clínica: \_\_\_\_\_ Serviço de Saúde \_\_\_\_\_

Taxa linfócito TCD<sub>4</sub>: \_\_\_\_\_ Carga Viral: \_\_\_\_\_

Fase da Doença: HIV ( ) AIDS ( )

Uso de Terapia HAART: SIM ( ) NÃO ( ) Quanto Tempo: \_\_\_\_\_

Infecção Fúngica prévia: SIM ( ) NÃO ( )

Qual: \_\_\_\_\_

Uso prévio de Antifúngico: SIM ( ) NÃO ( )

Qual: \_\_\_\_\_ Posologia: \_\_\_\_\_

Infecção Fúngica Recente (Data Coleta / Diagnóstico Infecção Fúngica): \_\_\_\_\_

1. Candidíase ( ) Local: \_\_\_\_\_

2. Criptococose ( ) Local: \_\_\_\_\_

3. Paracoccidioidomicose ( ) Local: \_\_\_\_\_

4. Outra infecção Fúngica ( ) Qual: \_\_\_\_\_

Tratamento: SIM ( ) NÃO ( )

Esquema Terapêutico

Qual Antifúngico: \_\_\_\_\_

Posologia: \_\_\_\_\_

Tempo de Tratamento: \_\_\_\_\_

Evolução: ALTA ( ) ÓBITO ( ) Outros ( )

## APÊNDICE 3

**Valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM), expressos em µg/mL para os isolados de leveduras do gênero Candida dos pacientes HIV positivos**

NºLab	CETO	FLUCO	ITRA	VORICO	ANFO B
410/03	12	256	32	32	1
375	0,064	2	0,016	0,032	0,5
451	12	256	0,19	0,23	0,5
681	0,75	8	4	0,19	0,5
758	0,032	2	0,016	0,023	0,38
5	0,75	256	1,5	32	0,125
6	0,023	3	0,012	0,023	0,25
46	4	256	32	32	0,25
8	0,75	6	0,016	0,094	0,38
9	0,75	256	32	0,094	32
11	0,064	3	0,023	0,023	0,016
12	0,064	6	0,023	0,032	0,38
15	0,032	3	0,016	0,032	0,25
17	0,5	1	0,5	0,047	0,25
18	0,047	1,5	0,016	0,032	0,38
19	0,75	8	0,125	32	0,25
20	0,19	6	0,064	0,125	0,38
02/07	32	256	32	32	0,38
51/07	0,023	1,5	0,023	0,032	0,38
52/07	32	256	32	32	0,19
57/07	0,023	1	0,012	0,023	0,5
60/07	0,023	1,5	0,016	0,032	0,5
65/07	32	256	32	32	0,38
83/08	0,19	3	0,032	0,094	0,5
92/08	32	256	32	32	1
97/08	0,094	4	0,023	0,064	0,25
106/08	0,19	4	0,016	0,064	0,25
112/08V	0,094	0,023	0,016	0,032	0,38
112/08A	0,25	1,5	0,012	0,094	0,012
118/08	2	32	1,5	0,5	0,5
121/08	32	256	32	32	0,75
124/08	0,19	1	0,032	0,064	0,125
133/08	32	256	32	32	0,047
706	0,25	4	0,094	0,023	0,19
33/1	1	1,5	0,25	0,064	0,38
221/02	0,19	1,5	0,064	0,032	0,125
137/08	32	256	32	32	0,5
138/08	0,19	6	0,125	0,047	0,19
150/08	0,064	1,5	0,032	0,023	0,19

**Valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM), expressos em µg/mL para os isolados de leveduras do gênero Candida dos pacientes HIV positivos**

<b>NºLab</b>	<b>CETO</b>	<b>FLUCO</b>	<b>ITRA</b>	<b>VORICO</b>	<b>ANFO B</b>
157/08	0,032	1	0,012	0,012	0,19
158/08	0,75	2	0,75	0,032	0,125
26	0,012	1	0,012	F	1
125/08	0,002	1,5	0,012	0,016	0,094
163/08	0,125	0,75	0,047	0,047	0,38
1	0,064	3	0,032	0,047	0,75
2	0,125	16	0,064	0,125	0,38
3	0,19	6	2	0,19	0,75
4	2	256	8	32	0,38
13	32	256	32	32	0,125
14	0,38	12	2	0,25	0,25
04/o8	32	256	32	32	0,19
05/o8	0,19	256	0,047	0,016	0,5
06/o8	32	256	32	32	0,5
01/o9	0,008	1,5	0,003	0,016	0,5
107/08	0,5	12	0,064	0,19	0,25
108/08	0,064	6	0,016	0,064	0,5
122/08	1	128	4	2	0,38
7	0,047	3	0,016	0,032	0,38
10	0,125	4	0,032	0,64	0,38
16	0,032	1,5	0,016	0,023	0,25
02/o6	32	256	32	32	0,38
03/o6	2	256	32	32	0,5
04/o6	0,19	4	0,047	0,19	0,5
01/o7	32	256	32	32	0,38
56/07	0,016	0,19	0,012	0,012	0,75
62/07	0,075	12	3	0,19	0,75
63/07	0,5	8	0,032	0,064	0,38
64/07	0,125	3	0,023	0,032	0,5
73/08	0,047	4	0,016	0,047	0,5
85/05	0,125	4	0,023	0,047	0,38
87/08	0,064	2	0,032	0,032	0,19
89/08	0,094	3	0,016	0,023	0,5
90/08	0,047	3	0,023	0,016	0,5
91/08	0,125	3	0,016	0,047	0,75
95/08	32	256	32	32	0,5
96/08	0,125	2	0,75	0,023	0,25
128/08	0,38	6	0,032	0,38	0,19
129/08	32	256	0,016	0,023	0,006

**Valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM), expressos em µg/mL para os isolados de leveduras do gênero Candida dos pacientes HIV positivos**

<b>NºLab</b>	<b>CETO</b>	<b>FLUCO</b>	<b>ITRA</b>	<b>VORICO</b>	<b>ANFO B</b>
130/08 V	32	256	32	32	0,5
130/08 V	0,25	6	0,023	0,125	0,125
131/08	32	3	0,19	32	0,75
L05					
134/08	0,38	4	1,5	0,19	3
66/07	0,125	4	0,016	0,064	0,38
67/07	0,125	3	0,032	0,125	0,38
80/08	0,023	1	0,004	0,012	0,5
81/08	32	256	32	32	0,25
82/08	1,5	24	2	0,19	0,38
84/04	0,094	3	0,016	0,032	0,25
99/08	0,25	8	0,064	0,064	0,25
100/08	3	64	2	0,5	2
101/08	0,75	12	1	0,19	0,19
102/08	4	256	32	0,75	3
103/08	0,19	8	0,023	0,064	0,5
111/08	6	256	3	0,5	4
136/08	32	256	32	0,38	0,25
145/08 V	1,5	2	0,094	0,047	0,38
145/08 V	3	1,5	0,064	0,047	0,19
159/08	0,125	3	0,008	0,023	0,064
59/07	0,047	0,38	0,016	0,016	0,38
93/08	0,064	3	0,023	0,047	0,5
1107	0,125	1	0,032	0,047	0,38
1108	32	256	32	32	0,5
1056	3	64	0,5	0,38	1
1116	32	256	32	32	0,25

## APÊNDICE 4

**Valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM), expressos em µg/mL para os isolados de leveduras do gênero Cryptococcus dos pacientes HIV positivos**

NLAB	CETO	FLUCO	ITRA	VORICO	ANFO B
551	0,5	8	0,047	0,023	0,38
711	0,5	6	0,064	0,023	0,38
29	0,75	12	0,032	0,047	0,38
211	0,25	2	0,012	0,023	0,75
250	0,19	4	0,008	0,012	0,5
573	0,5	12	0,094	0,047	0,38
636	3	256	3	0,5	0,064
635	0,38	64	0,38	0,047	0,38
664	0,5	12	0,19	0,064	0,38
705	0,5	16	0,38	0,064	0,25
48 HC	0,38	8	0,19	0,032	0,38
496 HC	0,5	16	0,25	0,064	0,75
612 HC	0,38	4	0,094	0,023	0,38
651	1,5	16	1	0,064	1
738	1,5	256	1,5	0,25	0,5
795	0,5	4	0,064	0,032	0,5
04/o1/o7	0,25	16	0,25	0,064	0,5
153/08	0,25	2	0,032	0,023	1
70/07	0,5	12	0,125	0,032	0,094
2997HC/08	0,25	2	0,094	0,016	0,5
162/08	0,25	4	0,032	0,032	0,5
1088	0,75	32	0,094	0,064	0,5
3246HC	0,75	8	0,125	0,032	0,5
1195	0,064	1	0,032	0,012	0,50
666/06	0,5	6	0,064	0,064	0,5
868HC	0,25	2	0,064	0,023	1

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)