

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
INSTITUTO BIOMÉDICO  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* (MESTRADO) EM MICROBIOLOGIA E  
PARASITOLOGIA APLICADAS (PPGMPA)

LEONARDO SILVA BARBEDO

CONFIRMAÇÃO DIAGNÓSTICA E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES CAUSAIS EM  
CANDIDÍASE CUTÂNEA

Niterói  
2010

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

LEONARDO SILVA BARBEDO

CONFIRMAÇÃO DIAGNÓSTICA E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES CAUSAIS EM  
CANDIDÍASE CUTÂNEA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação (*Stricto Sensu* - Mestrado) em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas (PPGMPA) da Universidade Federal Fluminense (UFF), como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Micologia Médica.

Orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> DIANA BRIDON DA GRAÇA SGARBI

Niterói  
2010

Barbedo, Leonardo Silva.

Confirmação diagnóstica e identificação das espécies causais em candidíase cutânea / Leonardo Silva Barbedo.

- Niterói: [s.n.], 2010.

145 folhas, 36 figuras, 18 quadros, A4 21 x 29,7 cm.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas)

- Universidade Federal Fluminense, 2010.

1. Candidíase cutânea. 2. Diagnóstico laboratorial. 3. *Candida parapsilosis*.  
4. *Candida* spp. I. Título.

LEONARDO SILVA BARBEDO

CONFIRMAÇÃO DIAGNÓSTICA E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES CAUSAIS EM  
CANDIDÍASE CUTÂNEA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação (*Stricto Sensu* - Mestrado) em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas (PPGMPA) da Universidade Federal Fluminense (UFF), como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Micologia Médica.

Aprovada em 05 de abril de 2010.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. JEFERSON CARVALHAES DE OLIVEIRA - UFF

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> ANDRÉA REGINA DE SOUZA BAPTISTA - UFF

---

Prof. Dr. PAULO MURILLO NEUFELD - UFRJ

Niterói  
2010

Dedico este trabalho a minha mãe, que esteve, está e sempre estará ao meu lado; pois tudo o que sou devo a ela.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Fluminense (UFF),  
A minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Diana Bridon da Graça Sgarbi,  
A Prof.<sup>a</sup> Ms. Vera Lúcia da Silva Ribeiro,  
Ao Prof. Dr. Jeferson Carvalhaes de Oliveira,  
Ao Prof. Esp. Luís Ricardo de Souza Braga,  
A Prof.<sup>a</sup> Ms. Alba Regina de Magalhães,  
A Prof.<sup>a</sup> Ms. Kátia Maria Pereira Nunes Simões,  
Ao Prof. Dr. Otílio Machado Pereira Bastos,  
A Téc. Simone Cristina Pereira Brito,  
A Téc. Maria de Fátima dos Santos Pacheco,  
A Téc. Lúcia Regina Vieira Ferreira,  
A todos os Professores da UFF com quem convivi durante o curso de Mestrado,  
A Vinícius Biasoli (Control Lab),  
A Dr.<sup>a</sup> Fabíola Cristina de Oliveira Kegele (IFF / FIOCRUZ),  
A Jânio Alves Cordeiro (IFF / FIOCRUZ).

*Another day has gone. I'm still all alone.  
How could this be? You're not here with me.  
You never said good-bye. Someone tell me, why?  
Did you have to go? And leave my world so cold?*

*Everyday I sit and ask myself.  
How did love slip away?  
Something whispers in my ear and says:*

*That you are not alone. I am here with you.  
Though you're far away. I am here to stay.  
You are not alone. I am here with you.  
Though we're far apart. You're always in my heart.  
You are not alone...*

*Alone, alone.  
Why? Alone!*

*Just the other night. I thought I heard you cry.  
Asking me to come. And hold you in my arms.  
I can hear your prayers. Your burdens I will bear.  
But first I need your hand. Then forever can begin.*

*Everyday I sit and ask myself.  
How did love slip away?  
Something whispers in my ear and says:*

*But you are not alone. I am here with you.  
Though you're far away. I am here to stay.  
You are not alone. I am here with you.  
Though we're far apart. You're always in my heart.  
You are not alone...*

*Oh...whisper three words and I'll come running.  
Fly...and girl you know that I'll be there.  
I'll be there...*

*But you are not alone. I am here with you.  
Though you're far away. I am here to stay.  
You are not alone. I am here with you.  
Though we're far apart. You're always in my heart.  
You are not alone...*

*You Are Not Alone  
(R. Kelly)  
Michael Jackson*

## RESUMO

A candidíase é uma micose oportunista primária ou secundária, endógena ou exógena, causada por leveduras do gênero *Candida*. As lesões podem variar de superficiais a profundas, se comportando como doença aguda ou crônica; envolvendo localizações únicas ou em múltiplos sítios. Espécies desse gênero residem como comensais fazendo parte da microbiota normal do trato digestório de 80% dos indivíduos saudáveis. O estabelecimento da candidíase depende de uma imunodepressão específica ou geral, inata ou adquirida do hospedeiro; carga parasitária e virulência fúngica. Das quase 200 espécies, aproximadamente 10% são consideradas agentes etiológicos de candidíase, sendo de maior interesse clínico *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae*, porém casos de espécies emergentes como *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis*, *C. inconspicua*, *C. viswanathii*, dentre outras, estão sendo relatadas devido à alta frequência que colonizam o hospedeiro humano. O diagnóstico laboratorial clássico da candidíase baseia-se essencialmente na presença de blastoconídios no exame direto e observação da cultura leveduriforme de coloração creme e aspecto pastoso em ágar Sabouraud. Quanto às manifestações clínicas, podemos dividi-las em cutâneo-mucosas, sistêmicas e alérgicas. As lesões determinadas pelo fungo são úmidas e recobertas por uma pseudomembrana esbranquiçada que, ao ser removida, apresenta fundo eritematoso, quando em mucosas; e lesões satélites eritematosas de aspecto descamativo, quando cutâneas. A retirada dos fatores predisponentes e o restabelecimento da imunidade, combinada com derivados azólicos ou poliênicos, são as principais formas de tratamentos da candidíase. Nosso objetivo foi a identificação das espécies de *Candida* a partir de casos clínicos em humanos suspeitos de candidíase cutânea. Após a coleta do material clínico procedeu-se o exame direto; cultura em ágar Sabouraud e ágar Mycosel; cultura em BHI acrescido de cloranfenicol; plaqueamento em ágar Sabouraud; estoque em água destilada estéril; cultura em Chromagar *Candida*; prova do tubo germinativo; cultura em ágar Sabouraud hipertônico; cultura em ágar Sabouraud entre 42-45°C e bioquímica no sistema VITEK<sup>®</sup> 2 Compact. Entre novembro de 2008 e agosto de 2009, no setor de Diagnóstico Micológico Humano e Veterinário MIP/UFF, foram coletadas 65 amostras oriundas de 56 pacientes com suspeita de candidíase cutânea, onde confirmadas 58 amostras em 51 pacientes, sendo 38 mulheres e 13 homens, com faixa etária predominante entre 47 e 60 anos e maioria donas de casa, aposentados, professoras e serventes, estes apresentaram 45 infecções simples e 6 infecções mistas distribuídas em 58 espécimes da levedura: 11 *C. parapsilosis*; 11 *Candida* spp.; 9 *C. famata*; 6 *C. albicans*; 6 *C. haemulonii*; 5 *S. ciferrii*; 4 *C. lipolytica*; 3 *C. guilliermondii* e 3 *C. tropicalis*. Os dados do presente estudo corroboram a importância de esforços direcionados ao diagnóstico micológico ao nível de espécie.

Palavras-chave: Candidíase cutânea. Diagnóstico laboratorial. *Candida parapsilosis*. *Candida* spp.

## ABSTRACT

Candidiasis is a secondary or primary opportunistic mycosis, endogenous or exogenous, caused by yeasts of the genus *Candida*. It can vary from superficial to deep lesions, behaving as an acute or a chronic disease; involving single or multiple sites. Species of this genus reside as commensals taking part of the normal microbiota of the gastrointestinal tract in 80% of healthy individuals. The establishment of candidiasis depends on a specific or a general host immunosuppression, innate or acquired; parasitic load and fungal virulence. Out of the nearly 200 *Candida* species, approximately 10% are considered etiological agents of candidiasis, and the highest clinically relevant are *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* and *C. lusitaniae*, but cases of emerging species such as *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis*, *C. inconspicua*, *C. viswanathii*, among others, are being reported due to their high frequency of isolation as human colonizer. The classical laboratory diagnosis of candidiasis is mainly based on the presence of blastoconidia on direct examination and the observation of a cream color yeast culture with doughy aspect on Sabouraud agar. The clinical manifestations can be divided in mucocutaneous, systemic and allergic. The lesions determined by fungus are moist and covered with a whitish pseudomembrane which, when removed, show an erythematous background, while mucous and erythematous satellite lesions, with scaly aspect, are seen in the cutaneous forms. Removal of the predisposing factors and the restoration of immunity, combined with azole or polyene drugs, are the main treatments for candidiasis. Our objective was the identification of *Candida* species from human clinical subjects affected by cutaneous candidiasis. After the collection of clinical material, diagnosis was performed by direct examination; culture on Sabouraud and Mycosel agar; culture in BHI plus chloramphenicol; Sabouraud agar on Petri plate; stock in sterile distilled water; culture on CHROMagar *Candida*; germ tube test; culture on hypertonic Sabouraud agar; culture on Sabouraud agar between 42-45°C and VITEK<sup>®</sup> 2 *Compact*. Between november 2008 and august 2009, at the Human and Veterinary Mycological Diagnostic sector MIP/UFF, we were able to collected 65 samples from 56 patients with suspected cutaneous candidiasis, and to confirm 58 positive samples for *Candida* spp. in 51 patients. Thirty-eight were women, predominantly aged between 47 e 60 years and mostly housewives, pensioners, teachers and servants. Forty-five simple infections and 6 mixed infections were detected, distributed in 58 yeasts specimens: 11 *C. parapsilosis*; 11 *Candida* spp; 9 *C. famata*; 6 *C. albicans*; 6 *C. haemulonii*; 5 *S. ciferrii*; 4 *C. lipolytica*; 3 *C. guilliermondii* and 3 *C. tropicalis*. Data from this study confirm the importance of efforts directed towards mycological diagnosis to species level.

Keywords: Cutaneous candidiasis. Laboratory diagnosis. *Candida parapsilosis*. *Candida* spp.

## LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1 Morfologia de células leveduriformes, hifas e pseudohifas de *C. albicans*, f. 18
- Fig. 2 Representação esquemática do ciclo celular de levedura, pseudohifa e hifa de *C. albicans*, f. 20
- Fig. 3 Quatro caminhos possíveis onde *C. albicans* progride do comensalismo para Infecção, f. 23
- Fig. 4 Esquema ilustrando a contribuição de diversos fatores de virulência atribuída à patogenia de *C. albicans*, f. 25
- Fig. 5 Candidíase oral, f. 38
- Fig. 6 Candidíase vulvovaginal e balanite causadas por *C. albicans*, f. 41
- Fig. 7 Candidíase cutânea, f. 43
- Fig. 8 Intertrigo, f. 44
- Fig. 9 Candidíase mucocutânea crônica, f. 45
- Fig. 10 Candidíase generalizada por *C. albicans* em recém-nascidos decorrente de condição congênita, f. 47
- Fig. 11 Onicomicose e paroníquia, f. 48
- Fig. 12 Microscopia eletrônica de varredura de biofilme de *C. albicans* em 48 horas, f. 56
- Fig. 13 Endocardite, f. 58
- Fig. 14 Endoftalmite, f. 59
- Fig. 15 Microscopia eletrônica de transmissão da adesão e invasão de *C. albicans* às células endoteliais microvasculares de cérebro humano em modelo “in vitro”, f. 60
- Fig. 16 Esquema geral de metodologia, f. 71
- Fig. 17 Exame direto, f. 76

- Fig. 18 Cultura inicial em ágar Sabouraud por 15 dias a temperatura ambiente, f. 77
- Fig. 19 Acondicionamento, reverso e tubos pós plaqueamento em SDA, f. 79
- Fig. 20 Macromorfologia das espécies de referência em SDA por 4 dias a temperatura ambiente, f. 80
- Fig. 21 Macromorfologia de algumas amostras coletadas em SDA por 4 dias a temperatura ambiente, f. 81
- Fig. 22 Plaqueamento de seis amostras sugestivas de infecções mistas em SDA por 4 dias a temperatura ambiente, f. 82
- Fig. 23 Plaqueamento em SDA por 4 dias a temperatura ambiente de amostras com *Trichosporon* e bactérias, f. 83
- Fig. 24 Estoque em água destilada estéril em tubos de vidro 100 X 15 mm, f. 84
- Fig. 25 CHROMagar *Candida* por 2 dias a 37°C para espécies de referência, f. 86
- Fig. 26 CHROMagar *Candida* por 2 dias a 37°C de algumas amostras coletadas, f. 87
- Fig. 27 Prova do tubo germinativo em 0,5mL de soro de equino a 37°C por 2 horas, referência *C. albicans* sor. B, f. 89
- Fig. 28 Prova do tubo germinativo em 0,5mL de soro de equino a 37°C por 2 horas, amostra 57/09 uqd d/e, f. 90
- Fig. 29 Culturas em ágar Sabouraud hipertônico (NaCl a 6,5%) por 5 dias a 37°C, f. 92
- Fig. 30 Culturas em ágar Sabouraud por 7 dias entre 42-45°C, f. 92
- Fig. 31 Amostra 52/09 uqd identificada como *Cryptococcus laurentii* pelo VITEK<sup>®</sup> 2 Compact, f. 98
- Fig. 32 Amostra 78/09 cut nad identificada como *Cryptococcus laurentii* pelo VITEK<sup>®</sup> 2 Compact, f. 98
- Fig. 33 Amostra 190/09 pdint identificada como *Trichosporon mucoides* pelo VITEK<sup>®</sup> 2 Compact, f. 99
- Fig. 34 Amostra 247/09 updh d II identificada como *Trichosporon asahii* pelo VITEK<sup>®</sup> 2 Compact, f. 99
- Fig. 35 Amostra 111/09 uqd de não identificada pelo VITEK<sup>®</sup> 2 Compact, f. 100
- Fig. 36 Amostra 118/09 uqd pool não identificada pelo VITEK<sup>®</sup> 2 Compact, f. 100

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 Distribuição etária dos pacientes, f. 72
- Quadro 2 Distribuição ocupacional dos pacientes, f. 73
- Quadro 3 Distribuição dos sítios de infecção dos pacientes, f. 73
- Quadro 4 Dados de gênero, idade e sítios de infecção dos pacientes, f. 73
- Quadro 5 Dados de gênero, idade, profissão/ocupação e sítio de infecção de todos os pacientes, f. 74 e 75
- Quadro 6 Resultados das amostras e referências no ágar Mycosel, f. 78
- Quadro 7 Coloração das amostras no CHROMagar *Candida*, f. 84
- Quadro 8 Resultados das amostras e referências no CHROMagar *Candida*, f. 85
- Quadro 9 Resultados das amostras e referências para a prova do tubo germinativo, f. 88
- Quadro 10 Resultados das amostras e referências para o ágar Sabouraud hipertônico e o ágar Sabouraud entre 42-45°C, f. 91
- Quadro 11 Distribuição das espécies de acordo com o VITEK<sup>®</sup> 2 *Compact*, f. 93
- Quadro 12 Distribuição das espécies por nível de confiança para o VITEK<sup>®</sup> 2 *Compact*, f. 93
- Quadro 13 Resultados das amostras e referências para o VITEK<sup>®</sup> 2 *Compact*, f. 94 e 95
- Quadro 14 Resultados do VITEK<sup>®</sup> 2 *Compact* e ágar Mycosel, f. 96
- Quadro 15 Resultados do VITEK<sup>®</sup> 2 *Compact* e CHROMagar *Candida*, f. 96
- Quadro 16 Resultados de fraca discriminação do VITEK<sup>®</sup> 2 *Compact* e CHROMagar *Candida*, f. 97
- Quadro 17 Amostras e técnicas realizadas após exame direto e cultura inicial, f. 101, 102 e 103
- Quadro 18 Referências e técnicas realizadas, f. 104

## LISTA DE SIGLAS

AIDS	"acquired immunodeficiency syndrome" (síndrome da imunodeficiência adquirida)
TCD4 <sup>+</sup>	célula T com conjunto de diferenciação quatro expressando o gene de interesse
MTL	"mating type-like locus"
ALS	"agglutinin-like sequence"
HIV	"human immunodeficiency virus" (vírus da imunodeficiência humana)
DNA	"deoxyribonucleic acid" (ácido desoxirribonucleico)
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
pH	potencial hidrogeniônico
DIU	dispositivo intra-uterino
Th1	subgrupo de células T CD4 <sup>+</sup> que sintetizam as citocinas IL-2, IFN- $\gamma$ e TNF- $\beta$
Th2	subgrupo de células T CD4 <sup>+</sup> que sintetizam as citocinas IL-4, 5, 10 e 13
IFN- $\gamma$	interferon gama
IL	interleucina
UFC/mL	unidade formadora de colônia por mililitro
NaCl	cloreto de sódio
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
KOH	hidróxido de potássio
SDA	"Sabouraud Dextrose Agar" (ágar Sabouraud-dextrose a 4%)
MYA	"Mycosel Agar" (ágar Mycosel)
BHI	"brain heart infusion" (infusão cérebro coração)
VITEK <sup>®</sup>	sistema de bioquímica automatizado de identificação de microrganismos
YST	"yeast"
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

ATCC	“American Type Culture Collection”
IAL	Instituto Adolfo Lutz
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CMM/HUAP	Faculdade de Medicina / Hospital Universitário Antônio Pedro
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
UV	ultravioleta
ID-YST	“yeast identification”

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Candidíase.....	16
1.2 Morfologia e ciclo celular (modelo <i>C. albicans</i> ).....	17
1.3 De comensal a patógeno.....	21
1.4 Espécies do gênero <i>Candida</i> .....	24
1.4.1 <i>C. albicans</i> .....	26
1.4.2 <i>C. ciferrii</i> .....	26
1.4.3 <i>C. dubliniensis</i> .....	27
1.4.4 <i>C. famata</i> .....	27
1.4.5 <i>C. glabrata</i> .....	28
1.4.6 <i>C. guilliermondii</i> .....	29
1.4.7 <i>C. haemulonii</i> .....	30
1.4.8 <i>C. inconspícua</i> .....	31
1.4.9 <i>C. kefyr</i> .....	31
1.4.10 <i>C. krusei</i> .....	31
1.4.11 <i>C. lipolytica</i> .....	32
1.4.12 <i>C. lusitaniae</i> .....	32
1.4.13 <i>C. norvegensis</i> .....	33
1.4.14 <i>C. parapsilosis</i> .....	34
1.4.15 <i>C. rugosa</i> .....	34
1.4.16 <i>C. stellatoidea</i> .....	35
1.4.17 <i>C. tropicalis</i> .....	36
1.4.18 <i>C. utilis</i> .....	36

1.5 Manifestações clínicas.....	37
1.5.1 Candidíase oral.....	37
1.5.2 Candidíase vulvovaginal.....	40
1.5.3 Balanite.....	41
1.5.4 Candidíase cutânea.....	42
1.5.5 Onicomicose e paroníquia.....	47
1.5.6 Candidíase hematogênica.....	51
1.6 Candidídes.....	53
1.7 Infecções mistas.....	53
1.8 Biofilmes.....	55
1.9 Complicações da candidíase.....	57
2 JUSTIFICATIVAS.....	64
3 OBJETIVOS.....	65
3.1 Objetivo geral.....	65
3.2 Objetivos específicos.....	65
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	66
4.1 Coleta do material clínico.....	66
4.2 Exame direto.....	66
4.3 Cultura em ágar Sabouraud e ágar Mycosel.....	67
4.4 Cultura em BHI acrescido de cloranfenicol.....	67
4.5 Plaqueamento em ágar Sabouraud.....	67
4.6 Estoque em água destilada estéril.....	68
4.7 Cultura em CHROMagar <i>Candida</i> .....	68
4.8 Prova do tubo germinativo.....	68
4.9 Cultura em ágar Sabouraud hipotônico.....	69
4.10 Cultura em ágar Sabouraud entre 42-45°C.....	69
4.11 VITEK <sup>®</sup> 2 <i>Compact</i> .....	69
4.12 Referências.....	70
4.13 Estatística.....	70
5 RESULTADOS.....	72

6 DISCUSSÃO.....	105
7 CONCLUSÕES.....	122
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123
9 APÊNDICES.....	140
9.1 Modelo do termo de consentimento livre e esclarecido.....	141
9.2 Sequência de procedimentos nas amostras com presença de bactérias ou <i>Trichosporon</i> .....	142
9.3 Conteúdo dos poços VITEK <sup>®</sup> 2 YST.....	144
9.4 Microrganismos identificados pelo VITEK <sup>®</sup> 2 YST.....	145

## 1 INTRODUÇÃO

Doenças causadas por fungos passaram a receber maior atenção no século passado, principalmente nas duas décadas finais, com o advento da AIDS, avanços nas terapêuticas de doenças de base, maior uso de antibacterianos, aprimoramento de técnicas de transplantes, enfim, com a maior sobrevivência de pacientes portadores de variadas enfermidades. A descoberta de que a redução da população dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> predispõe os pacientes a várias infecções fúngicas flagrou uma nova área na susceptibilidade do hospedeiro a tais infecções. Dentre os fungos responsáveis por doenças em indivíduos imunodeprimidos, e mesmo entre aqueles aparentemente saudáveis, encontramos as espécies do gênero *Candida* (NAGLIK, CHALLACOMBE, HUBE, 2003).

### 1.1 Candidíase

Candidíase ou candidose é uma micose causada por leveduras do gênero *Candida*, classificada como leve ou grave, aguda ou crônica, superficial ou profunda, podendo apresentar amplo espectro clínico. O principal agente das candidíases é a *C. albicans*, isolada em 60% das amostras clínicas. Uma vez que tal levedura faz parte da microbiota humana, a micose por este agente é considerada oportunista. No entanto, frequentemente na literatura são descritos isolamentos de outros agentes de candidíase: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, *C. viswanathii*, *C. famata* dentre outras, todos isolados a partir de casos clínicos humanos (CHAVES, CAVALCANTI, PORTO, 2003; MENEZES et al., 2004).

Pelo acima exposto, quando há uma ruptura no equilíbrio da microbiota ou com o sistema imune do hospedeiro, as espécies do gênero *Candida* tendem a determinar

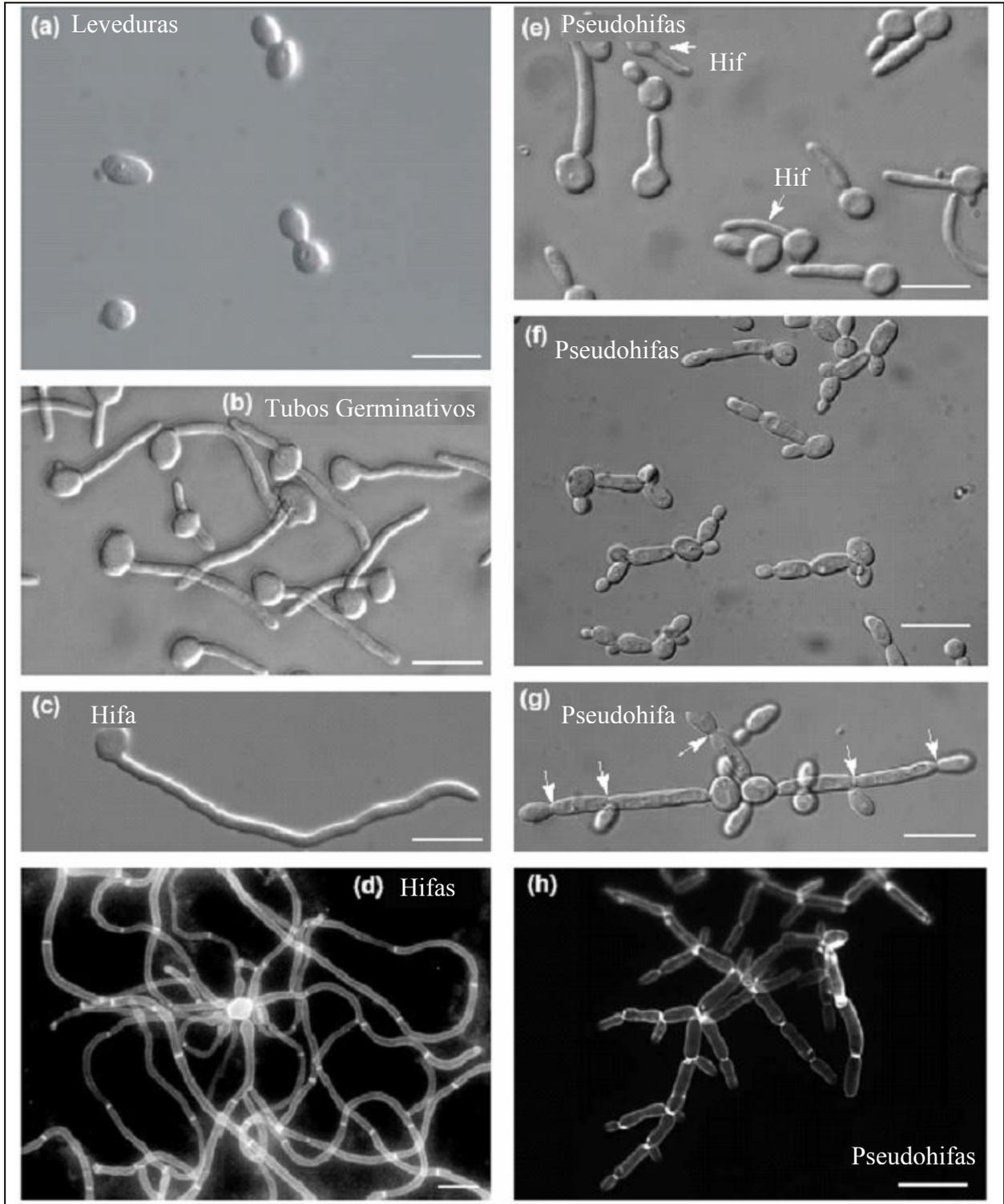
manifestações clínicas, tornando-se patogênicas. A origem pode ser endógena quando oriunda da microbiota; ou exógena como, por exemplo, adquirida via ato sexual (NAGLIK, CHALLACOMBE, HUBE, 2003; MONGE et al., 2006).

As leveduras do gênero *Candida* têm grande importância pela alta frequência com que colonizam o hospedeiro humano. São encontradas na porção gastrointestinal em 80% da população adulta saudável. Entre as mulheres, cerca de 20 a 30% apresentam colonização vaginal por *Candida* e, em hospitais, o gênero *Candida* responde por cerca de 80% das infecções fúngicas documentadas, representando um grande desafio aos clínicos de diferentes especialidades, devido às dificuldades diagnósticas e terapêuticas. Infecções por *Candida* envolvem um espectro amplo de doenças superficiais e invasivas oportunistas, acometendo pacientes expostos a uma grande diversidade de fatores de risco. Infecções/lesões de pele e mucosas podem ser documentadas em pacientes saudáveis, mas com pequenas alterações locais de resposta do hospedeiro. Por outro lado, infecções sistêmicas por *Candida* podem comprometer vísceras como resultado de disseminação hematogênica, complicações infecciosas estas geralmente documentadas em pacientes críticos, portadores de doenças degenerativas e/ou neoplásicas (COLOMBO, GUIMARÃES, 2003).

## 1.2 Morfologia e ciclo celular (modelo *C. albicans*)

*C. albicans* é uma levedura diplóide com história de dimorfismo fúngico inverso, enquanto outros fungos patogênicos dimórficos se encontram na natureza na forma miceliana causando doenças no homem na forma leveduriforme (FORCHE et al., 2003).

A biologia de *C. albicans* apresenta diferentes aspectos, entre eles, a habilidade de se apresentar com diferentes morfologias (Figura 1). A fase unicelular leveduriforme pode gerar um broto e formar hifas verdadeiras. Entre esses dois extremos, brotamento e filamentação, o fungo ainda pode exibir uma variedade de formas durante seu crescimento, podendo gerar pseudohifas, que, na verdade, representam leveduras alongadas unidas entre si. A mudança na morfologia de fase leveduriforme para filamentosa pode ser induzida por uma variedade de condições ambientais como variação de temperatura e de pH (SUDBERY, GOW, BERMAN, 2004).

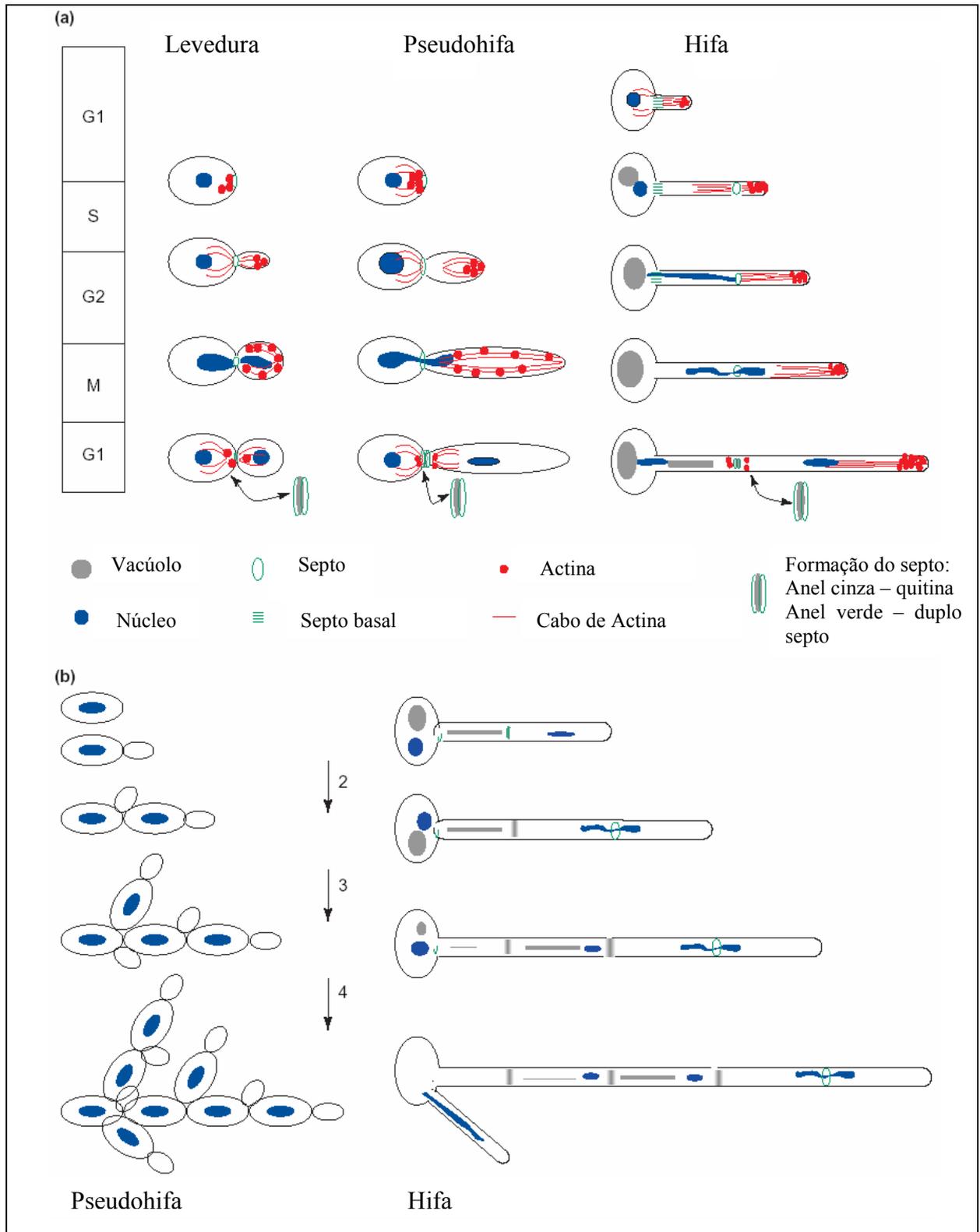


**Figura 1: Morfologia de células leveduriformes, hifas e pseudohifas de *C. albicans*.** (a) Brotamentos de células leveduriformes logo após inoculação de células de leveduras sem brotamento. (b) Tubos germinativos são mais estreitos e uniformes do que os brotos de pseudohifas (e), que tem uma constrição no local do brotamento. Entretanto, é difícil obter uma população que consiste somente de pseudohifas; cerca de 25% das estruturas constituem-se de hifas, exemplos dessas estão indicadas por setas e “Hif”. (c) Hifas que apresentam paredes com lados paralelos, sem qualquer constrição ou ramificação. (d) Micélio de hifa maduro. (e, f) pseudohifas. (g) Duas longas pseudohifas que lembram vagamente uma hifa. (h) Micélio de pseudohifa maduro. Todas as formas de pseudohifas lembram superficialmente hifas, mas possuem constrições na posição do septo (setas) e mostram ramificações regulares. As imagens em (d) e (h) são de células tratadas com Calcoflúor, que evidencia a quitina nas paredes e septos. Barras = 10  $\mu$ m (adaptado de SUDBERY, GOW, BERMAN, 2004).

A mudança nas formas celulares é um fenômeno genético, que reflete no aspecto macromorfológico leveduriforme, que quanto à cor pode ser do branco ao creme, com aparência pastosa brilhosa ou cerácea. Porém, o estado leveduriforme pode evoluir para filamentosos ou, até mesmo, uma mescla de células fúngicas leveduriformes e filamentosas (SUDBERY, GOW, BERMAN, 2004; MENEZES et al., 2005).

O critério para a diferenciação entre hifa verdadeira e pseudohifa está na observação da formação de tubo germinativo. A partir da célula leveduriforme, na formação da hifa verdadeira não há a constrição entre a célula mãe e o filamento, já pseudohifas, possuem a constrição entre a célula mãe e continuidade a partir do broto formado (SUDBERY, GOW, BERMAN, 2004; WHITEWAY, BACHEWICH, 2007).

Diferença maior entre a hifa verdadeira e a pseudohifa está ligada na organização de seus ciclos celulares (Figura 2). Em *C. albicans*, o termo hifa e tubo germinativo são considerados freqüentemente sinônimos. A hifa que se projeta do primeiro ciclo celular, antes da formação do septo é chamada de tubo germinativo, servindo para descrever o alongamento que desenvolve a hifa. O termo hifa refere-se a toda não ramificação e filamentos que contém mais de um septo e ausência de constrições. No primeiro ciclo celular da pseudohifa o anel do septo aparece entre a célula mãe e a célula filha antes do surgimento do broto. O processo de mitose se inicia e quando se completa, as células se separam com a formação de um septo composto principalmente de quitina. Em se tratando de ciclo celular de pseudohifa e levedura, não existem muitas diferenças com exceção do alongamento (para pseudohifa) e separação da célula por completo, permitindo a formação do septo, sendo que na pseudohifa as formações do septo e da constrição coincidem no mesmo ponto. A formação da hifa verdadeira é mais distinta, a partir da fase leveduriforme surge o tubo germinativo antes do ciclo celular, logo há a formação do primeiro septo entre o alongamento do broto e não entre a célula mãe e a célula filha como nas leveduras e pseudohifas. A primeira divisão nuclear não ocorre entre a célula mãe e a célula filha como nas leveduras e pseudohifas, pois o núcleo migra para fora da célula mãe e se divide no prolongamento (hifa verdadeira, tubo germinativo), finda a mitose, se instala o septo no tubo germinativo (hifa verdadeira) (SUDBERY, GOW, BERMAN, 2004).



**Figura 2: Representação esquemática do ciclo celular de levedura, pseudohifa e hifa de *C. albicans*.** (a) Ciclo celular de levedura e o primeiro ciclo celular de hifas e pseudohifas induzidos a partir de células leveduriformes sem brotamento. Observamos tubos germinativos que emergem antes da transição G1/S com ausência de constrição; maior comprimento dos cabos de actina em pseudohifas, o que proporciona o seu alongamento quando comparados as leveduras; e, diferença na divisão nuclear de pseudohifas e hifas quanto à posição da migração dos cromossomos, entre célula-mãe e célula-filha em leveduras e pseudohifas, e no interior do tubo germinativo em hifas. (b) Ciclos celulares em pseudohifa a partir de células leveduriformes sem brotamento. Nota-se a sincronia do brotamento em pseudohifas e alongamento do tubo germinativo em hifas (adaptado de SUDBERY, GOW, BERMAN, 2004).

Em *C. albicans*, a orientação do tubo germinativo em estado leveduriforme e pseudohifa é determinado pelo polarissoma que é um complexo de proteínas envolvidas na orientação do crescimento do tubo germinativo, enquanto que na formação do tubo germinativo de hifa verdadeira a orientação é determinada tanto pelo polarissoma como pelo “spitzenkorper” (estrutura responsável pelo crescimento e desenvolvimento polarizado encontrado apenas em hifas verdadeiras) (CRAMPIN et al., 2005; WHITEWAY, BACHEWICH, 2007).

Os clamidosporos são estruturas de resistência em *C. albicans*, esses elementos são formados quando o fungo se encontra em um local onde não há todos os nutrientes necessários para seu desenvolvimento, como por exemplo, meios de cultura feitos a base de arroz e milho, como o industrializado “corn meal”. A formação de clamidosporos sob condições específicas é uma das maneiras eficientes de se distinguir *C. albicans* de *C. dubliniensis* (WHITEWAY, BACHEWICH, 2007).

O fenômeno de “switching” tem sido muito investigado nos últimos anos em *C. albicans*. O fenômeno de “switching” entre células brancas e opacas, inicialmente identificado como uma transição celular, está limitado a apenas algumas linhagens. As células leveduriformes “brancas” são de formato ovóide e formam colônias geralmente de cor creme. As células leveduriformes “opacas” são alongadas e formam colônias mais acinzentadas. Recentes evidências estabeleceram que este fenômeno está ligado a “sexualidade” de *C. albicans* onde requer genes homozigotos para o locus MTL. A diferença não fica somente na morfologia, células leveduriformes “brancas” possuem estilo de vida fermentativo, enquanto que células leveduriformes “opacas” mostram características de metabolismo oxidativo (SOLL, LOCKHART, ZHAO, 2003a e b; WHITEWAY, BACHEWICH, 2007).

### 1.3 De comensal a patógeno

Numerosos fatores contribuem para as infecções fúngicas, onde podemos destacar: o rompimento da barreira cutânea e mucosa, disfunção dos neutrófilos, defeito na imunidade mediada por células, desordem metabólica, exposição direta aos fungos, extremos de idade (recém nascidos e idosos), desnutrição aguda, longo tratamento com antibióticos,

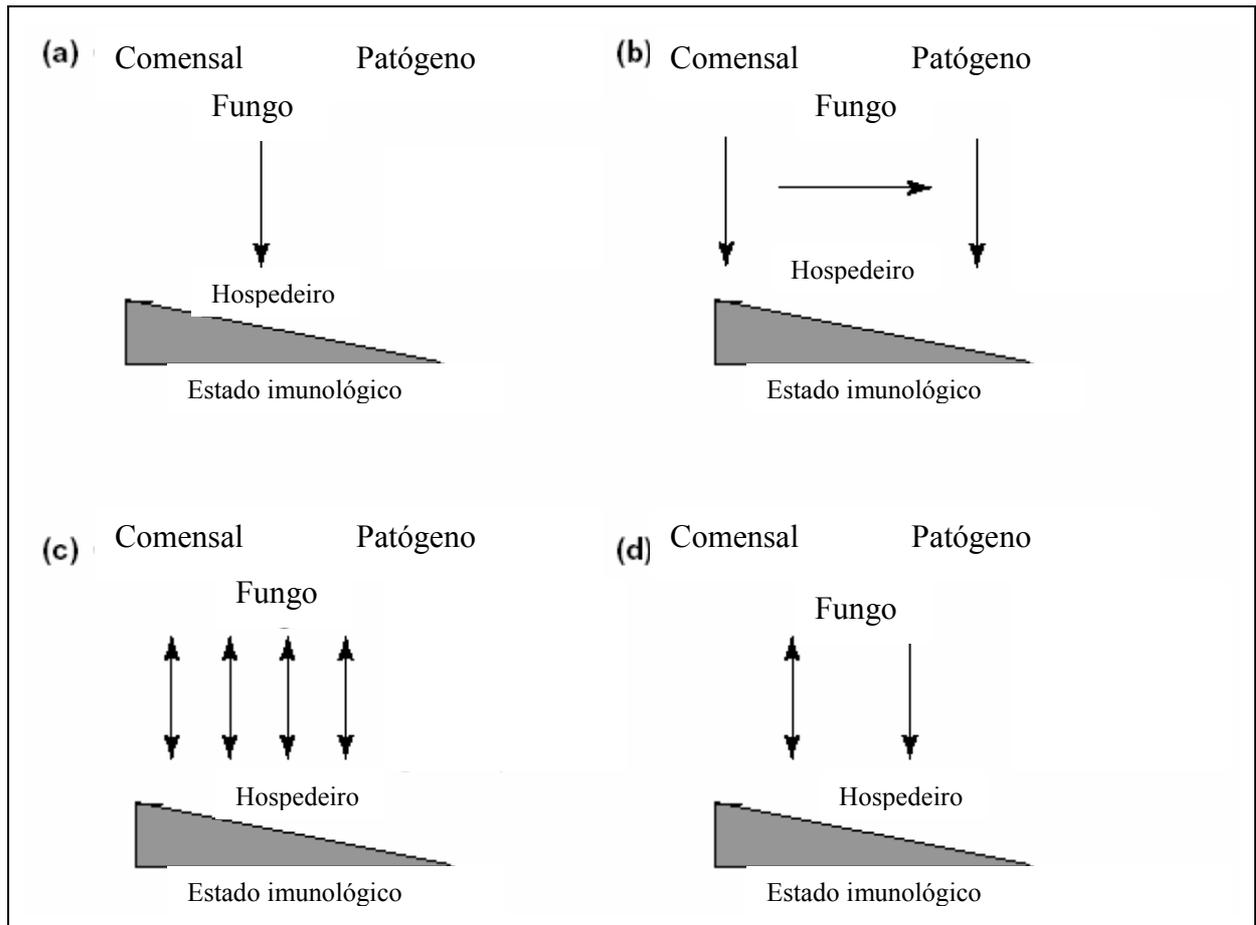
quimioterapia, transplantes, resistência a antifúngicos, dentre outros (PFALLER, DIEKEMA, 2007).

Os microrganismos comensais tornam-se patogênicos caso ocorram redução na eficiência dos mecanismos de defesa do hospedeiro ou o comprometimento de barreiras anatômicas secundárias como queimaduras ou procedimentos médicos invasivos. Alterações dos mecanismos de defesa do hospedeiro podem ser decorrentes de mudanças fisiológicas características da infância (prematuridade) e envelhecimento ou mais frequentemente, associadas a doenças degenerativas, neoplásicas, imunodeficiências congênitas ou adquiridas e imunodepressão induzida por iatrogenia (COLOMBO, GUIMARÃES, 2003).

*C. albicans* tem sucesso em ambos os casos, como comensal e como patógeno em hospedeiros humanos e outros animais, podendo colonizar em larga extensão diferentes sítios anatômicos. A transição do estado comensal para “parasita” requer um hospedeiro suscetível, mas também um processo de ativação. A expressão gênica de *C. albicans* é regulada por uma interação entre hospedeiro e patógeno. Programas transcricionais associados à transformação de estado leveduriforme para estado filamentosos contribuem também para a invasão no hospedeiro. Isto não é apenas o primeiro passo para a transição de comensal a “agressor”, mas também prepara a *Candida* para subseqüentes passos da infecção (Figura 3) (HUBE, 2004).

Apesar de uma morfologia flexível ser uma contribuição para a virulência fúngica, nenhum dado molecular deixou claro e estabelecido que a morfogênese fúngica junto com outros fatores de virulência, nem as formas específicas de *Candida* deva ser considerada absolutamente indicativa de saprofitismo ou parasitismo em determinado sítio no hospedeiro. A adaptação do fungo “in vivo” provavelmente reflete sua variabilidade frente a microambientes e a natureza em que esses oportunistas sobrevivem (ROMANI, BISTONI, PUC CETTI, 2003).

Enquanto que a hifa é o estado morfológico que melhor transpõe barreiras, devido ao seu desenvolvimento filamentosos; a fase leveduriforme, por sua morfologia arredondada, é a melhor para a disseminação. Em geral, a fase leveduriforme predomina durante a colonização no hospedeiro sadio, enquanto que as hifas surgem numa deficiência do sistema imune. Portanto, ambas as formas são de grande importância na patogênese, uma vez que elas são requeridas em diferentes situações no hospedeiro (BROWN, GOW, 1999).



**Figura 3: Quatro caminhos possíveis onde *C. albicans* progride do comensalismo para infecção. (a)** A doença ocorre somente quando a imunidade está diminuída, com pouca ou nenhuma alteração no perfil do patógeno. **(b)** *C. albicans* altera de comensal a patógeno devido um programa genético distinto. **(c)** Interação permanente entre hospedeiro e patógeno que regula a expressão gênica de *C. albicans*. **(d)** Permanente interação e um programa genético regulam a expressão gênica de *C. albicans*. As pontas das setas simbolizam um processo ativo em termos de expressão de genes. A chave afilada simboliza a susceptibilidade do hospedeiro incluindo a resposta deste e a flora microbiana. O início de uma infecção também depende do tecido do hospedeiro onde pode incluir uma reação exacerbada do mesmo, por exemplo, durante candidemias (adaptado de HUBE, 2004).

A patogênese da candidíase é facilitada por vários fatores de virulência envolvidos em funções tais como: 1) aderência às células do hospedeiro pelas chamadas adesinas, como por exemplo, a família do gene ALS (agglutinin-like sequence) em *C. albicans*, que codifica diferentes glicoproteínas de superfície celular que estão implicadas no processo de adesão em superfícies do hospedeiro (CALDERONE, FONZI, 2001; BISWAS, DIJCK, DATTA, 2007); 2) morfogênese (dimorfismo fúngico), levedura, pseudohifa, hifa verdadeira e clamidoconídios (SUDBERY, GOW, BERMAN, 2004); 3) variação fenotípica, tipo conjugante sexuado, fenômeno de “switching” (SOLL, LOCKHART, ZHAO, 2003a e b); 4) sobrevivência dentro de fagócitos (JONG et al., 2001); 5) modulação do sistema imune, mananas e manoproteínas são capazes de regular (ativar e desativar) a ação das defesas do

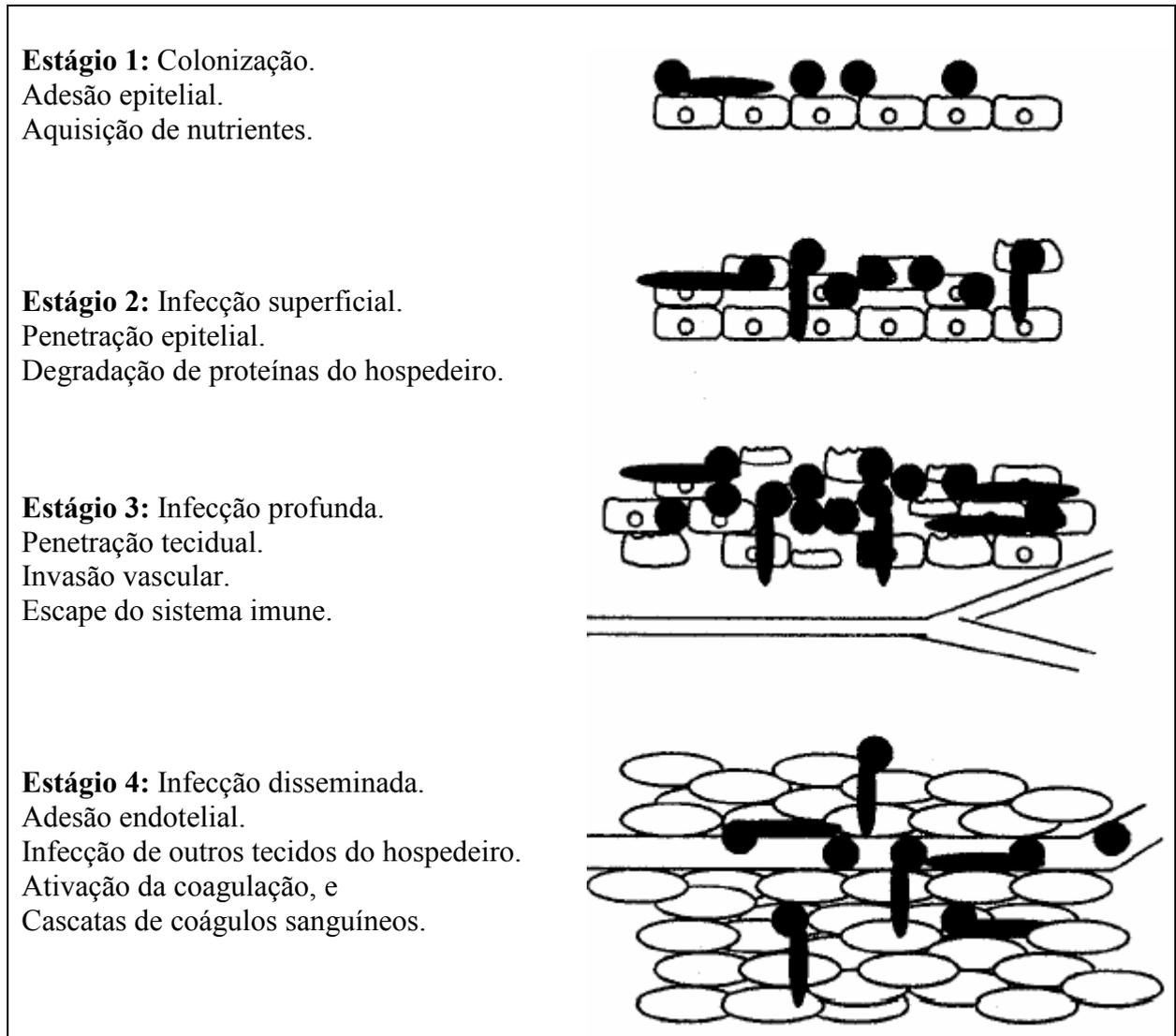
hospedeiro (CHAFFIN et al., 1998); 6) adaptação ao ambiente oxidativo, determinado pelo genoma selvagem de *C. albicans*, onde genes são temporariamente induzidos ou reprimidos em função do óxido nítrico (HROMATKA, NOBLE, JOHNSON, 2005); 7) seqüestro de ferro, principalmente na candidíase hematogênica, onde é capaz de adquirir (*C. albicans*) o ferro a partir da transferrina (KNIGHT et al., 2005); 8) variação de temperatura e pH, componentes cruciais para adaptação a diferentes sítios no hospedeiro (ODDS, 1993; BERNARDIS et al., 1998); 9) candida-toxina (BUZZINI, MARTINI, 2001); e 10) enzimas hidrolíticas, as principais enzimas produzidas são as proteinases, que hidrolisam ligações peptídicas, e as fosfolipases, que hidrolisam os fosfoglicerídeos (CALDERONE, FONZI, 2001).

Sabe-se que nenhum fator de virulência é dominante, ou seja, a patogênese depende de uma expressão coordenada de múltiplos genes de uma forma apropriada para as condições do sítio de infecção e fatores ligados ao hospedeiro (Figura 4). Considerando-se que as condições diferem muito nos diversos sítios de infecção, é bem provável que selecionados genes associados à virulência sejam importantes durante tipos específicos de candidíase. Mas essa hipótese não tem sido muito avaliada. Além disso, a extensão para os quais os chamados fatores de virulência contribuam para a colonização ou para o processo de doença não está definitivamente esclarecida (CHENG et al., 2005).

#### 1.4 Espécies do gênero *Candida*

Nos últimos anos, vem aumentando o número de micoses causadas por espécies de *Candida* não-*albicans*. Em 1963, eram conhecidas apenas cinco espécies de *Candida* como causadoras de doenças em humanos, incluindo *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea* (*C. albicans* var *stellatoidea*) e *C. guilliermondii*. No artigo de COLOMBO & GUIMARÃES (2003), foi relatado que até aquele momento eram conhecidas cerca de 17 espécies de *Candida* (gênero que se conhece quase 200 espécies) causadoras de micoses superficiais ou invasivas em seres humanos. As principais espécies de interesse clínico são: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae*. Entretanto, tem sido progressivo o relato de casos de doenças superficiais e invasivas relacionadas a espécies emergentes de *Candida*, envolvendo isolamentos de *C.*

*dublinskiensis*, *C. kefyri*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis*, *C. inconspicua*, dentre outras (ZIARRUSTA, 2002; COLOMBO, GUIMARÃES, 2003).



**Figura 4:** Esquema ilustrando a contribuição de diversos fatores de virulência atribuída à patogenia de *C. albicans*. Comumente coloniza a superfície epitelial (**estágio 1**) e causa infecções superficiais (**estágio 2**), mas sob condições onde o hospedeiro se encontra comprometido, o fungo estabelece infecções profundas (**estágio 3**) avançando para o interior do tecido epitelial. Ocasionalmente, *C. albicans* pode causar infecções disseminadas (**estágio 4**), onde o fungo coloniza e infecta outros tecidos do hospedeiro. Este processo infeccioso envolve numerosos fatores de virulência: estágio 1: adesinas, enzimas hidrolíticas, dimorfismo, fenômeno de “switching” e mimetismo molecular; estágio 2: enzimas hidrolíticas e dimorfismo; estágio 3: enzimas hidrolíticas, dimorfismo, mimetismo para com o hospedeiro e imunomoduladores; estágio 4: adesinas, enzimas hidrolíticas, dimorfismo, fenômeno de “switching”, antioxidantes e imunomoduladores. Observe que enzimas hidrolíticas e o dimorfismo estão envolvidos nos quatro estágios de infecção (adaptado de NAGLIK, CHALLACOMBE, HUBE, 2003).

As espécies do gênero *Candida*, segundo a taxonomia se localizam em: Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Saccharomycetes, Ordem Saccharomycetales, Família *Saccharomycetaceae* (GUARRO, GENÉ, STCHIGEL, 1999). A seguir descrevemos um resumo das principais espécies patogênicas, incluindo as emergentes.

#### 1.4.1 *Candida albicans*

*C. albicans* é, sem dúvida alguma, a espécie mais frequentemente isolada de infecções superficiais e invasivas em diversos sites anatômicos e em causas de candidíase em todas as partes do mundo. É a espécie de *Candida* com maior conhecimento patogênico devido à diversidade de fatores de virulência descobertos. Habitualmente se considera que a origem de *C. albicans* causadora de infecções seja a microbiota do digestório humano (organismo comensal), porém diversos casos têm se relatado de forma horizontal. *C. albicans* foi o primeiro fungo zoopatogênico que teve o seu genoma sequenciado (organismo diplóide com oito pares de cromossomos), o que possibilita uma variedade de experimentos e, por conseguinte, um grande avanço na biologia deste fungo, principalmente, na expressão dos genes. Esta espécie é naturalmente sensível a todas as drogas antifúngicas de uso sistêmico, mas casos de resistência adquirida a azólicos são conhecidos em pacientes que foram expostos prolongadamente a estes medicamentos. Quanto à resistência a anfotericina B os relatos são mínimos (COLOMBO, GUIMARÃES, 2003; MAGEE, MAGEE, 2005; TIRABOSCHI et al., 2007).

#### 1.4.2 *Candida ciferrii*

*C. ciferrii* é uma levedura, cujo estado teleomorfo corresponde ao *Stephanoascus ciferrii*. A assimilação de inositol é uma característica quase exclusiva desta espécie, compartilhada com poucas deste mesmo gênero, como *Candida curvata* e *Candida hellenica* (leveduras de origem ambiental), e com outros gêneros como *Cryptococcus* e *Trichosporon*, dos quais se diferencia facilmente pela hidrólise da uréia nas provas bioquímicas. *C. ciferrii* pode ser isolada do solo e animais, sendo que a primeira descrição dessa levedura foi realizada em 1965. No ser humano já foram descritos casos de onicomicoses, candidemias, infecções em imunodeprimidos e uma forma disseminada em um paciente com leucemia

mielóide aguda. Relatos de casos demonstram que *C. ciferrii* é resistente ao fluconazol (FURMAN; AHEARN, 1983; GUNSILIUS et al., 2001; GARCÍA-MARTOS et al., 2004).

#### 1.4.3 *Candida dubliniensis*

*C. dubliniensis* (identificada em 1995 em Dublin, Irlanda) é uma espécie de levedura patogênica que é fenotipicamente, geneticamente, e filogeneticamente semelhante à *C. albicans*. Apesar de serem bem próximas, *C. albicans* é significativamente bem mais patogênica. *C. dubliniensis* é comumente associada à mucosa oral, pacientes com infecções pelo HIV, e paciente diabéticos, embora seja identificada como comensal em cavidade oral de uma minoria de indivíduos saudáveis. Todavia pacientes com infecções sistêmicas por *C. dubliniensis* tenham se recuperado, este incidente por *C. albicans* está bem longe de acontecer. *C. dubliniensis* é responsável por cerca de 2% das candidemias. As razões pela grande diferença entre a virulência de *C. dubliniensis* e *C. albicans* são alvos de investigações detalhadas em modelos de estudo com animal. Recentemente se observou que *C. dubliniensis* tem a capacidade reduzida de produzir hifas, resultando assim em menores níveis de colonização e invasão tecidual (SULLIVAN et al., 1999; MORAN et al., 2004; McMANUS et al., 2008).

Em estudo realizado com 548 amostras armazenadas no banco de leveduras do Laboratório Especial de Micologia, UNIFESP, verificou-se que 2% das amostras armazenadas originalmente como *C. albicans* eram na verdade *C. dubliniensis*. A diferença entre ambas as espécies se faz por provas de assimilação de carboidratos, temperatura de crescimento, coloração das colônias no meio CHROMagar *Candida* (para alguns autores diferentes tons de verde sugere a distinção entre elas), produção de clamidosporos, diferenças antigênicas e por sequências de DNA, dentre outras. *C. dubliniensis* tem maior facilidade em desenvolver resistência a azólicos (BRENA et al., 2004; COLOMBO, GUIMARÃES, 2003).

#### 1.4.4 *Candida famata*

*C. famata* também conhecida como *Torulopsis candida* e o teleomorfo *Debaryomyces hansenii* é usualmente encontrada em alguns alimentos, incluindo laticínios. *C. famata* é um

patógeno oportunista que habita a cavidade oral do homem como comensal. Antes se pensava que *C. famata* não fosse patogênica para os seres humanos, todavia, casos clínicos desta levedura têm sido relatados como onicomicoses, fungemias, alveolites, peritonites, endoftalmites (retinopatias), infecções no mediastino e sistema nervoso central. Diferentes pesquisas em fungemias humanas revelaram que *C. famata* é responsável por 0,2 a 2% do total de casos. Em comparação com *C. albicans*, *C. famata* é menos susceptível aos azólicos (CARRASCO et al., 2005; GUPTA et al., 2006; PISA et al., 2007; DESNOS-OLLIVIER et al., 2008).

#### 1.4.5 *Candida glabrata*

*C. glabrata* pode ser considerada como saprófita e não patogênica na microbiota normal de indivíduos saudáveis, porém nas duas últimas décadas como consequência de drogas imunodepressoras e o advento da AIDS, *C. glabrata* aumentou significativamente infecções em seres humanos, chegando a ser o segundo ou terceiro patógeno em casos de candidíases, principalmente em ambientes hospitalares. Comparando-se a mortalidade entre outras espécies de *Candida* não-*albicans*, *C. glabrata* é relativamente alta. Mais especificamente a mortalidade é em torno de 50% em pacientes com câncer e 100% quando em complicações de transplante de medula óssea. Surpreendentemente, apesar de uma alta taxa de mortalidade, *C. glabrata* demonstra uma baixa virulência em modelos de infecções com animais. *C. glabrata* emerge como um notável agente patogênico de mucosa oral e pode promover infecção concomitante com *C. albicans* e, em paciente com câncer ou HIV positivos, associada a infecção orofaríngea, pode ser mais severa e mais difícil de ser tratada do que infecções por *C. albicans* (BARCHIESI et al., 2005; LI, REDDING, DONGARI-BAGTZOGLOU, 2007).

*C. glabrata*, em relação a outras espécies de *Candida*, não é um fungo dimórfico, se apresenta como blastoconídio tanto no ambiente como quando patógeno, e especialmente não forma pseudohifas em temperaturas acima de 37°C. Os blastoconídios de *C. glabrata* são menores que os de *C. albicans*, porém quando em meio de Sabouraud formam colônias homogêneas, brilhantes, de coloração creme como qualquer outra espécie de *Candida* (FIDEL-JR, VAZQUEZ, SOBEL, 1999).

Isolados clínicos de *C. glabrata* apresentam menor sensibilidade ao fluconazol, conseqüentemente, um aumento nos índices de colonização e infecção por *C. glabrata* tem sido observado em diferentes grupos de pacientes com exposição prolongada ao fluconazol. Além dos problemas terapêuticos de infecções por *C. glabrata* associados aos azólicos, estudos mostram uma menor sensibilidade também para anfotericina B. Na verdade, já havia sido descrito que infecções por *C. glabrata* podem ocorrer em pacientes previamente expostos a anfotericina B. Outro aspecto sobre a epidemiologia deste patógeno é sua maior ocorrência em pacientes idosos (COLOMBO, GUIMARÃES, 2003; PEMÁN et al., 2004; RAY et al., 2007).

#### 1.4.6 *Candida guilliermondii*

Infecções por *C. guilliermondii*, levedura haplóide e comensal humana, não são ainda freqüentes, porém é um agente de candidíase que vem sendo descrito como emergente. Muitos casos de infecção por *C. guilliermondii* (teleomorfo *Pichia guilliermondii*) estão associados à onicomicoses, pacientes com câncer, neutropênicos, pacientes acometidos de cirurgias, transplantes, e em pacientes em tratamento intensivo. Muitas linhagens de *C. guilliermondii* são morfologicamente e bioquimicamente semelhantes à *C. famata*, e métodos baseados em ácido nucléico são utilizados para distinguir as duas espécies. Recentemente *C. guilliermondii* foi subdividida em mais duas espécies, *C. fermentati* e *C. carpophila*, sendo que estas três espécies são bioquimicamente indistinguíveis. Globalmente, *C. guilliermondii* ocorre em 2% dos casos de candidemia, todavia em determinadas regiões geográficas como a Itália, Índia e Brasil, este índice pode chegar a 10% dos casos (LAN, XU, 2006; PFALLER et al., 2006b; MEDEIROS et al., 2007; DESNOS-OLLIVIER et al., 2008).

O tratamento pode apresentar problemas, principalmente para imunodeprimidos, pois uma grande porcentagem de linhagens vem diminuindo a sensibilidade para várias classes de agentes antifúngicos, principalmente o fluconazol e o itraconazol. Para alguns autores *C. guilliermondii* demonstra semelhança com *C. lusitaniae* “in vitro” na resistência para o fluconazol e a anfotericina B. Caspofungina e micafungina são fungicidas que pouco se conhece sua atividade contra *C. guilliermondii* (CANTÓN et al., 2006; GIRMENIA et al., 2006).

#### 1.4.7 *Candida haemulonii*

*C. haemulonii* foi originalmente descoberta em 1962, a partir do intestino de *Haemulon scirus*, um trematódeo. Na seqüência, esta espécie foi isolada da pele de golfinhos e da água do mar da costa de Portugal, e esteve associado com uma epidemia em laboratórios que mantinham adultos de *Ornithodoros moubata*, um ácaro, na República Tcheca. O primeiro isolado humano foi em 1984, do sangue de um paciente que dependia de hemodiálise devida sua insuficiência renal, e que faleceu apesar de terapia com anfotericina B e 5-fluorocitosina. Posteriormente, dois casos de fungemia por *C. haemulonii* foram reportados em pacientes com câncer na França em 1986 e anemia megaloblástica na Argentina em 2002. Recentemente, isolou-se este fungo do sangue e cateter de um paciente pediátrico com câncer e de pacientes diabéticas e não-diabéticas com candidíase vaginal. Após estes relatos, *C. haemulonii* tem sido identificada como responsável por onicomicoses, paroníquias e candidíase vaginal em pacientes debilitados em geral. A identificação de *C. haemulonii* é complicada devido à semelhança fenotípica com *C. famata* e *C. guilliermondii*. Os isolados de *C. haemulonii* demonstraram um aumento na resistência para fluconazol, itraconazol e anfotericina B, porém são suscetíveis ao voriconazol, 5-fluorocitosina e caspofungina (RODERO et al., 2002; KHAN, et al., 2007).

LEHMANN et al. (1993) estudaram 25 isolados clínicos de *C. haemulonii* e descreveram dois grupos geneticamente distintos com base no perfil isoenzimático, parentesco ao nível de DNA e características fisiológicas, sugerindo assim um complexo *C. haemulonii*. Recentemente, SUGITA et al. (2006) descreveram uma espécie nova, *C. pseudohaemulonii*, que foi isolada do sangue de um paciente na Tailândia, isolado este que foi resistente à anfotericina B e aos derivados azólicos. KHAN et al. (2007) descreveram fungemias por *C. haemulonii* em sete neonatos no Kuwait, resistentes à anfotericina B, fluconazol e itraconazol. Estes dois últimos demonstram a alta emergência de *C. haemulonii* como patógeno oportunista em pacientes imunodeprimidos.

#### 1.4.8 *Candida inconspicua*

*C. inconspicua* é relatada em pacientes imunodeprimidos com infecções virais, infecções orais ou esofágicas, infecções vaginais e em pacientes com diabetes mellitus. *C. inconspicua* não está associada à pacientes com câncer (D'ANTONIO et al., 1998).

MAJOROS et al. (2005a, b e c) em três diferentes trabalhos com isolados de *C. inconspicua*, testaram fluconazol, anfotericina B, 5-fluorocitosina e caspofungina por diferentes métodos. Para o fluconazol observou-se uma alta susceptibilidade para os diversos métodos empregados. Para a anfotericina B, a maioria dos resultados foi resistente. Para a 5-fluorocitosina todos os isolados foram susceptíveis, e para a caspofungina observou-se uma ótima susceptibilidade.

#### 1.4.9 *Candida kefyr*

*C. kefyr*, antigamente conhecida como *C. pseudotropicalis*, é comumente encontrada em certos produtos industrializados, principalmente laticínios. Como nativo da microbiota humana e como patógeno é extremamente rara, podendo causar fungemias, esofagites, e ocorrer em pacientes imunodeprimidos com câncer, doenças hematogênicas e leucemias (MORGAN, WILKOWSKE, ROBERTS, 1984; KOBAYASHI et al., 1994; MUNSON et al., 2002; SENDID, LACROIX, BOUGNOUX, 2006).

#### 1.4.10 *Candida krusei*

*C. krusei* tem sido reconhecida como um patógeno fúngico que é resistente a um amplo repertório de antifúngicos, principalmente devido a sua resistência intrínseca ao fluconazol combinada com a baixa sensibilidade para anfotericina B e a 5-fluorocitosina. Muitos autores têm reportado um avanço em infecções por *C. krusei* entre pacientes que receberam terapia com fluconazol e anfotericina B. O fenótipo de multiresistência exibido por *C. krusei* é um problema para o tratamento de pacientes em geral, principalmente grupos comprometidos (neutropênicos, com hanseníase, com leucemia, HIV positivos, dentre outros) e fungemias. O voriconazol é usado com sucesso em infecções por *C. krusei*, e o grupo de

antifúngicos equinocandinas tais como a caspofungina, anidulafungina e micafungina, têm demonstrado excelente atividade “in vitro”. Todavia, autores vêm relatando uma diminuição da sensibilidade para o voriconazol e as equinocandinas. *C. krusei* apresenta uma plasticidade com respeito a desenvolver resistência a antifúngicos, e assim como *C. glabrata*, são consideradas importantes espécies a serem monitoradas com relação à resistência antifúngica (SHEMER et al., 2001; REICHART et al., 2002; HAKKI, STAAB, MARR, 2006; VOS et al., 2006; PFALLER et al., 2008).

#### 1.4.11 *Candida lipolytica*

*C. lipolytica* não é um agente freqüente de infecção oportunista. Organismo ubíquo tem sido isolado de carnes refrigeradas, derivados de petróleo, materiais de agricultura, plantas e solo. Quando patógeno é encontrado na cavidade oral, pulmões (secreção de brônquios), urina, esôfago, trato genital feminino, e intestinos. *C. lipolytica* pode causar candidemia, associada a cateter, e estudos comparativos de virulência feitos em camundongos observou-se ausência de mortalidade e de lesões viscerais com *C. albicans*, demonstraram que *C. lipolytica* possui menor virulência, podendo gerar infecções assintomáticas. Estudos prévios demonstram que *C. lipolytica* é susceptível a anfotericina B e aos derivados azólicos (WALSH et al., 1989; RAJAGOPALAN, MATHEWS, JACOB, 1996; D’ANTONIO et al., 2002).

#### 1.4.12 *Candida lusitaniae*

*C. lusitaniae* é uma espécie de levedura que não é freqüentemente encontrada como comensal humana, e quando encontrada (pele, trato respiratório, gastrointestinal e urogenital) é cerca de menos de 1% isolada de amostras nosocomiais, chegando a 2% das fungemias. Desenvolve resistência a anfotericina B (alguns autores sustentam que a elevada resistência a anfotericina B seja uma das formas de se distinguir *C. lusitaniae* de outras espécies de *Candida*) durante terapias, e o mecanismo genético deste fenômeno ainda é desconhecido, porém esta espécie é sensível ao fluconazol. O fenômeno de “switching” é encontrado em *C. lusitaniae*, assim como em outras espécies de *Candida* como *C. albicans* e *C. glabrata*, possibilitando assim o organismo adaptar-se a diferentes sítios no hospedeiro e também

selecionar genes dos quais podem estar relacionados à resistência antifúngica (FAVEL et al., 2004; MILLER, DICK, MERZ, 2006).

NOËL et al. (2003) em um estudo “in vitro” observou uma interação entre a 5-fluorocitosina e o fluconazol em 60 isolados clínicos de *C. lusitaniae*. As amostras demonstraram ser resistentes a 5-fluorocitosina e sensíveis ao fluconazol em experimentos separados. A resistência ao fluconazol ocorreu somente na presença de altas concentrações de 5-fluorocitosina. Quando as células resistentes ao fluconazol na presença de 5-fluorocitosina foram expostas somente ao fluconazol a sensibilidade foi restabelecida. A hipótese dos autores foi que a 5-fluorocitosina se comportou como um inibidor competitivo do transportador do fluconazol, e que este mecanismo pode se manifestar em outras espécies do gênero *Candida*.

*C. lusitaniae* é uma das espécies haplóides do gênero *Candida* que se conhece o seu ciclo sexuado. A morfologia e fisiologia de *C. lusitaniae* é comparada com *C. pulcherrima*, e isto não é incluído no banco de dados de sistemas de identificação, logo muitas espécies identificadas como *C. lusitaniae* possam ser de *C. pulcherrima* (NOËL et al., 2005).

#### 1.4.13 *Candida norvegensis*

Infecções por *C. norvegensis* não é comum. O primeiro isolado foi na Noruega, em três pacientes com asma aproximadamente 70 anos atrás. O primeiro caso verificado de infecção clínica apareceu em 1990 (NIELSEN et al., 1990), quando um caso de doença invasiva em um paciente imunodeprimido devido ao transplante renal, culminou em peritonite. Dois novos casos (de um total de sete pacientes) de infecção por *C. norvegensis* apareceram em 1996. Trinta e cinco isolados de *C. norvegensis* num período de 25 anos foram identificados na Dinamarca, espécies de *C. norvegensis* são mais isoladas frequentemente (trato respiratório, orofaringe e genital) na Dinamarca e Noruega do que em outros locais (SANDVEN et al., 1997).

*C. norvegensis* pode ser difícil de identificar quando em presença de *C. inconspicua* e *C. krusei*. De acordo com a bioquímica *C. norvegensis* hidrolisa a esculina, enquanto que *C. inconspicua* e *C. krusei* não. A identificação por métodos tradicionais pode ser contraditória,

salvo por análise de DNA. Estudos mostram que *C. norvegensis* pode se tornar resistente a anfotericina B, a 5-fluorocitosina, e a maioria dos derivados azólicos (AHEARN et al., 1984; MAJOROS et al., 2003).

#### 1.4.14 *Candida parapsilosis*

*C. parapsilosis* é um microrganismo ubíquo comumente isolado do solo, água e plantas (LUPETTI et al., 2002). Esta espécie emerge como um importante patógeno nosocomial (comensal quando em indivíduo sadio) associada a cateteres, com manifestações clínicas que incluem fungemias, endocardites, endoftalmites, artrites e peritonites, e estas infecções usualmente ocorrem em associação com procedimentos invasivos ou dispositivos prostéticos. Em alguns hospitais infantis, *C. parapsilosis* torna-se predominante em candidemias. Esta espécie é mais frequente em infecções na corrente sanguínea, principalmente em neonatos, pacientes transplantados, associados a cateteres, e pacientes que recebem nutrição parenteral e prévia terapia antifúngica. A habilidade de produção de biofilmes está intimamente ligada à doença, e é morfológicamente diferente de *C. albicans*. Em estudos recentes *C. parapsilosis* pode se dividir em três grupos distintos (*C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*) baseados em diversos critérios, incluindo análise de DNA, eletroforese de isoenzimas, eletroforese de cariótipos, morfotipos, sequências de DNA mitocondrial, habilidade de produção de biofilmes, dentre outras. Isolados clínicos desta espécie são sensíveis a anfotericina B e aos derivados azólicos (COLOMBO, GUIMARÃES, 2003; LAFFEY, BUTLER, 2005; LOGUE, et al., 2005; GULLU et al., 2008; KOCSUBÉ et al., 2007).

#### 1.4.15 *Candida rugosa*

Embora seja raro caso de infecção fúngica invasiva, *C. rugosa* é citada como um possível patógeno fúngico emergente. Fungemia devido a esta espécie de *Candida* foi reconhecida antes de 1985, quando um episódio por meio de cateter foi relatada em duas diferentes instituições nos Estados Unidos. Em sequência, 15 episódios de candidemia por *C. rugosa* foram relatados em pacientes que recebiam tratamento tópico com nistatina em outro hospital dos Estados Unidos, episódios estes que se mostraram resistentes a nistatina e

tiveram a sensibilidade a anfotericina B e ao fluconazol diminuídas. Recentemente seis episódios de candidemia causada por *C. rugosa* foram reportados no Brasil, e em sequência 44% de 32 consecutivos episódios de fungemia foram localizados em hospitais brasileiros. *C. rugosa* coloniza frequentemente pacientes de alto risco e exibe uma redução da sensibilidade a poliênicos e ao fluconazol, podendo ser transmissível de pessoa a pessoa no ambiente hospitalar, e endêmica em certas instituições (HERNANDEZ et al., 2004; PFALLER et al., 2006a).

Lipases de *C. rugosa* (antigamente conhecida como *C. cylindracea*) são versáteis biocatalisadores que catalisam hidrólises, alcoólises, reações de esterificação e transesterificação de triacilgliceróis em outros ésteres hidrofóbicos. Isto é amplamente aplicado em uma variedade de biotecnologias na indústria farmacêutica, e de alimentos como agentes flavorizantes (SCHMITT et al., 2002; BROCCA et al., 2003; JAMES et al., 2003).

#### 1.4.16 *Candida stellatoidea*

*C. stellatoidea* é vista por alguns autores como sinônima de *C. albicans*, enquanto que para outros é apenas uma variação dentro da mesma espécie. Estudos mostram que *C. stellatoidea* é dividida em dois cariótipos (tipos I e II) possuindo assim propriedades similares aos sorotipos B e A de *C. albicans* respectivamente, dentre uma dessas propriedades semelhantes temos a produção de mananas (OKAWA, GOTO, 2006). *C. albicans* difere de *C. stellatoidea* por três nucleotídeos e um aminoácido na sequência do gene do citocromo *b* (BISWAS et al., 2001).

Outros autores dividem *C. albicans* em quatro sorotipos, A, B, C e D, sendo que o sorotipo C é formado pela união dos sorotipos A e B, e que o sorotipo D na verdade é *C. dubliniensis*. Uma correlação entre a sensibilidade antifúngica também é vista neste grupo (*C. albicans*, *C. stellatoidea* e *C. dubliniensis*), gerando assim comportamentos semelhantes (McCULLOUGH, CLEMONS, STEVENS, 1999).

Isolados de *C. stellatoidea* podem ser encontrados em vaginites sintomáticas ou assintomáticas, cavidade oral, urina, pacientes que sofreram procedimentos cirúrgicos e em pacientes com endocardites. Antes da descoberta dos dois sorotipos de *C. stellatoidea*, esta

espécie era diferenciada de *C. albicans* pela perda da assimilação da sacarose. O sorotipo II de *C. stellatoidea* é considerada sacarose negativa, e para alguns autores um mutante de *C. albicans*, e somente o tipo I seria considerado *C. stellatoidea*. Há autores que não concordam com o *status* de espécie para *C. stellatoidea*, pois em seus estudos esta diferença seria em apenas dois pares de bases (KWON-CHUNG et al., 1990; McCULLOUGH, CLEMONS, STEVENS, 1999).

#### 1.4.17 *Candida tropicalis*

Recentes estudos comprovam que *C. tropicalis*, levedura diplóide de reprodução assexuada, é a segunda ou terceira na causa de candidemias em adultos, especialmente em pacientes com linfoma, leucemia, complicações hematológicas malignas, diabetes mellitus e câncer. Em contraste, é raro encontrar esta espécie em neonatos (colonização mucocutânea), porém o potencial de transmissão nosocomial é considerado. Diferente de *C. albicans*, que está associada à microbiota, a detecção de *C. tropicalis* é associada à infecção. *C. tropicalis* se apresenta mais virulenta que *C. albicans* em pacientes com complicações hematológicas malignas, e infecções disseminadas, assim com uma alta taxa de mortalidade. Entre adultos com ou sem câncer, infecções sistêmicas por *C. tropicalis* está associada com altas taxas de mortalidade e disseminação do que por infecções devido a *C. parapsilosis*. *C. tropicalis* é freqüentemente sensível a derivados poliênicos e azólicos, porém frequentemente resistente a 5-fluorocitosina (ZAUGG et al., 2001; ROILIDES et al., 2003; VANDEPUTTE et al., 2005).

#### 1.4.18 *Candida utilis*

*C. utilis* é uma levedura amplamente empregada na indústria, principalmente em reações de fermentação não-alcoólica, resultando assim em diversos compostos orgânicos (certos aminoácidos e enzimas), como por exemplo, o acetaldeído. *C. utilis* é capaz de utilizar álcoois como fonte de carbono. Como patógeno é extremamente raro em fungemias (de baixa virulência, não acomete indivíduos imunocompetentes, podendo ser encontrada no trato digestivo de pacientes hospitalizados), e em cultura gera um distinto aroma que se assemelha ao de pêra (BOUGNOUX et al., 1993; KONDO et al., 1995; HAZEN, THEISZ, HOWELL, 1999; FUJINO et al., 2006).

Segundo a literatura o primeiro caso de infecção por *C. utilis* ocorreu na década de 80 em um paciente neutropênico com HIV associado ao uso de cateter, o segundo caso foi descrito por BOUGNOUX et al. em 1993 em paciente hospitalizado não-neutropênico, não-aidético e não-associado a cateter (BOUGNOUX et al., 1993). HAZEN, THEISZ e HOWELL em 1999 descreveram um caso de infecção nosocomial crônico em paciente idoso internado na unidade de tratamento intensivo por *C. utilis* no trato urinário em presença de piúria. A candidíase permaneceu persistente num período de 3 anos (BOUGNOUX et al., 1993; HAZEN, THEISZ, HOWELL, 1999).

### 1.5 Manifestações clínicas

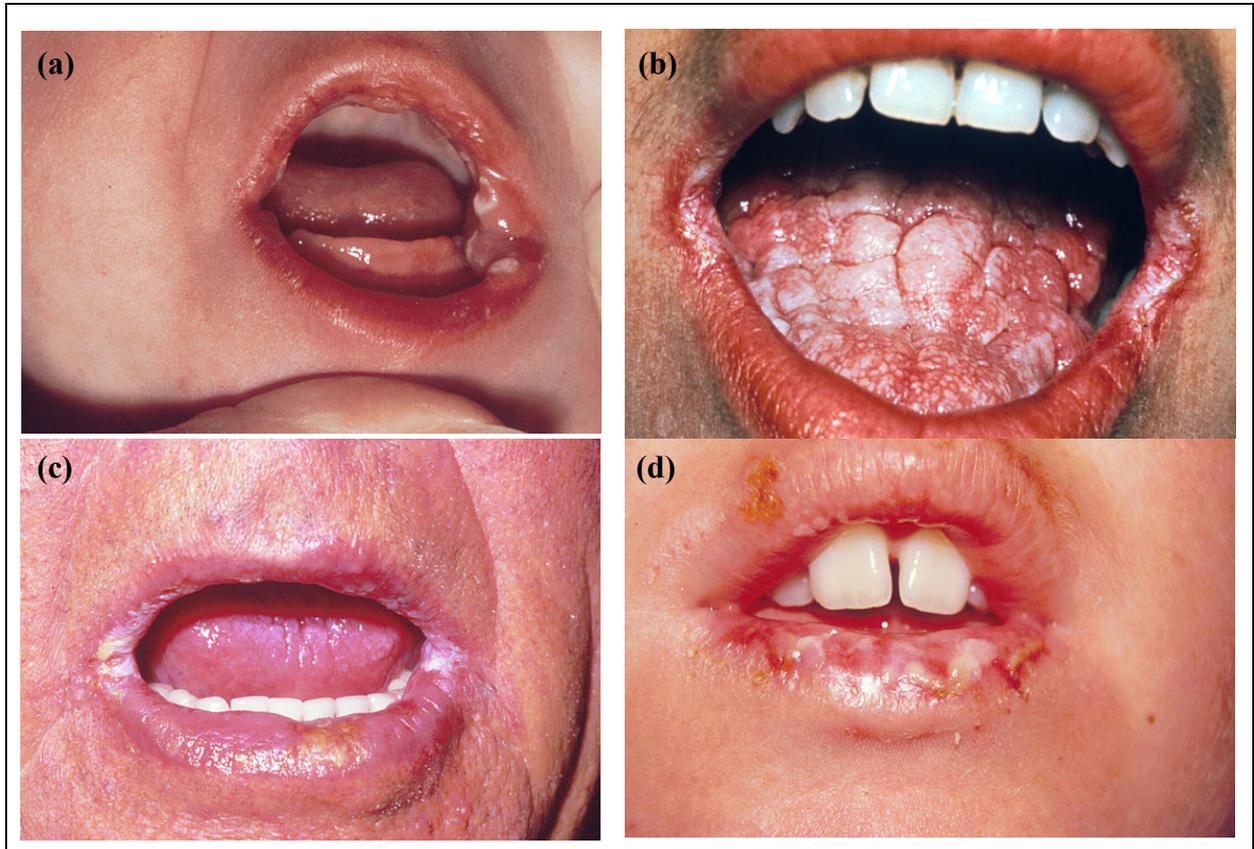
As formas clínicas podem ser divididas em cutâneo-mucosa, sistêmicas e alérgicas. Na candidíase mucosa, os tecidos mais atingidos são os do trato digestório e genitálias; na cutânea, as áreas intertriginosas da pele como virilhas, axilas e dobras da pele em geral, interdigitais das mãos, pés e unhas; na sistêmica, a infecção pode atingir diversos órgãos, causando candidíase pulmonar, candidemia, endocardite, nefrite, e outros, já a alérgica conhecida como candidíase, se caracterizam por diversos quadros onde se observa lesões cutâneas variando do tipo vesiculosas a eczematóides. Dependendo da localização, a candidíase pode se manifestar de diferentes formas (MENEZES et al., 2004).

#### 1.5.1 Candidíase oral

Desde o nascimento a cavidade oral é colonizada por leveduras do gênero *Candida*, principalmente *C. albicans*. Geralmente esses fungos habitam a mucosa bucal como leveduras saprófitas, constituindo parte da microbiota normal. Porém, sob determinadas condições, podem assumir a forma patogênica de micélio, induzindo o aparecimento de lesões que são frequentes em crianças ou pacientes imunodeprimidos (MENEZES et al., 2005).

A candidíase oral não é uma enfermidade mortal, mesmo que ao provocar alterações de diferentes níveis, compromete o paladar e a deglutição, levando a uma diminuição do apetite, principalmente nos casos de pacientes HIV positivos ou pacientes hospitalizados e idosos (Figura 5). A candidíase oral é a porta de entrada para complicações do tipo,

orofaríngeas, esofágicas, laringianas e sistêmicas (URIZAR, 2002; CORTÉS et al., 2004; PERAZZO et al., 2004).



**Figura 5: Candidíase oral.** (a) A cavidade oral dos recém-nascidos possui pH baixo, o que viabiliza a proliferação da *Candida*. Esta infecção foi adquirida provavelmente no momento do parto, devido à candidíase vulvovaginal durante a gravidez. Os sintomas clínicos persistem até o momento em que a microbiota oral for estabelecida no neonato. (b) Candidíase oral crônica com comprometimento da língua e queilite angular em adulto com imunodeficiência. (c) Queilite angular e fissuras causadas pela maceração do ângulo da boca em paciente idoso. (d) Queilite solar em paciente jovem com colonização nos lábios. Todas as formas de candidíase oral aqui foram por *C. albicans* e nota-se a pseudomembrana branco-amarelada formada por blastoconídios e pseudohifas (MICOLOGY ONLINE - The University of Adelaide).

A candidíase oral foi descrita como doença associada no primeiro caso de AIDS publicado, e constitui a infecção fúngica mais freqüente nos pacientes HIV positivos (LUPETTI et al., 1995; COOGAN, 2006). Considera-se que até 90% dos indivíduos infectados pelo HIV sofrerão pelo menos um episódio de candidíase orofaríngea (SÁNCHEZ-VARGAS, 2002; URIZAR, 2002).

A forma de pseudomembrana conhecida no Brasil com a denominação popular de “sapinho” é a apresentação mais conhecida, caracterizada por uma pseudomembrana de

coloração do branco ao creme que quando removida apresenta fundo avermelhado. No entanto, outras formas clínicas como a eritematosa e a queilite angular, associadas à *Candida*, são também freqüentes na atualidade (Figura 5) (URIZAR, 2002).

Espécies de *Candida* apresentam características acidogênicas e heterofermentativas particularmente sob condições ricas em carboidrato. O desenvolvimento da *Candida* na presença da saliva é acompanhado de um rápido declive no pH de 7,5 a 3,2 em 48 horas, e a maioria dos componentes ácidos da saliva como são piruvatos e acetatos mantêm este pH baixo (SÁNCHEZ-VARGAS, 2002).

A candidíase bucal pode ser causada por diferentes espécies do gênero *Candida* entre elas, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. inconspicua*, *C. guilliermondii*, dentre outras. A quantidade de leveduras na lesão é geralmente alta e, frequentemente, mais de uma espécie é isolada; neste caso, o papel de determinada espécie na etiologia da doença é de difícil avaliação (CANDIDO, AZEVEDO, KOMESU, 2000; SÁNCHEZ-VARGAS, 2002; URIZAR, 2002).

Extremos de idade (recém-nascidos e idosos); uso de próteses dentárias; tabagismo; alterações de barreira de mucosa; trocas de epitélio; alterações salivares; alterações hormonais, alterações nutricionais e imunológicas, são alguns dos fatores que predisõem a candidíase oral (URIZAR, 2002).

O tratamento da candidíase oral é simples nos pacientes imunocompetentes ou com imunodepressão leve, em que geralmente os antifúngicos tópicos apresentam resultados eficazes. No entanto, nos casos de imunodepressão o problema maior está na alta taxa de recorrências ou recidivas, requerendo a combinação de uma terapia intensiva tanto sistêmica como local. Em alguns casos se inclui propor a possibilidade de instaurar um tratamento profilático com derivados azólicos, como nos pacientes com HIV. Apesar dos excelentes resultados com antifúngicos azólicos orais, encontramos formas clínicas de candidíases orais crônicas rebeldes ao tratamento. A retirada dos fatores predisponentes combinada com derivados azólicos ou poliênicos como a nistatina é o principal tratamento (URIZAR, 2002).

### 1.5.2 Candidíase vulvovaginal

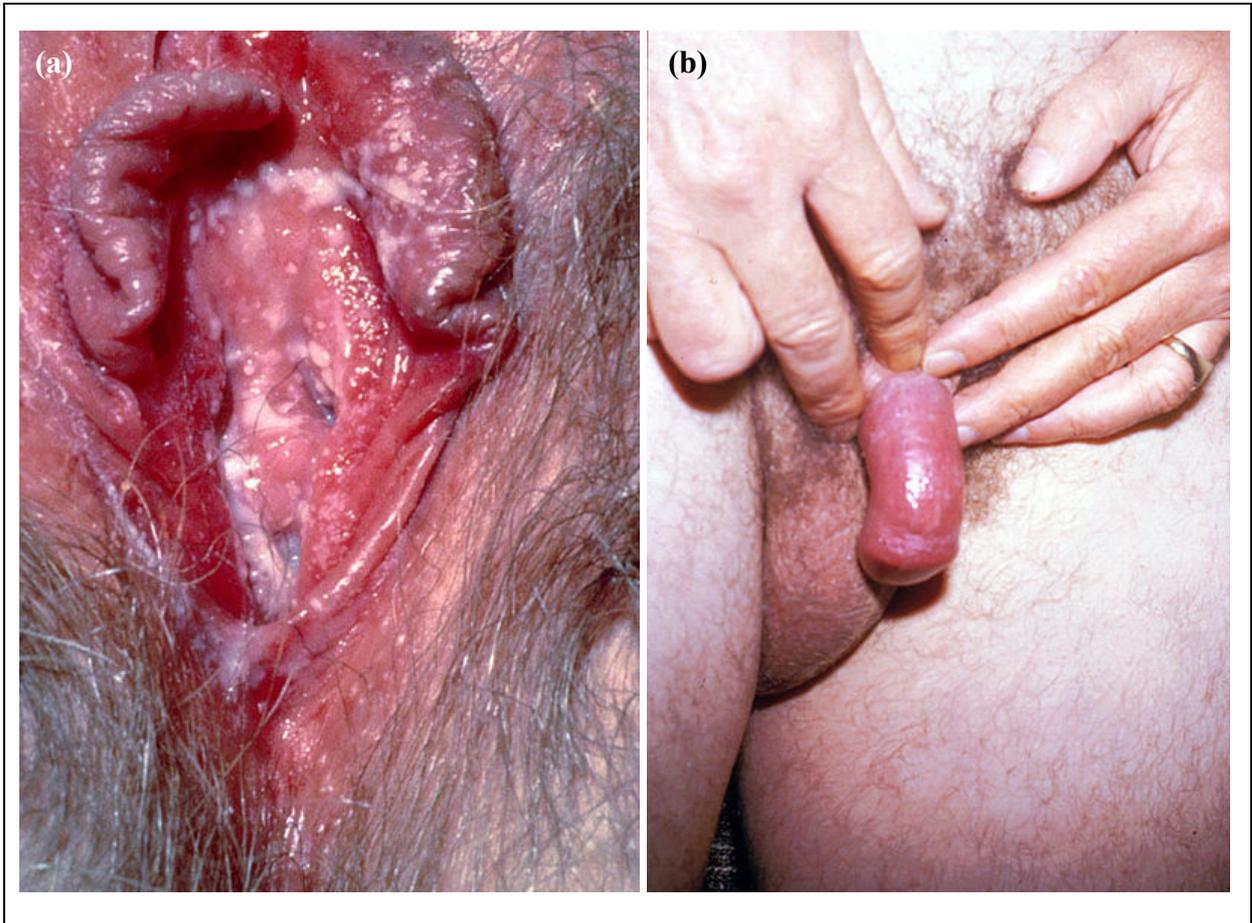
As micoses vulvovaginais foram descritas pela primeira vez por J. S. Wilkinson em 1949 ao estabelecer uma relação entre a existência de fungos na vagina com a aparição de vaginites. A partir desse momento os conhecimentos foram evoluindo progressivamente. Atualmente falamos de vulvovaginites micóticas por fungos leveduriformes já que não são todas as vaginites causadas por espécies pertencentes ao gênero *Candida*, condição que resulta em intensa coceira, odor, prurido, corrimento, ardor ao urinar, eritemas, dispareunia e desconforto vaginal (GEIGER, FOXMAN, GILLESPIE, 1995; NETO, HAMDAN, SOUZA, 1999; ZIARRUSTA, 2002).

*C. albicans* é a mais importante espécie de levedura encontrada no trato genital feminino. Em torno de 20 a 25% das mulheres sadias e completamente sem sintomas são positivas para culturas de *C. albicans* (Figura 6a). Cerca de 75% das mulheres adultas tiveram episódios de candidíase vaginal durante a vida, com prevalência de *C. albicans* de 70 a 90%, e algumas dessas pacientes, cerca de 5% ainda apresentarão episódios de recorrência. A recorrência na candidíase vulvovaginal também denota como infecção secundária de outras enfermidades como diabetes mellitus, imunodepressão, terapia hormonal exógena e AIDS (CARDONA-CASTRO et al., 2002; SHINOBU et al., 2007).

*C. glabrata* está entre 5 a 15% de casos de segunda espécie mais freqüente nas candidíases vulvovaginais. Outras espécies detectadas em infecções ginecológicas com menos frequência são *C. tropicalis*, *C. kefyr* e *C. krusei*. Neste sentido e durante os últimos anos se vem observando um aumento de detecção de espécies não-*albicans* em uma maior taxa de recorrências dos episódios vulvovaginais, e isto se devem ao fato pela generalização de terapias inadequadas. A erradicação de *C. albicans* pode causar uma seleção de espécies como *C. glabrata*, resistente a diferentes agentes de uso comum (ZIARRUSTA, 2002).

Traumas de mucosa determinandos pela atividade sexual, diferentes tipos de proteção menstrual e substâncias de higiene íntima, uso contínuo de roupas apertadas, peças íntimas de tecidos sintéticos, gravidez, anticoncepcionais orais e o dispositivo intra-uterino (DIU), dentre outros, são alguns dos fatores predisponentes para as candidíases vulvovaginais (FOXMAN, 1990; OKUNGBOWA, ISIKUHEMHEN, DEDE, 2003).

A candidíase vulvovaginal é usualmente tratada com derivados imidazólicos tópicos ou sistêmicos, entretanto, é indispensável à remoção dos fatores predisponentes e que o tratamento seja estendido ao seu parceiro (ZIARRUSTA, 2002).



**Figura 6: Candidíase vulvovaginal (a) e balanite (b) causadas por *C. albicans*.** (MICOLOGY ONLINE - The University of Adelaide).

### 1.5.3 Balanite

A balanite (ou balanopostite, inflamação aguda ou crônica da glândula do pênis) (Figura 6b) pode ser assintomática, com apenas uma leve coceira, ou sintomática iniciando-se com vesículas no pênis que evoluem nos casos intensos, gerando placas pseudomembranosas, generalizado eritema, intensa coceira, dor, fissuras, erosões, pústulas superficiais na glândula e no sulco balanoprepucial. As lesões podem se estender ao escroto e pregas da pele, com presença de prurido, e em alguns casos causar uma uretrite transitória. *C. albicans* é espécie

isolada com maior frequência. Existem diversos fatores que predispõem aos pacientes a desenvolver a balanite como relações sexuais com o parceiro infectado, recente terapia antibiótica, o descontrole na diabetes mellitus, e comumente em homens não circuncidados (WAUGH et al., 1978; STARY et al., 1996).

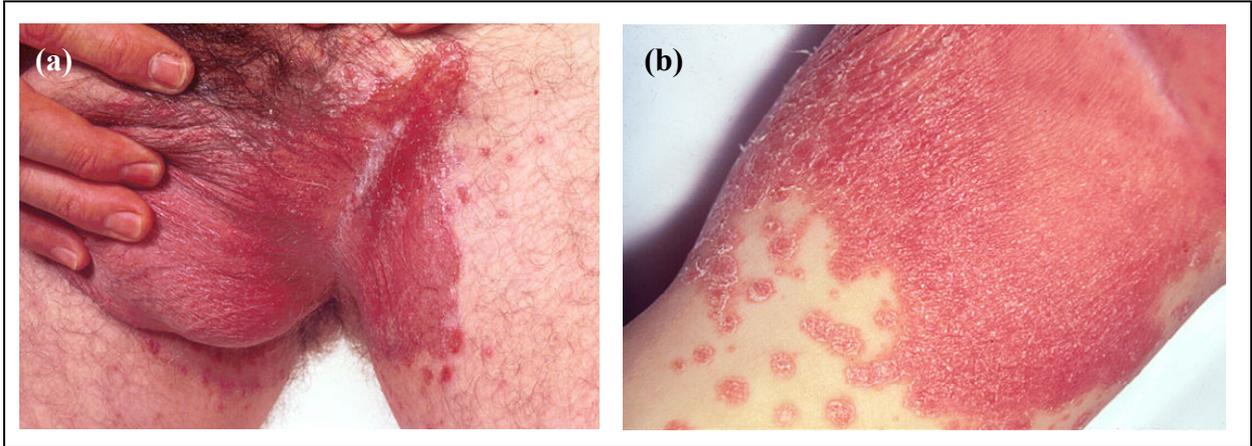
O tratamento convencional da balanite consiste em aplicações tópicas com derivados azólicos e poliênicos num período de uma a duas semanas. Agentes tópicos são complicados pelo contato com a roupa, o que pode levar ao não cumprimento do tratamento pelo paciente. Uma alternativa à terapia tópica seria por via oral, pois terapias orais tendem a bons resultados, e o completo cumprimento da mesma é mais acessível ao paciente do que os por agentes tópicos (STARY et al., 1996).

#### 1.5.4 Candidíase cutânea

Espécies do gênero *Candida* são frequentemente encontradas como sapróbios colonizando superfícies de certas membranas e mucosas no homem. Uma variedade de fatores locais e sistêmicos predispõe a infecções fúngicas superficiais. A candidíase cutânea frequentemente ocorre quando há condições de umidade e temperatura, como as dobras da pele, embaixo das fraldas de recém nascidos, e em climas tropicais ou durante meses de verão. Diabetes mellitus e o HIV também estão associados à candidíases cutâneas. A candidíase cutânea aguda pode se apresentar de diferentes formas: intertrigo, localizado nas dobras da pele como axilas, virilha, sulco interglúteo, prega submamária, e em pessoas obesas na prega suprapúbica produzindo intenso eritema, edema, exudado purulento e pústulas; erosão interdigital (Figuras 7 e 8); foliculite determinada pela infecção do folículo piloso principalmente em pacientes com HIV; onicomicose e paroníquia que descreveremos melhor adiante (YOSIPOVITCH et al., 1993; WAGNER, SOHNLE, 1995; GONZÁLES et al., 1998; OKEKE, TSUBOI, OGAWA, 2001).



**Figura 7: Candidíase cutânea.** (a) Lesões em satélites eritematosas típicas em candidíase cutânea. (b) Candidíase interdigital em dedos dos pés. (c) Candidíase interdigital entre os dedos das mãos, condição desenvolvida por pessoas que comumente estão com suas mãos molhadas. (d) Candidíase cutânea em criança secundária a dermatite seborréica, devido à falta de higiene, umidade e demora na troca de fraldas. Em muitos casos esta condição se dissemina para axilas, face, conjuntivas e outras áreas. *C. albicans* foi isolada nestes casos (MICROLOGY ONLINE - The University of Adelaide).



**Figura 8: Intertrigo.** (a) Lesão intertriginosa na virilha. (b) Intertrigo entre o joelho. Notar as extensas regiões eritematosas com distintas bordas e diversas lesões em satélite causadas por *C. albicans* (MICROLOGY ONLINE - The University of Adelaide).

Em alguns casos infecções superficiais podem se tornar severas e de difícil tratamento, produzindo raramente uma desordem conhecida como candidíase mucocutânea crônica, condição caracterizada principalmente pela deficiência de células T “helper”. Situação que consiste em persistentes e recorrentes infecções das membranas mucosas, couro cabeludo, pele e unhas, com uma variedade de manifestações (Figura 9). Infecções orais e vaginais por *Candida* são comumente encontradas em pacientes com candidíase mucocutânea crônica. As típicas lesões na pele são geralmente avermelhadas, sobressaltadas, e com hiperqueratinização e usualmente não gera dor. Microabscessos na epiderme são comuns na candidíase cutânea aguda, porém raros na candidíase mucocutânea crônica. O envolvimento da unha pode ser severo nesta condição, produzindo acentuado engrossamento, distorção e fragmentação da unha, com inchaço crônico da falange distal (OYEFARA et al., 1994; WAGNER, SOHNLE, 1995).

O papel da imunidade celular no controle da infecção causada por *Candida* tem sido bem demonstrado em modelos experimentais nos quais a dicotomia da resposta imune do tipo CD4<sup>+</sup> (Th1 e Th2) é considerada um fator importante para a suscetibilidade ou resistência à infecção por *Candida*. Enquanto uma resposta tipo Th1 com produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 está relacionada com a resistência à *Candida*, a resposta tipo Th2, com secreção de IL-4, IL-5 e IL-10, está relacionada com suscetibilidade a este patógeno (CARVALHO et al., 2003).



**Figura 9: Candidíase mucocutânea crônica.** (a) Granuloma por *C. albicans* na testa e queilite angular em paciente do sexo feminino jovem com candidíase mucocutânea crônica. Notar lesões espessas crostosas no couro cabeludo e testa. (b e c) Candidíase crônica, onicomicose em unhas de polegares com destruição de tecido. (d) Criança com candidíase superficial crônica que compreende região da boca e conjuntiva, onde se observam lesões eritematosas com bordas definidas. (e) Candidíase crônica em couro cabeludo de criança com imunodeficiência (MICOLOGY ONLINE - The University of Adelaide).

Pacientes com candidíase mucocutânea crônica raramente desenvolvem infecções disseminadas ou invasivas por *Candida* ou outros microrganismos, mas alguns pacientes são observados com susceptibilidade de infecções por organismos como *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus*

*neoformans*, vírus do herpes e herpes zoster. A candidíase mucocutânea crônica também está associada com endocrinopatias e fenômenos auto-ímmunes, como o hipoparatiroidismo, hipotireoidismo, e anemia hemolítica auto-ímmune (KOBRYNSKI et al., 1996; LILIC et al., 2003).

Leveduras do gênero *Candida* são comumente encontradas nas unhas. *Candida albicans* é o patógeno mais comum, sendo *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* são encontradas com menor frequência. As leveduras do gênero *Candida* podem comportar-se como patógeno primário, invadindo a unha normal principalmente em pacientes com candidíase mucocutânea crônica e pacientes imunodeprimidos. Já em pacientes imunocompetentes, frequentemente são patógenos secundários, invadindo a unha previamente alterada por trauma, hiper-hidratação ou irritação por contato com substâncias químicas. Esses casos apresentam-se clinicamente como onicólise ou paroníquia. Podem também atuar como patógenos secundários em unhas acometidas por psoríase e líquen plano e por outras dermatoses (CROCCO et al., 2004).

A candidíase cutânea congênita, por espécies do gênero *Candida*, se apresenta nos primeiros dias de vida do recém nascido. Dentre as principais lesões na pele destacamos: erupções generalizadas; extensas regiões eritematosas (presentes em achados iniciais); vesículas, pápulas e pústulas (lesões de morfologias variadas que representam diferentes estágios de evolução, e que geralmente coexistem). Na maioria dos casos quase toda extensão do recém nascido é tomada de lesões, porém regiões como as costas, extremidades (palma das mãos e sola dos pés) e dobras da pele, são as áreas mais acometidas. O principal fator que gera a candidíase cutânea congênita é a candidíase vulvovaginal na mulher durante a gravidez. A candidíase cutânea congênita pode evoluir para uma forma disseminada, forma esta que gera muitas mortes de recém nascidos (Figura 10) (DARMSTADT, DINULOS, MILLER, 2000).

Nos pacientes com candidíase cutâneo-mucosa, várias medidas em conjunto são aventadas para controle da infecção, dessa forma, deve-se utilizar antifúngicos tópicos e sistêmicos, associados a medidas que visam a melhorar a imunidade celular. Cada caso deve ser analisado individualmente para que se possa ter boa conduta terapêutica (SIDRIM, ROCHA, 2004).



**Figura 10: Candidíase generalizada por *C. albicans* em recém-nascidos.** Notar o comprometimento de extensa região do corpo, principalmente dobras de pele como virilha, axila, pescoço, fossa cubital e múltiplas lesões em satélite (MICROLOGY ONLINE - The University of Adelaide).

### 1.5.5 Onicomicose e paroníquia

Onicomicose (unha enrijecida, dolorida e por vezes esponjosa) é considerada a mais frequente doença associada à unha, e paroníquia (enrijecimento da pele de coloração parda a avermelhada) é também uma das mais comuns enfermidades dermatológicas (Figura 11). Ambas, paroníquia e onicomicose, predominantemente afetam mulheres e nas mãos, onde que comumente está exposta a traumas de trabalho (governantas, empregadas, lavadeiras, cozinheiras, dentre outras). O termo onicomicose está associado à infecção fúngica primária causada por patógenos que invadem a unha sã ou associada à pacientes com lesões pré-existentes na unha. A invasão da unha pode ser distinguida da colonização do espaço subungueal, onde os organismos não afetam a queratina da unha. Por vezes a diferença entre ser infecção primária ou secundária não é completamente clara, dermatófitos são geralmente considerados patógenos primários neste caso. A onicomicose por leveduras costuma se

associar a infecções cutâneas, paroníquias e candidíase mucocutânea crônica, sendo muitas vezes considerada infecção secundária. Entretanto, espécies de *Candida* tem tido importância significativa, considerada patógeno primário em onicólise de unhas das mãos, particularmente em portadores de doença vascular periférica e síndrome de Cushing. Todavia, se tem observado muitas formas de infecções na unha não associadas à candidíases cutâneo-mucosas ou paroníquia (HILMIOGLU-POLAT et al., 2005; SIMONETTI et al., 2004; MARTINS et al., 2007; SOUZA et al., 2007).



**Figura 11: Onicomicose e paroníquia.** (a) Dedo da mão. (b) Dedos dos pés, melhor evidenciação nos hálux (hiperceratose). (c) Paroníquia por *Candida* resultando em inflamação da região ungueal e distrofia irregular da unha (seta) (DORKO et al., 2002; JAYATILAKE, TILAKARATNE, PANAGODA, 2009).

Atualmente, a onicomicose envolve mais comumente as unhas dos dedos dos pés em comparação com as das mãos, salvo nas infecções por *Candida* (ARENAS, RUIZ-ESMENJAUD, 2004).

É relevante ressaltar que a presença de *Candida*, nem sempre está associada com o desenvolvimento de onicomicose, já que está presente na microbiota normal. Cabe ao médico fazer a avaliação clínica adequada, bem como a investigação dos fatores predisponentes. Junto a isso, o exame laboratorial deve ser realizado seguindo todos os critérios de inclusão para identificação do agente causador e seu adequado tratamento (SOUZA et al., 2007).

A onicomicose pode exercer impacto adverso importante na qualidade de vida dos indivíduos afetados, causando redução da auto-estima e possivelmente afetando o potencial de trabalho. As unhas, como componente da extremidade dos dedos, são parte integrante da estrutura sensorial da mão. A perda da margem livre das unhas pode reduzir drasticamente a capacidade sensorial dos dedos, com conseqüente limitação da destreza manual. A onicomicose do pé pode causar dor e desconforto, tornando difícil permanecer em pé, andar e praticar esportes. A infecção pode também resultar em prejuízo significativo para a saúde geral, a aparência física e o desempenho social. A onicomicose pode ter conseqüências psicológicas importantes, incluindo-se constrangimento constante, depressão, ansiedade, preocupação com aparência e receio de situações íntimas (ARAÚJO et al., 2003).

DORKO et al. (2002), em investigação de espécimes oriundas de 108 unhas de um total de 41 pacientes (20 mulheres e 21 homens) examinados durante três anos, constataram alta incidência de onicomicose nas unhas das mãos em 75% das mulheres e 71% das unhas dos pés para homens. A faixa etária dominante foi em pacientes entre 50 e 70 anos de idade, e as espécies causadoras de onicomicoses foram *C. albicans* 60,9%, *C. parapsilosis* 19,6%, *C. tropicalis* 9,8%, *C. krusei* 4,9% e *C. guilliermondii* e *C. zeylanoides* com 2,4% cada.

MIRANDA et al. (2005) durante o ano de 2003 coletaram material biológico de diferentes regiões do corpo de pacientes do Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Goiás para a identificação das espécies do gênero *Candida*, obtendo 190 destas leveduras das quais *C. albicans* 63,2%, *C. parapsilosis* 14,2%, *C. tropicalis* 9,5%, *C. kefyr* 7,9%, *C. guilliermondii* 2,6%, *C. rugosa* 1,6% e *C. krusei* e *C. lusitaniae* com 0,5% cada. O estudo também demonstrou uma predominância em quirodáctilos com 42,1% e pododáctilos

com 42,6%, dentre outros achados em virilhas. E concluíram demonstrando um aumento de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* como agentes de candidíase não-*albicans* como patógenos emergentes.

MARTINS et al. (2007), em um estudo epidemiológico e micológico no Hospital Escola de São José do Rio Preto, observaram que em 84% dos casos, a unha dos pododáctilos correspondeu à área mais afetada, e *C. parapsilosis* foi mais prevalente em distrofia total e/ou área distal lateral enquanto que *C. albicans*, segundo agente mais comum, afetou principalmente o leito ungueal e matriz proximal. Em quirodáctilos, *C. parapsilosis* e *C. albicans* originaram-se de acometimento distal lateral e distrofia total. E de acordo com a ocorrência de fungos leveduriformes (142 casos) dentre as espécies de *Candida* foram encontradas, *C. parapsilosis* 47%, *C. albicans* 20%, *C. guilliermondii* 9%, *C. tropicalis* 7%, *C. krusei* e *C. zeylanoides* com 1,2% cada.

SOUZA et al. (2007), em estudo de onicomicoses por leveduras em Maringá, Paraná, observaram um alto número de onicomicoses por leveduras, dentre elas 11 espécies do gênero *Candida*, *C. parapsilosis* 44,61%; *C. tropicalis* 21,59%; *C. albicans* 14,78%; *C. glabrata* 3,98%; *C. guilliermondii* 2,52%; *C. lusitaniae* 0,85%; *C. famata* 0,57%; *C. krusei* 0,57%; *C. lipolytica* 0,28%; *C. rugosa* 0,28%; e *C. stellatoidea* 0,28%. O estudo ainda mostrou a prevalência para o gênero feminino e para os quirodáctilos.

GODOY-MARTINEZ et al. (2009) entre julho de 1996 e dezembro de 1999, na Divisão de Dermatologia e Micologia EPM/UNIFESP, coletaram amostras de 588 pacientes com suspeita de onicomicose, porém com diagnóstico confirmado para 247. Entre dermatófitos, outros filamentosos e leveduras, esta última correspondeu a 52% dos casos com 47,3% correspondendo a espécies do gênero *Candida*. O estudo mostrou uma predominância nas unhas das mãos do sexo feminino, e as espécies encontradas foram *C. albicans* 18,3%, *C. parapsilosis* 13,7%, *Candida spp.* 6,3%, *C. guilliermondii* 4,6%, *C. tropicalis* 2,9%, *C. lusitaniae*, *C. rugosa* e uma mista de *C. albicans* com *C. parapsilosis* com 0,5% cada.

Enfermidades metabólicas crônicas como diabetes, câncer, perturbações circulatórias periféricas, algumas afecções cutâneas como psoríase, fatores genéticos, prática de natação, duchas comunitárias, infecções micóticas não ungueais dos pés e das mãos, traumatismos, uso de calçados apertados e de material sintético, principalmente em praticantes de esporte,

imunodeficiências, envelhecimento, formas e estilos de vida são alguns dos fatores predisponentes a onicomicoses. Profissão, clima, disfunção hormonal, dentre outros, são ditos como fatores de manutenção das onicomicoses (ARRESE, VALVERDE, PIERARD, 2005; CHANUSSOT, ARENAS, 2007, MARTINS et al., 2007).

As onicomicoses são difíceis de tratar por fatores intrínsecos da própria unha, e isto se resume que nem todos os agentes causadores são sensíveis as mesmas drogas ou, no melhor dos casos, é preciso um esquema de tratamento diferenciado. Alto custo devido ao longo tratamento e recidivas em função do insucesso terapêutico são outros fatores de dificuldade associados à onicomicose. O tratamento muitas vezes é moroso, sobretudo em pacientes que não removem causas predisponentes, como atividades laborais que molham constantemente as unhas comprometidas. Derivados imidazólicos, nistatina e medicação antibacteriana, quando bactérias associadas, dão bons resultados em intervalo de 2 a 6 meses (ESCOBAR, CARMONA-FONSECA, 2003; SIDRIN, ROCHA, 2004; SOUZA et al., 2007).

#### 1.5.6 Candidíase hematogênica

Existem várias evidências e trabalhos que sugerem que a disseminação desta levedura por via sanguínea é um grande problema na maioria dos hospitais em todo o mundo. A candidemia é observada particularmente entre pacientes hospitalizados por longos períodos que são expostos a antibióticos, terapias imunodepressivas, nutrição parenteral, e a procedimentos invasivos múltiplos. A fungemia por *Candida* é geralmente difícil de diagnosticar, o tratamento é de alto custo e existe uma alta taxa de mortalidade (COLOMBO et al., 2006, TUMBARELLO et al., 2007).

Dentre as manifestações clínicas, a febre é a mais comum, porém as infecções podem tomar diversas formas e localizações principalmente pneumonia, endocardites, artrite, osteomielites, miosites, peritonites, meningites e septicemia, dentre outras (COLOMBO et al., 2006).

SANDVEN et al. (2006), em um estudo entre 1991 e 2003, na Noruega, com um total de 1.415 casos de candidemia encontraram *C. albicans* 69,8%; *C. glabrata* 13,2%; *C. tropicalis* 6,7%; *C. parapsilosis* 5,8%; *C. krusei* 1,6%; *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* e *C.*

*norvegensis* com 0,6% cada; *C. kefyr* 0,5% e outras espécies (*C. blankii*; *C. inconspicua*; *C. lusitaniae*; *C. sake* e *C. sphaerica*) que juntas deram 0,5%. O estudo ainda mostrou que os pacientes mais acometidos eram os com menos de um ano de vida e aqueles com mais de 60 anos.

Há variações geográficas significativas no padrão etiológico de infecções invasivas por *Candida* spp. documentadas em diferentes países. Enquanto na América do Norte nota-se o predomínio de *C. glabrata* entre as espécies não-*albicans*, na América do Sul, observa-se predomínio de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (COLOMBO, GUIMARÃES, 2003).

Nos últimos 10 anos, alguns estudos têm reportado uma mudança na etiologia das candidemias. Enquanto que *C. albicans* é ainda considerada a espécie mais comum causadora de candidemias, o aumento das taxas de candidemia por *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei* é mencionada em todo o mundo. A razão para a emergência de espécies não-*albicans* não está ainda completamente entendida, mas algumas condições médicas podem possuir impacto no risco de se desenvolver a candidemia por estas espécies. Enquanto que *C. parapsilosis* é responsável por candidemias não-*albicans* mais frequentes em uso de cateteres e nutrição parenteral, *C. tropicalis* está mais associada com câncer e pacientes neutropênicos, e *C. krusei* e *C. glabrata* estão mais associadas com prévia exposição de azólicos (COLOMBO et al., 2006).

Tratamento com antibióticos de amplo espectro, quimioterapia para o câncer, formação de biofilmes, transplantados, uso de cateteres, alimentação parenteral, colonização do trato digestivo, neutropenia, HIV, dentre outros, são alguns dos fatores predisponentes a fungemia por espécies do gênero *Candida* (VIGOURUX et al., 2006; TUMBARELLO et al., 2007).

O isolamento de espécies do gênero *Candida* do sangue não é somente uma das dificuldades envolvidas no diagnóstico micológico, culturas sanguíneas são, todavia, frequentemente negativas em pacientes com infecções sistêmicas por leveduras. Diversas espécies de *Candida* isoladas do sangue possuem um padrão de sensibilidade a anfotericina B e ao fluconazol, dois antifúngicos mais comuns no tratamento da infecção invasiva por *Candida*. A maioria das espécies de *Candida* é sensível a anfotericina B (associada ou não a 5-fluorocitosina). O Fluconazol também é ativo contra a maioria das espécies de leveduras,

porém existem algumas exceções como os isolados de *C. krusei* e *C. norvegensis* que são resistentes e alguns de *C. glabrata* que possuem a sensibilidade reduzida. A correta identificação da espécie e a prova de susceptibilidade para antifúngicos são informações necessárias no que se refere à provável sensibilidade no tratamento das candidemias (SANDVEN, 2000).

## 1.6 Candidídes

As candidíases alérgicas caracterizam-se por apresentarem lesões cutâneas do tipo vesiculosas, papulosas e/ou eczematóides estéreis, sobretudo nos espaços interdigitais das mãos ou em outras partes do corpo determinadas por hipersensibilidade tipo I, que desaparecem com o tratamento do local afetado pela *Candida*. Diversos fatores condicionam o aparecimento dessas candidídes, tais como a irritação do foco por medicação inadequada e a intradermorreação por candidina. Nesses quadros, preconiza-se a utilização de drogas antifúngicas para tratamento do foco primário (quando este é evidente) assim sendo, uma terapêutica com corticosteróides tópicos, nas regiões onde são observadas as candidídes, pode ser associada (LACAZ et al., 2002; SIDRIM, ROCHA, 2004).

## 1.7 Infecções mistas

Infecções mistas por espécies do gênero *Candida* são encontradas mais facilmente em indivíduos imunodeprimidos (HIV) e hospitalizados. Semelhanças entre espécies podem não evidenciar tal fato, mas espécies bem mais facilmente distinguíveis podem ser encontradas em diferentes combinações em onicomicoses, candidíases orais, fungemias, dentre outras (KALCANCI et al., 2005; LI, REDDING, DONGARI-BAGTZOGLOU, 2007; RODRIGUES et al., 2007; LIMA et al., 2008).

KALCANCI et al. (2005) relataram um caso de paciente (18 anos de idade) do sexo masculino hospitalizado com leucemia linfoblástica aguda, com raios-X normal, apresentou febre nos primeiros dias no hospital, observou-se células leveduriformes na cultura sanguínea. A levedura foi identificada como *C. kefyr* por métodos convencionais como testes de tubo germinativo, morfologia no meio “corn meal” e assimilação de carboidratos. Uma semana

depois o raio-X e a tomografia computadorizada revelaram uma cavidade fúngica no pulmão direito, que com lavado broncoalveolar revelou-se no meio Sabouraud a presença de *C. dubliniensis*. Foram feitos testes de antifúngicos, e passado um mês de tratamento o paciente veio a falecer por hemorragia intracraniana.

RODRIGUES et al. (2007) avaliaram as espécies de *Candida* e suas sensibilidades antifúngicas na mucosa orofaríngea em 52 portadores de HIV e 52 não portadores de HIV, residentes na região Nordeste Paulista. A taxa de isolamento de *Candida* foi significativamente maior no grupo com HIV (76,9%) que no grupo controle (50%). Foram isoladas cerca de 79% de amostras de *C. albicans* e 21% de não-*albicans*, nos dois grupos estudados. As amostras de *Candida* não-*albicans* isoladas a partir da mucosa oral dos pacientes com HIV foram: duas cepas de *C. dubliniensis*, duas de *C. krusei*, duas de *C. inconspicua*, duas de *C. tropicalis*, uma de *C. guilliermondii*, e uma de *C. famata*. Já no grupo controle, as cepas de *Candida* não-*albicans* foram: três de *C. glabrata*, uma de *C. famata*, uma de *C. tropicalis* e uma de *C. parapsilosis*. No grupo controle, três indivíduos (7%) apresentaram dupla colonização, de dois deles foram isoladas amostras de *C. glabrata* e *C. albicans*, enquanto que um terceiro apresentou *C. parapsilosis* e *C. albicans*. Já no grupo com HIV sete indivíduos (14%) apresentaram diferentes combinações de espécies configurando dupla colonização: dois deles portavam *C. albicans* e *C. inconspicua*, um *C. albicans* e *C. guilliermondii*, um *C. albicans* e *C. dubliniensis*, um *C. krusei* e *C. dubliniensis*, um *C. albicans* e *C. krusei* e, um último *C. albicans* e *C. famata*. Todas as amostras obtidas foram sensíveis a anfotericina B, enquanto uma de *C. albicans* foi resistente a todos os derivados azólicos testados (fluconazol, cetoconazol e itraconazol).

LIMA et al. (2008) relataram um caso de paciente do sexo feminino (41 anos), e HIV positivo. A paciente apresentava onicomicose distrofia parcial com paroníquia crônica e já havia feito uso de fluconazol para tratamento de candidíase oral. No exame microscópico direto de escamas ungueais das mãos, foram observadas células de leveduras arredondadas, blastosporadas, hialinas e pseudohifas; em cultura após crescimento, duas espécies de *Candida* foram identificadas como *C. albicans* e *C. tropicalis*. Ambas as espécies apresentaram resistência ao fluconazol e ao itraconazol. O Trabalho mostrou que peculiaridades apresentadas por diferentes espécies de *Candida* justificam a necessidade de se identificar leveduras ao nível de espécies, bem como determinar o perfil de sensibilidade aos

antifúngicos, com a finalidade de orientar uma melhor abordagem terapêutica e minimizar a exposição desses pacientes a condições de risco de uma infecção disseminada.

## 1.8 Biofilmes

Nosso conhecimento clássico de percepção de microrganismos como uma forma de vida unicelular está baseada em culturas simples e em seu modo de crescimento, desde microrganismos em suspensão que podem ser diluídos em células individuais e estudados em cultura líquida, onde esses modelos de desenvolvimento são tradicionais e predominantes no estudo da fisiologia e patogênese microbiana em pesquisas de laboratório. Todavia, muitos microrganismos em seus sítios naturais são encontrados no ecossistema formando o que chamamos de biofilmes, aderidos às superfícies e não agindo como um organismo livre. Esses biofilmes são definidos como uma estrutura microbiana comunitária que adere a superfícies e ficam revestidos em uma matriz de material exo-polissacarídico. Isso tem significado especial já que a proporção da formação de biofilmes em infecções em humanos é bem significativa (RAMAGE et al., 2005; DURÁN et al., 2007).

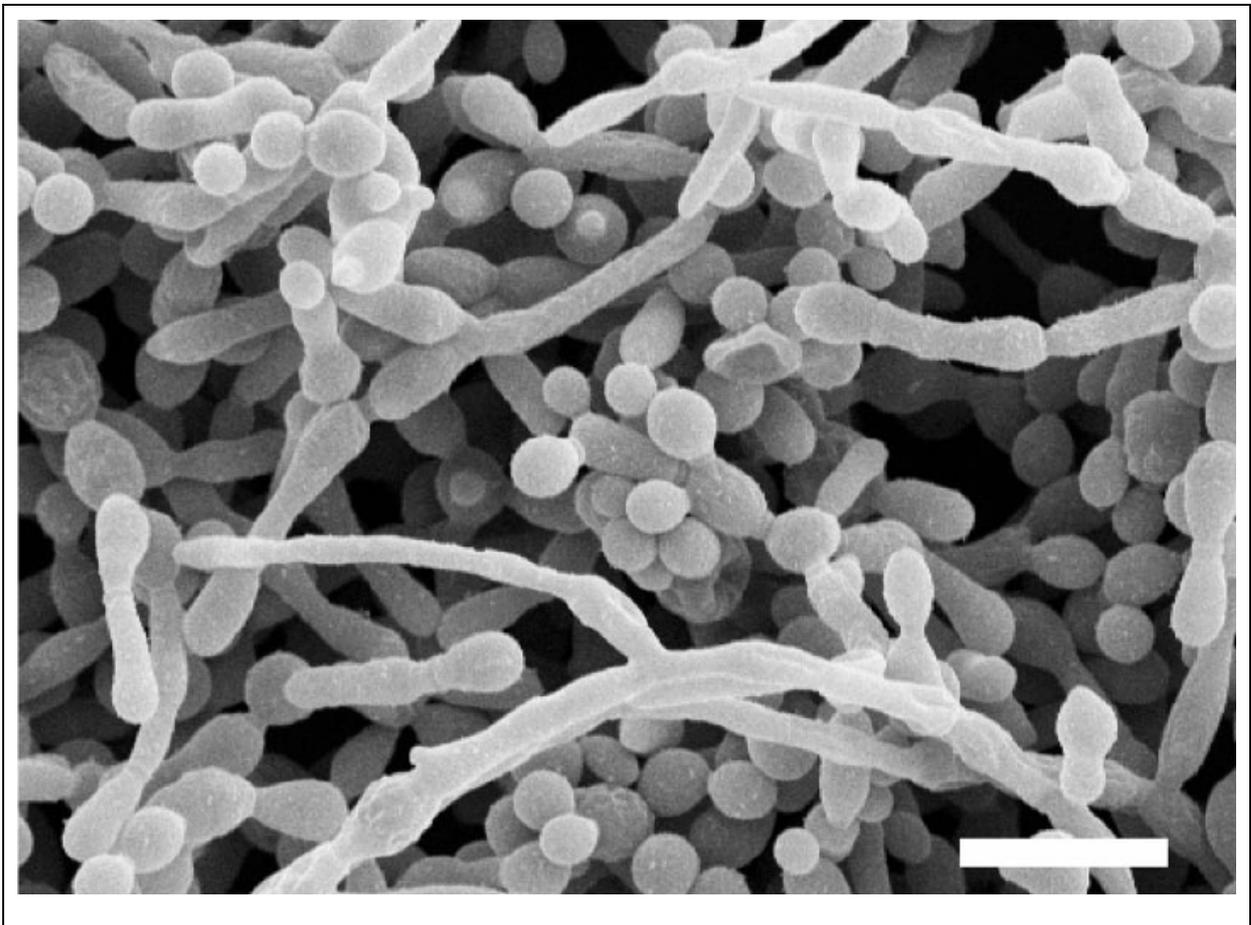
A maioria das informações da formação de biofilmes de *Candida* provém de experimentos com uma variedade de substratos (plástico, acrílico, poliestireno, substratos de germânio, celulose), e dentaduras, próteses em geral, implantes, tubos endotraqueais, cateteres, dentre outros, são alguns exemplos de estruturas que podem ser colonizadas por biofilmes de *Candida* (RAMAGE et al., 2001; RAMAGE et al., 2005).

Isolados de *C. parapsilosis*, *C. kefyr* e *C. glabrata*, dentre outras, possuem menor desenvolvimento de biofilme comparado com *C. albicans*. Por outro lado, tem-se reportado que espécies não-*albicans*, particularmente *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, podem produzir uma quantidade significativa de biofilme quando em presença de glicose. Esta habilidade pode ser requerida quando em pacientes que recebem nutrição parenteral, onde a concentração de glicose é geralmente elevada (DOUGLAS, 2002; WEBER et al., 2008).

KUHN et al. (2002) comparando os biofilmes de *C. albicans* com *C. parapsilosis*, observaram que *C. albicans* produz mais biofilme que outras espécies de *Candida*, e sob microscopia óptica, *C. albicans* possui uma diferença na morfologia do biofilme em contraste

com outras espécies, consistindo em uma camada basal de blastoconídios com uma densa matriz composta de exo-polissacarídeos e hifas. Em contraste, o biofilme de *C. parapsilosis* possui menor volume e é composto exclusivamente de grupos de blastoconídios.

Em biofilmes encontramos leveduras, hifas verdadeiras e pseudohifas (Figura 12). A habilidade de formar biofilmes está intimamente associada com a capacidade de causar infecções, e pode ser considerado um importante fator de virulência, pois biofilmes estão associados à resistência contra o sistema imune do hospedeiro e a antifúngicos (RAMAGE et al., 2005).



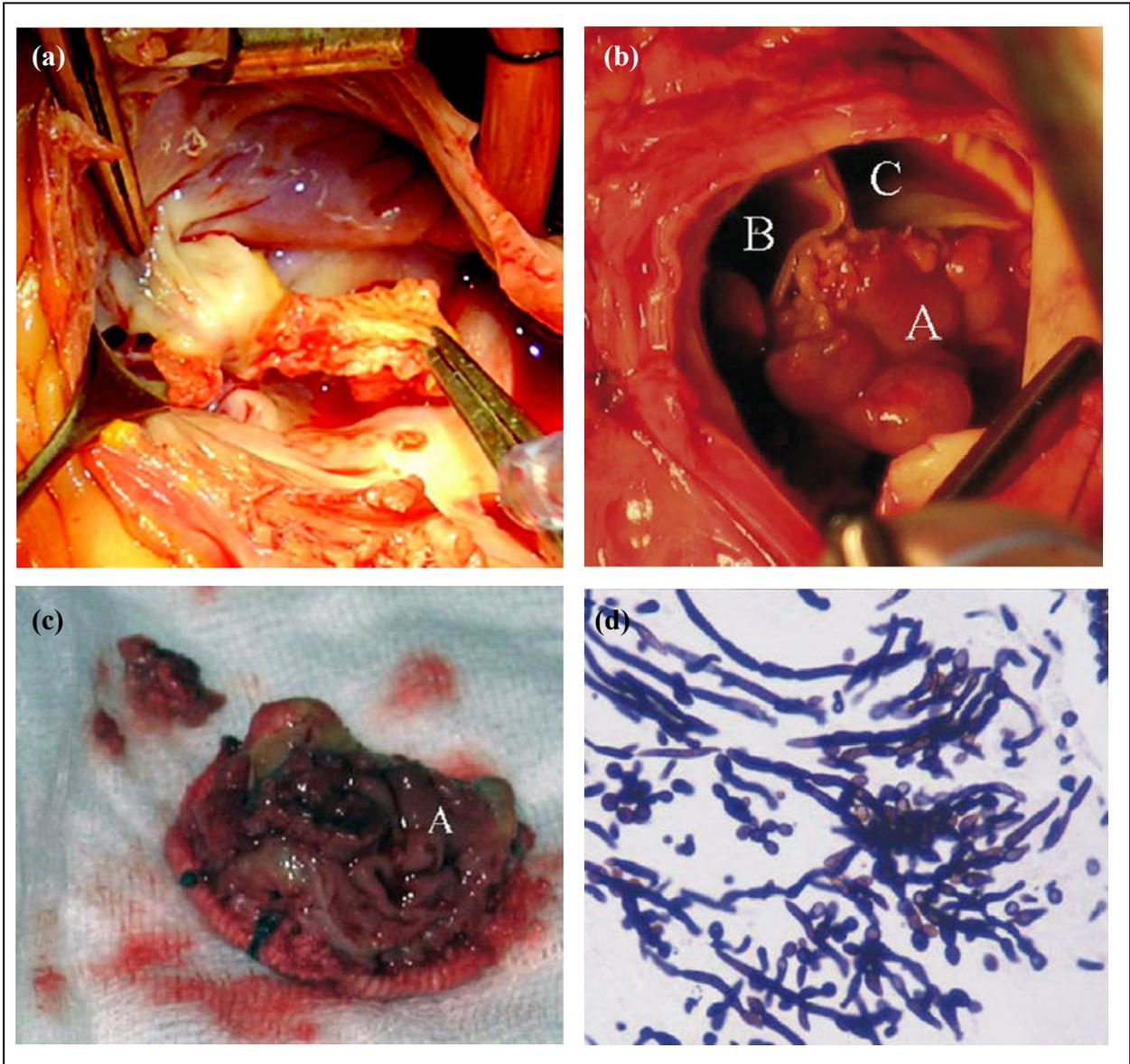
**Figura 12:** Microscopia eletrônica de varredura de biofilme de *C. albicans* em 48 horas. O biofilme é composto de leveduras, hifas e pseudohifas, e a maioria do material exo-polimérico (matriz) é perdida devido à desidratação durante o procedimento de preparo da microscopia. Barra = 10 $\mu$ m (RAMAGE et al., 2005).

Os mecanismos de resistência a agentes antimicrobianos por biofilmes ainda não estão compreendidos. Possíveis mecanismos incluem a restrita penetração das drogas através da matriz; variações fenotípicas resultantes de decréscimo do desenvolvimento ou de limitações de nutrientes, e indução de superfícies expressas por genes de resistência. Outra sugestão é de que um pequeno número de células seria responsável pela resistência (DOUGLAS, 2002).

### 1.9 Complicações da candidíase

Endocardite por *Candida* ocorre geralmente como complicações de pós-operatório de troca valvar, uso de antibióticos, imunodeprimidos e em usuários de drogas ilícitas intravenosas, particularmente heroína. Raramente endocardite é registrada como complicação isolada de candidemia em paciente não submetido à cirurgia cardíaca (Figura 13) (COLOMBO, GUIMARÃES, 2003; BADDLEY et al., 2008; GULLU et al., 2008; LUSINI et al., 2008).

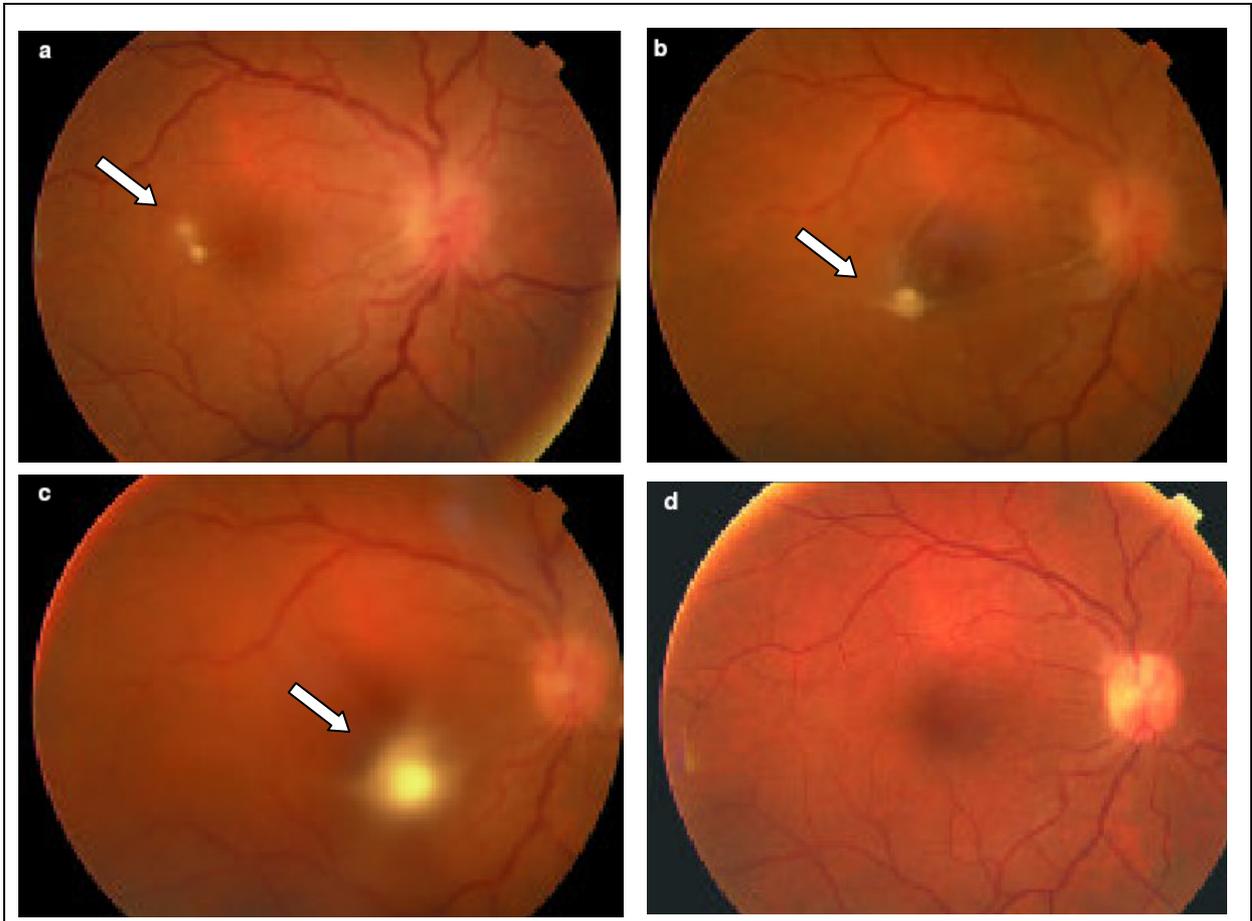
Endoftalmites podem ocorrer em cerca de 10 a 30% dos casos, sendo esta variação na prevalência dependente das condições do hospedeiro (é mais rara em neutropênicos), da espécie de *Candida* envolvida, bem como da presença ou não de oftalmologista na avaliação do paciente. *Candida* pode infectar as estruturas oculares por disseminação hematogênica ou por inoculação direta, durante cirurgia ocular. Sintomas incluem borramento visual, escotomas e dor bulbar. As anormalidades oftalmológicas são caracterizadas por lesões algodinosas na retina e no vítreo, múltiplas hemorragias retinianas, manchas de Roth e uveíte. Todas as estruturas oculares podem ser afetadas, porém, quando ocorre endoftalmite, a terapia é difícil e a incidência de seqüelas é alta. O reconhecimento do envolvimento ocular em pacientes com candidemia é fundamental visto que o tratamento deve ser instituído por período mais prolongado e eventualmente há necessidade de cirurgia para controle do processo (Figura 14) (COLOMBO, GUIMARÃES, 2003; GODOY et al., 2004; BLÁZQUEZ, 2006).



**Figura 13: Endocardite.** (a) Caso 1: Endocardite por *C. parapsilosis*. Vegetação celular fúngica presente nas cúspides anterior e posterior da valva tricúspide nativa. (b) Caso 2: Endocardite por *C. albicans* após três meses de cirurgia para implantação de prótese de valva aórtica, em (A) vegetação fúngica em uma das válvulas aórticas, (B) e (C) demais válvulas. (c) Remoção da vegetação fúngica. (d) Impregnação pela prata da massa de células por microscopia óptica (400X) (GULLU et al., 2008; LUSINI et al., 2008).

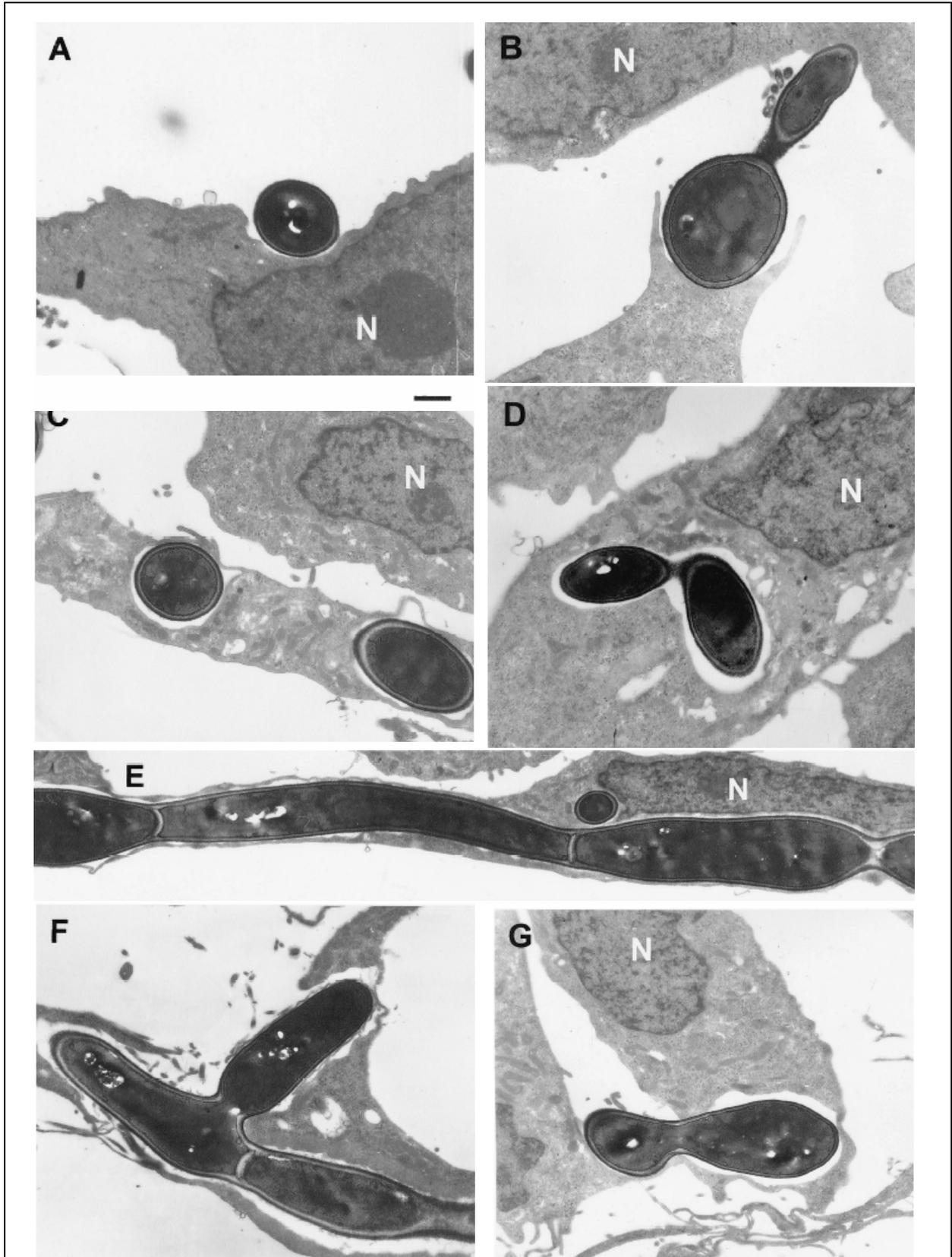
O envolvimento do sistema nervoso central ocorre com grande frequência em prematuros que desenvolvem candidemia. Nesta população, a investigação de meningite em caso de candidemia é necessária. Em adultos, a meningite por *Candida* é geralmente em decorrência de contaminação de procedimento neurocirúrgico, sendo poucas vezes documentada como complicação de candidemia. Entretanto, segundo dados obtidos em séries de necropsia, pacientes com septicemia por *Candida* que evoluem a óbito apresentam lesões

fúngicas no sistema nervoso central em até 20% dos casos (Figura 15) (JONG et al., 2001; COLOMBO, GUIMARÃES, 2003; JONG et al., 2003).



**Figura 14: Endoftalmite.** Exame de fundo de olho de uma paciente com progressão ao vítreo (Endoftalmite por *C. albicans*), apesar do tratamento inicial com fluconazol oral e resposta parcial ao tratamento intravítreo com anfotericina B, houve a necessidade de vitrectomia para a resolução da infecção. **(a)** Antes do tratamento com lesão em fôvea com invasão vítrea inicial. Fluconazol oral (200 mg/12h). **(b)** Duas semanas após o tratamento, progressão em forma de “pérola vítrea”. Injeção intravítrea de anfotericina B que estabiliza a lesão. **(c)** Um mês após tratamento intravítreo, reativação da endoftalmite. Realização de vitrectomia associada ao fluconazol oral. **(d)** Dois anos depois da vitrectomia, resolução completa (BLÁZQUEZ, 2006).

Como consequência de candidemia, o envolvimento osteo-articular é raro, mas pode surgir como complicação tardia, muitas vezes até 16 meses após o suposto episódio de fungemia. O envolvimento ósseo é reconhecido por dor local, febre e alterações radiológicas compatíveis com osteomielite. Articulações também podem ser acometidas, particularmente as principais. Esta complicação parece ser mais frequente em crianças que em adultos. Usuários de heroína também apresentam maior risco de apresentar candidemia com complicações osteo-articulares (COLOMBO, GUIMARÃES, 2003).



**Figura 15:** Microscopia eletrônica de transmissão da adesão e invasão de *C. albicans* às células endoteliais microvasculares de cérebro humano em modelo “in vitro”. (a) Adesão extracelular. (b) Estrutura semelhante à pseudópodes da célula endotelial circundando a célula fúngica onde o tubo germinativo está ligado a uma célula adjacente. (c) *C. albicans* no interior do vacúolo. (d) Replicação de *C. albicans* no interior do vacúolo. (e) e (f) Tubo germinativo de *C. albicans* se dividindo e estendendo no interior da célula humana. (g) *C. albicans* se dividindo e projetando para dentro e/ou fora das células humanas. N = núcleo; Barra = 1 $\mu$ m (JONG et al., 2001).

Peritonite secundária é uma condição clínica comum observada em centros cirúrgicos e unidades de tratamento intensivo. Apesar do avanço nos tratamentos, o índice de mortalidade de peritonite é de aproximadamente de 25%, principalmente em pacientes com longos tratamentos e ventilação artificial. Em casos de persistência e recorrência o índice de mortalidade pode aumentar para 50%. Quando espécies de *Candida* são recuperadas de isolados abdominais de casos de peritonite, a mortalidade pode ficar entre 60 e 70% quando não tratadas. Acima de 40% das peritonites em pacientes quando leveduras são isoladas, espécies do gênero *Candida* são as mais comuns encontradas em culturas oriundas de infecções cirúrgicas (TILL et al., 2008).

Candidíase hepatoesplênica é uma forma incomum de infecção pelo gênero *Candida* que envolve primariamente o fígado e o baço e, menos freqüentemente, via biliar, rins, pulmões e ossos. Esta síndrome ocorre habitualmente em pacientes em tratamento intensivo para leucemia aguda, ou seja, pacientes imunodeprimidos e de difícil tratamento devido à neutropenia coexistente nesta população. A incidência estimada de candidíase hepatoesplênica em pacientes com leucemia aguda é em média 5%. Alguns fatores de risco têm sido associados à candidíase hepatoesplênica, incluindo neutropenia prolongada, uso de cateteres vasculares, mucosite e administração de antibióticos de amplo espectro. O mais provável é que a candidíase hepatoesplênica desenvolva-se como consequência da neutropenia prolongada e quebra da barreira mucosa do trato gastrointestinal, que serve como porta de entrada para as espécies de *Candida*. Esta síndrome manifesta-se pelo surgimento de febre após melhora da neutropenia, acompanhada por aumento do volume abdominal, secundário a hepatoesplenomegalia. Há formação de abscessos no fígado e baço, eventualmente nos rins, sendo comum a ocorrência de anorexia e vômitos. Trata-se de infecção com curso crônico, podendo agravar-se nos casos em que o paciente volte a apresentar neutropenia. O tratamento é realizado por meses, sendo o resultado terapêutico geralmente reservado (NETO et al., 1997; COLOMBO, GUIMARÃES, 2003; LARREGINA et al., 2004; RODRÍGUEZ et al., 2007).

Espécies de *Candida* são freqüentemente isoladas de lavados brônquicos, e é de difícil decisão dizer se são as responsáveis pela pneumonia ou contaminantes, sendo o diagnóstico definitivo baseado em histologia evidenciando a presença de leveduras no tecido pulmonar por biópsia ou autópsia. A incidência de pneumonia por *Candida* é variável, dados de 1295 autópsias de dois hospitais (oncologia) em Baltimore, mostraram incidência de 2,1%.

Pacientes infectados com *Candida* (por aspiração ou disseminação hematogênica) demonstram rápida evolução dos sintomas clínicos, tal como tosse, febre, dor no tórax e taquipnéia. Como qualquer infecção oportunista, depende da rota, do sistema imune do hospedeiro, da presença de outros patógenos e aspirado gástrico. A disseminação do fungo no pulmão resulta em broncopneumonia aguda ou em diversos nódulos com margens irregulares com possível necrose. A disseminação hematogênica oriunda da pneumonia por *Candida* pode resultar em múltiplos nódulos com colônias de leveduras ao redor bolsas de sangue (FRANQUET et al., 2005).

Infecções no pâncreas por *Candida* antes considerada incomum, porém recentes relatos são reportados. CHAKRABARTI et al. (2007) em uma investigação entre janeiro de 2000 a maio de 2003 (Índia), com 335 pacientes com pancreatite aguda, observaram 41 (12,2%) destes, sendo o gênero *Candida* responsável. As seguintes espécies foram encontradas: *C. tropicalis* 43,9% (18), *C. albicans* 36,6% (15), *C. glabrata* 17,1% (7) e *C. krusei* 2,4% (1). Os autores concluíram que os pacientes com graves lesões no pâncreas, tratados com fluconazol e de intervenções cirúrgicas, foram os mais propensos (CHAKRABARTI et al., 2007).

O termo candidúria, que não necessariamente envolve a presença de sinais e/ou sintomas de infecção urinária, pode ser definido como o crescimento de espécies do gênero *Candida* em culturas de urina coletadas por técnicas apropriadas. Indivíduos normais raramente apresentam candidúria. Trata-se de um evento muito freqüente entre pacientes expostos a fatores de risco, sendo que até 20% de pacientes hospitalizados podem apresentar candidúria ao longo de sua internação, particularmente, pacientes de unidade de terapia intensiva. Este achado laboratorial traz dilemas em relação a sua interpretação, visto que pode corresponder a uma simples contaminação da coleta de urina até candidúria assintomática, cistite ou pielonefrite, candidíase renal primária, bola fúngica ureteropélvica ou candidíase disseminada com manifestação renal. Apesar do predomínio de *C. albicans*, tem havido um aumento na incidência de espécies de leveduras não-*albicans* como agentes de infecção do trato urinário, incluindo: *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii*. Alguns autores sugerem que exista maior relação entre candidúria e infecção urinária quando a contagem de colônias na cultura de urina atinge valores da ordem de 1.000 a 10.000 UFC/mL. Entretanto, contagens inferiores podem ser encontradas em pacientes com infecção do trato urinário por *Candida*, particularmente nos casos de

pielonefrite adquirida por via hematogênica decorrente de candidíase sistêmica, onde os rins funcionam como filtro e podem refletir contagens baixas na urina. Havendo envolvimento renal como complicação de fungúria, há formação de microabcessos no córtex renal, com penetração das leveduras nos túbulos proximais e conseqüente excreção na urina. Neste sentido, não há consenso entre os autores sobre o valor de corte específico para interpretação de culturas quantitativas de urina, no sentido de reconhecimento de pacientes com infecção urinária alta ou baixa (OLIVEIRA, MAFFEI, MARTINEZ, 2001; COLOMBO, GUIMARÃES, 2007).

A candidíase é uma micose de importância em saúde pública, onde diversas são as espécies já reconhecidas como agentes causais, embora a mais bem estudada seja a *C. albicans*. As diferentes espécies, com características sutis ou maiores que as diferenciam, apresentam manifestações clínicas e micromorfologia similares, com flexibilidade para adaptar-se em diferentes sítios anatômicos, que dependendo de condições predisponentes do hospedeiro, podem causar ampla gama de danos ao paciente. Uma questão importante: Surgem cada vez mais espécies emergentes em decorrência do oportunismo ou são as condições de aprimoramento diagnóstico utilizado em pesquisas que favorecem melhor panorama de identificação? Acreditamos que ambas as hipóteses são verdadeiras e simultâneas, pois situações novas propiciam a adaptação fúngica às condições do hospedeiro debilitado, tais como o avanço da medicina levando à sobrevida de pacientes. Uma vez que diferentes espécies apresentam diferentes perfis de resistência antifúngica, a relevância de um diagnóstico certo ao nível de espécie, não é mero detalhe micológico, mas sim necessário para um tratamento eficaz.

## 2 JUSTIFICATIVAS

Durante muito tempo, as micoses humanas eram vistas pela comunidade científica como doenças de interesse secundário. Atualmente, com o aumento expressivo da incidência de diferentes micoses em diversos grupos de pacientes, seu estudo passou a ser alvo de interesse de todos os profissionais de saúde.

Uma vez que as leveduras são responsáveis pela maioria dos casos de infecções fúngicas graves, os laboratórios de hospitais, laboratórios clínicos particulares, e centros de pesquisa, devem estar conscientes e preparados para identificação das diferentes espécies, dada a sua importância clínica, epidemiológica e necessidade de terapia específica.

Fungos que anteriormente eram reconhecidos como não-patogênicos, hoje são imputados como causadores de infecções graves, logo, para o laboratório de micologia, o isolamento desses microrganismos é essencial.

Espécies do gênero *Candida* são uma das mais importantes causadoras de infecções nosocomiais e em indivíduos imunodeprimidos (seja transitória, local ou geral). A candidíase engloba um amplo espectro de manifestações clínicas, e diferentes são as espécies envolvidas nos processos de patogênese. *Candida albicans* é a principal espécie envolvida nos diversos casos de candidíase, porém com o aumento das espécies emergentes não-*albicans* a identificação ao nível de espécie tem significância prognóstica e terapêutica.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral:

- Confirmar casos clínicos suspeitos de candidíase cutânea humana atendidos entre novembro de 2008 e agosto de 2009 no setor de Diagnóstico Micológico Humano e Veterinário da disciplina de Micologia, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense.

#### 3.2 Objetivos específicos:

- Identificar as espécies de *Candida* nos diferentes espécimes;
- Determinar a proporção das espécies de *Candida* identificadas;
- Identificar infecções mistas.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Coleta do material clínico

As amostras foram coletadas de pacientes com solicitação médica e que não estiveram em uso de qualquer medicamento antifúngico sistêmico durante um mês e/ou tópico em uma semana. Os sítios onde se tomaram as amostras foram limpos com gaze umedecida em álcool a 70% (Rioálcool), água destilada ou com solução salina estéril (NaCl 0,85%, Vetec) dependendo de cada lesão (ANVISA, 2004).

Lesões cutâneas foram raspadas a partir das bordas com auxílio de lâmina de bisturi descartável ou lâmina de microscopia limpas com álcool a 70%, e as amostras acondicionadas entre duas lâminas de microscopia, envoltas em papel, identificadas e processadas no mesmo dia. Amostras de unhas requereram um procedimento anterior para remover a hiperqueratose, utilizando estilete flambado à chama do bico de Bunsen ou lâmina de bisturi descartável (ANVISA, 2004).

### 4.2 Exame direto

Colocou-se em lâmina de uma a duas gotas da solução clarificante hidróxido de potássio (KOH, Isofar) a 20% e, sobre esta se adicionou pequenos fragmentos da amostra clínica, cobrindo-se a preparação com lamínula. Após ligeiro aquecimento à chama do bico de Bunsen, e repouso por 20 minutos, o conjunto lâmina-lamínula foi observado em microscopia óptica (StudarLab/Labimex) com resolução de 400X (ANVISA, 2004).

Os procedimentos acima descritos e a semeadura nos tubos de cultura iniciais de ágar Sabouraud-dextrose a 4% (SDA, Acumedia) e ágar Mycosel (MYA, BD) abaixo relatados, foram feitos por 2 profissionais no setor de Diagnóstico Micológico Humano e Veterinário da disciplina de Micologia, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense, e realizados dentro da área de segurança da chama do bico de Bunsen e utilizando alças de níquel-cromo.

#### 4.3 Cultura em ágar Sabouraud e ágar Mycosel

Amostras clínicas positivas para leveduras foram semeadas em meio inclinado de SDA e MYA, ambos em tubos de vidro transparentes (150 X 15 mm) com tampas de rosca. Com o auxílio da alça em L, procedeu-se a semeadura com três perfurações equidistantes nos meios de cultura. Os tubos foram incubados a temperatura ambiente e com observação macroscópica em 15 dias com auxílio do microscópio estereoscópio (StudarLab/Labimex) com aumento de 10X (ANVISA, 2004; SIDRM, ROCHA, 2004).

#### 4.4 Cultura em BHI acrescido de cloranfenicol

Com o auxílio da alça em gota foi retirada das culturas leveduriformes em SDA ou MYA uma alíquota para repique em tubos de vidro transparentes (100 X 15 mm) com tampas rosqueáveis contendo 1 mL de infusão cérebro coração (BHI, Acumedia) acrescido de cloranfenicol (Ariston) na concentração de 0,5 g/L. Os tubos foram incubados a temperatura ambiente e observados macroscopicamente entre 2 e 5 dias. Constatando persistência da contaminação bacteriana, foi feita nova cultura e pipetas de vidro de 2 mL autoclavadas foram utilizadas para adicionar 0,5 mL de solução de cloranfenicol a 5 g/L e benzilpenicilina benzatina (Eurofarma) a 9,91 g/L. Após esta etapa as amostras foram novamente passadas para tubos com SDA e MYA (ANVISA, 2004).

#### 4.5 Plaqueamento em ágar Sabouraud

A partir de culturas de tubos SDA ou MYA contaminadas ou não com bactérias e fungos semelhantes a leveduras, retirou-se com alça em gota parte da amostra sendo esta

repicada pela técnica de esgotamento em placas de Petri (90 X 15 mm) com SDA. Estas foram incubadas a temperatura ambiente e observadas macroscopicamente entre 2 e 5 dias com auxílio do microscópio estereoscópio (StudarLab/Labimex) com resolução de 10X. Após esta etapa, as amostras foram passadas em SDA em tubos para posterior estoque em água destilada estéril (ANVISA, 2004; SIDRIM, ROCHA, 2004).

#### 4.6 Estoque em água destilada estéril

Tubos de vidro transparentes (100 X 15 mm) com tampas de rosca contendo 6 mL de água destilada foram autoclavados por 15 minutos a 121°C. A água destilada foi vertida nos tubos de cultura em SDA e com o auxílio da alça em gota, a cultura foi desprendida do meio. Na seqüência esta água destilada contendo a suspensão da levedura foi vertida de volta ao tubo de 100 X 15 mm, onde obtivemos densidade equivalente ao padrão Mc Farland n.º 10, logo os tubos foram armazenados a temperatura ambiente (McGINNIS, PADHYE, AJELLO, 1974; RODRIGUES, LÍRIO, LACAZ, 1992).

#### 4.7 Cultura em CHROMagar *Candida*

Do estoque em água destilada estéril, foi retirada uma alíquota com a alça em gota e repicada pela técnica de esgotamento no CHROMagar *Candida* (placas de Petri 60 X 15 mm, Probac do Brasil) e incubadas por 2 dias a 37°C. Interpretação de acordo com a bula do fabricante: verde, *C. albicans*; azul metálico, *C. tropicalis*; rosa, rugosa, *C. krusei*; e branca a rosa, demais espécies (GARCÍA-MARTOS et al., 1998; ARAÚJO et al., 2005; TAN, PETERSON, 2005).

#### 4.8 Prova do tubo germinativo

Em tubos de vidro transparentes (100 X 15 mm) com tampas rosqueáveis contendo 0,5 mL de soro de equino (Laborclin), foi repicada uma alçada oriunda de um crescimento prévio em SDA de 2 dias. Esta suspensão foi incubada a 37°C durante 2 horas, e com pipetador automático fixo retirou-se 5 µL para entre lâmina-lamínula, corada com azul-algodão (Azul

de metila – Isofar e Lactofenol – Farmácia de manipulação Bem Viver) ser observado ao microscópio óptico (StudarLab/Labimex) com resolução de 400X (ANVISA, 2004).

#### 4.9 Cultura em ágar Sabouraud hipertônico

Retirou-se com auxílio da alça em gota, uma alíquota do estoque em água destilada estéril, para ser repicada em SDA contendo NaCl a 6,5%, cultura realizada em tubos de vidro transparentes (150 X 15 mm) com meio inclinado e tampas de rosca. Os tubos foram incubados a 37°C e observados macroscopicamente entre 4 e 5 dias. Interpretação, *C. albicans* se desenvolve enquanto que *C. dubliniensis* não (ALVES et al., 2002; AKGÜL, ÇERIKÇIOGLU, 2009).

#### 4.10 Cultura em ágar Sabouraud entre 42-45°C

Com a alça em gota, retirou-se uma alíquota do estoque em água destilada estéril para repique em SDA. Cultura realizada em tubos de vidro transparentes (150 X 15 mm) com meio inclinado e tampas rosqueáveis. Os tubos foram incubados entre 42-45°C e observados macroscopicamente por 2 e 7 dias. Interpretação, *C. albicans* se desenvolve enquanto que *C. dubliniensis* apresenta pouco ou nenhum crescimento (PINJON et al., 1998; MESA et al., 2004; GAMBOA et al., 2006).

#### 4.11 VITEK<sup>®</sup> 2 Compact

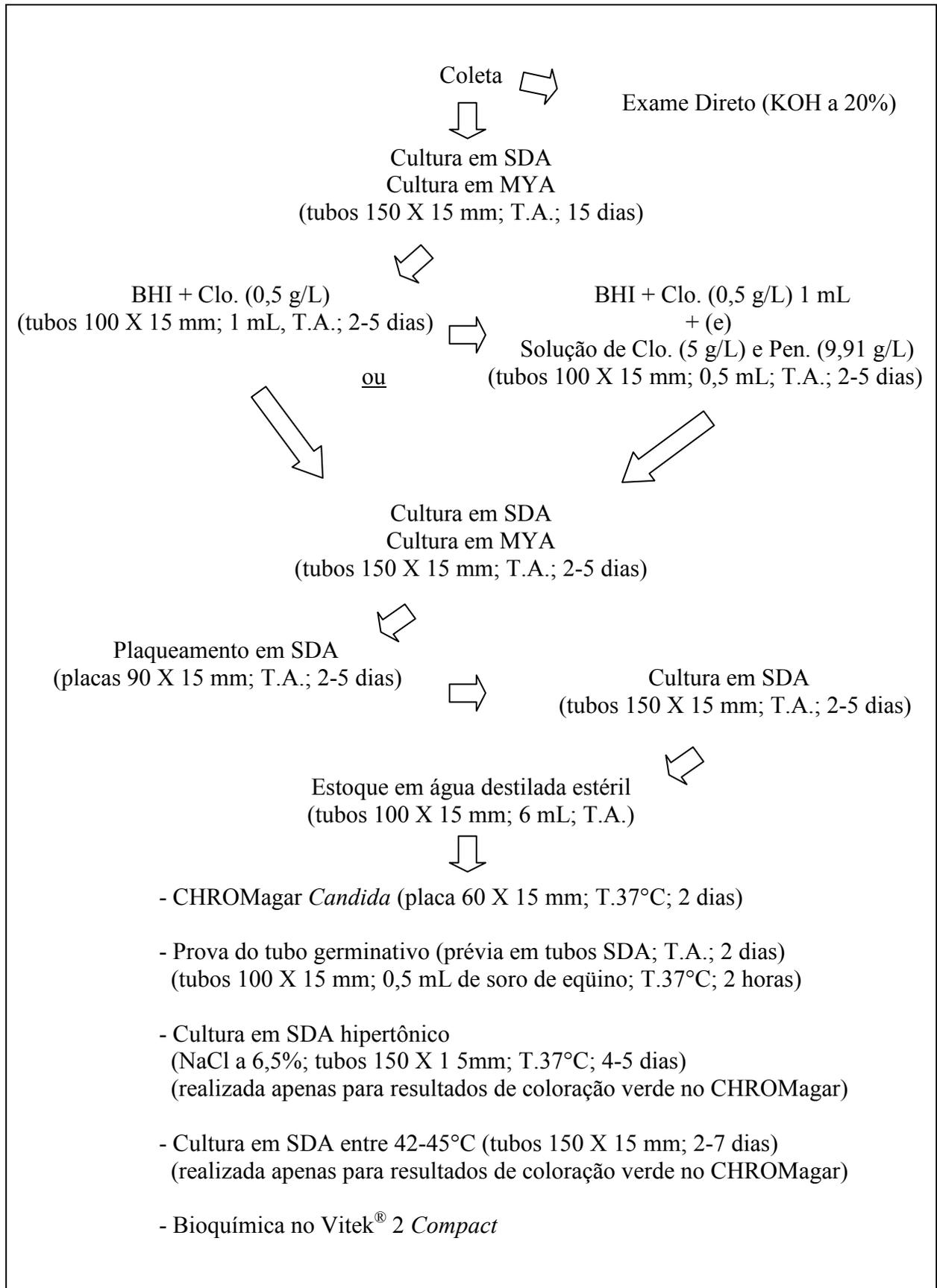
Após crescimento prévio de 2 dias em SDA a temperatura ambiente, com alça em gota foi feita uma suspensão da cultura em 3 mL de solução salina estéril (NaCl aquoso de 0,45 a 0,50%, pH 4,5 a 7,0) em tubos (75 X 12 mm) de poliestireno transparente, com uma densidade equivalente ao padrão Mc Farland n.º 1.8 a 2.2 usando o calibrador VITEK<sup>®</sup> 2 *DensiChek*. Os tubos e os cartões VITEK<sup>®</sup> 2 YST foram dispostos em estantes próprias e estas inseridas no primeiro compartimento do aparelho para a suspensão da cultura ser distribuída entre os poços dos cartões, na seqüência a estante foi direcionada ao segundo compartimento para selar os cartões e serem incubados a 35,5°C por aproximadamente 18 horas. Etapa realizada no Instituto Fernandes Figueira - FIOCRUZ (HATA et al., 2007).

#### 4.12 Referências

Para todas as técnicas realizadas (Figura 16) (exceto o Sabouraud hipertônico e o crescimento entre 42-45°C) foram utilizadas nove cepas oriundas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) referência *American Type Culture Collection* (ATCC) e uma do Instituto Adolfo Lutz (IAL) referência Bristol-Myers Squibb (Squibb). São elas: *Candida albicans* sor. A INCQS 40119 (ATCC 36801); *Candida albicans* sor. B INCQS 40120 (ATCC 36802); *Candida dubliniensis* CT INCQS 40172 (ATCC MYA-646); *Candida glabrata* INCQS 40136 (ATCC 2001); *Candida guilliermondii* INCQS 40037 (ATCC 6260); *Candida kefyr* INCQS 40121 (ATCC 46764); *Candida krusei* INCQS 40095 (ATCC 34135); *Candida lusitanae* INCQS 40137 (ATCC 34449); *Candida parapsilosis* INCQS 40038 (ATCC 22019); e *Candida tropicalis* IAL 90 (Squibb 1600).

#### 4.13 Estatística

Utilizamos a estatística descritiva, distribuição de frequências, para o cálculo do número de classes para a proporção das idades dos pacientes, conhecida como Regra de Sturges, onde o número de classes de uma distribuição é em função do número de ocorrências da variável. Todos os cálculos obtidos através de porcentagem foram considerados até a segunda casa decimal, arredondando-se o número para cima, quando o algarismo da terceira casa decimal foi igual ou superior a cinco.



**Figura 16: Esquema geral de metodologia.** (KOH = hidróxido de potássio; SDA = ágar Sabouraud dextrose a 4%; MYA = ágar Mycosel; T.A. = temperatura ambiente; BHI = infusão cérebro coração; Clo. = cloranfenicol; Pen. = benzilpenicilina benzatina; NaCl = cloreto de sódio).

## 5 RESULTADOS

Foram coletadas 65 amostras de leveduras oriundas de 56 pacientes com suspeita de candidíase cutânea, onde confirmadas 58 (89,23%) amostras em 51 (91,07%) pacientes, atendidos no setor de Diagnóstico Micológico Humano e Veterinário, disciplina de Micologia, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense, no período de novembro de 2008 a agosto de 2009, de acordo com as normas e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina/Hospital Universitário Antônio Pedro (CEP CMM/HUAP n.º 188/08 e CAAE n.º 0147.0.258.000-08, o modelo do termo de consentimento livre e esclarecido de encontra no apêndice 9.1).

Dentre os 51 pacientes, sendo 38 (74,51%) do sexo feminino e 13 (25,49%) do sexo masculino, obtivemos 45 (88,24%) com infecções simples e 6 (11,76%) com infecções mistas, sendo 5 pacientes com infecções mistas duplas e um com infecção mista tripla. Sendo este último com infecção tripla, duas espécies recuperadas de suas mãos e uma espécie recuperada dos pés.

Os resultados com relação às idades, gênero, profissões/ocupações, sítios de infecção dos pacientes se encontram nos quadros 1 a 5.

**Quadro 1: Distribuição etária dos pacientes.**

Idades	Número de pacientes	Relação em porcentagem
08 a 21 anos	2	3,92%
21 a 34 anos	9	17,65%
34 a 47 anos	6	11,76%
47 a 60 anos	17	33,33%
60 a 73 anos	10	19,61%
73 a 86 anos	7	13,73%

**Quadro 2: Distribuição ocupacional dos pacientes.**

Profissões/Ocupações	Número de ocorrências por profissão/ocupação	Relação em porcentagem
Donas de casa	9	17,65%
Aposentados	7	13,73%
Professoras	4	7,84%
Serventes	3	5,88%
Médicas	2	3,92%
Costureiras	2	3,92%
Estudantes	2	3,92%
Demais diferentes profissões/ocupações	22	43,14%

**Quadro 3: Distribuição dos sítios de infecção dos pacientes.**

Quirodáctilos e Pododáctilos 46 (88,46%)	Quirodáctilos 18 (34,62%)	Ungueais 18 (34,62%)
	Pododáctilos 27 (51,92%)	Ungueais 21 (40,83%)
		Interdigitais 3 (5,77%)
	Plantares 3 (5,77%)	
	Quirodáctilos e Pododáctilos (“pool”) 1 (1,92%)	Ungueais 1 (1,92%)
Cutâneos (outros sítios) 6 (11,54%)	Corpo (“pool”)	1 (1,92%)
	Membro Inferior	2 (3,85%)
	Inguinal	1 (1,92%)
	Couro cabeludo	1 (1,92%)
	Mama	1 (1,92%)

**Quadro 4: Dados de gênero, idade e sítios de infecção dos pacientes.**

Mulheres	38/51 (74,51%)
Homens	13/51 (25,49%)
Faixa etária de maior incidência	Entre 47 e 60 anos, 27/51 (33,33%)
Média etária	51,97 anos
Quirodáctilos para mulheres	15/52 (28,84%)
Quirodáctilos para homens	3/52 (5,77%)
Pododáctilos para mulheres	19/52 (36,54%)
Pododáctilos para homens	8/52 (15,38%)
Ungueais quirodáctilos para mulheres	15/52 (28,84%)
Ungueais quirodáctilos para homens	3/52 (5,77%)
Ungueais pododáctilos para mulheres	16/52 (30,77%)
Ungueais pododáctilos para homens	5/52 (9,62%)
Quiro e pododáctilo para mulher	1/52 (1,92%)
Cutâneos para mulheres	4/52 (7,69%)
Cutâneos para homens	2/52 (3,85%)

De acordo com os quadros 1 a 4 foi observado: (1) faixa etária de maior incidência entre 47 e 60 anos, e com média de 51,97 anos; (2) dentre as profissões/ocupações dos pacientes as quatro primeiras posições foram para donas de casa, aposentados, professoras e serventes; e (3) predominância de amostras ungueais quirodáctilas e pododáctilas para mulheres.

**Quadro 5a: Dados de gênero, idade, profissão/ocupação e sítio de infecção de todos os pacientes.**

Amostra	Gênero	Idade	Profissão/Ocupação
399/08 upd d/e	Masculino	72 anos	Aposentado
400/08 uqpd d/e	Feminino	73 anos	Servente
519/08 uqd e	Feminino	62 anos	Médica
546/08 uqd	Feminino	51 anos	Dona de casa
571/08 uqd	Feminino	33 anos	Professora
594/08 upd pool	Masculino	8 anos	Estudante
601/08 uqd	Masculino	55 anos	Frentista
606/08 updh d/e	Feminino	42 anos	Bióloga
607/08 upd	Masculino	66 anos	Aposentado
608/08 updh d/e	Feminino	39 anos	Auxiliar de creche
625/08 updh d/e	Feminino	65 anos	Professora
652/08 uqd e	Feminino	57 anos	Dona de casa
662/08 pdint d/e	Feminino	50 anos	Contadora
666/08 updh d/e	Feminino	67 anos	Comerciante
671/08 updh d/e	Feminino	33 anos	Serventuária
11/09 pdplant d/e	Masculino	38 anos	Analista
22/09 cut pool	Feminino	30 anos	Dona de casa
24/09 uqd d/e	Masculino	54 anos	Projetista
26/09 uqd d	Feminino	81 anos	Professora
37/09 cut mi	Feminino	58 anos	Costureira
43/09 updh d/e	Feminino	65 anos	Aposentada
46/09 updh e	Feminino	46 anos	Farmacêutica
49/09 uqd pool	Feminino	54 anos	Autônoma
49/09 upd pool			
52/09 uqd *	Feminino	11 anos	Estudante
55/09 cut ing	Feminino	47 anos	Ass. administrativa
56/09 uqd	Feminino	27 anos	Guarda de trânsito
57/09 uqd d/e	Feminino	76 anos	Aposentada
60/09 pdint d/e	Masculino	30 anos	Marceneiro

\* Amostra removida da contagem geral de pacientes por motivo do microrganismo não ser do gênero *Candida*.  
 uqd = ungueal quirodáctilo; upd = ungueal pododáctilo; updh = ungueal pododáctilo hálux; uqpd = ungueal quiro e pododáctilo; pdint = pododáctilo interdigital; pdplant = pododáctilo plantar; cut = cutâneo; pool = mistura; mi = membro inferior; ing = inguinal; d = direito; e = esquerdo; d/e = direito e esquerdo.

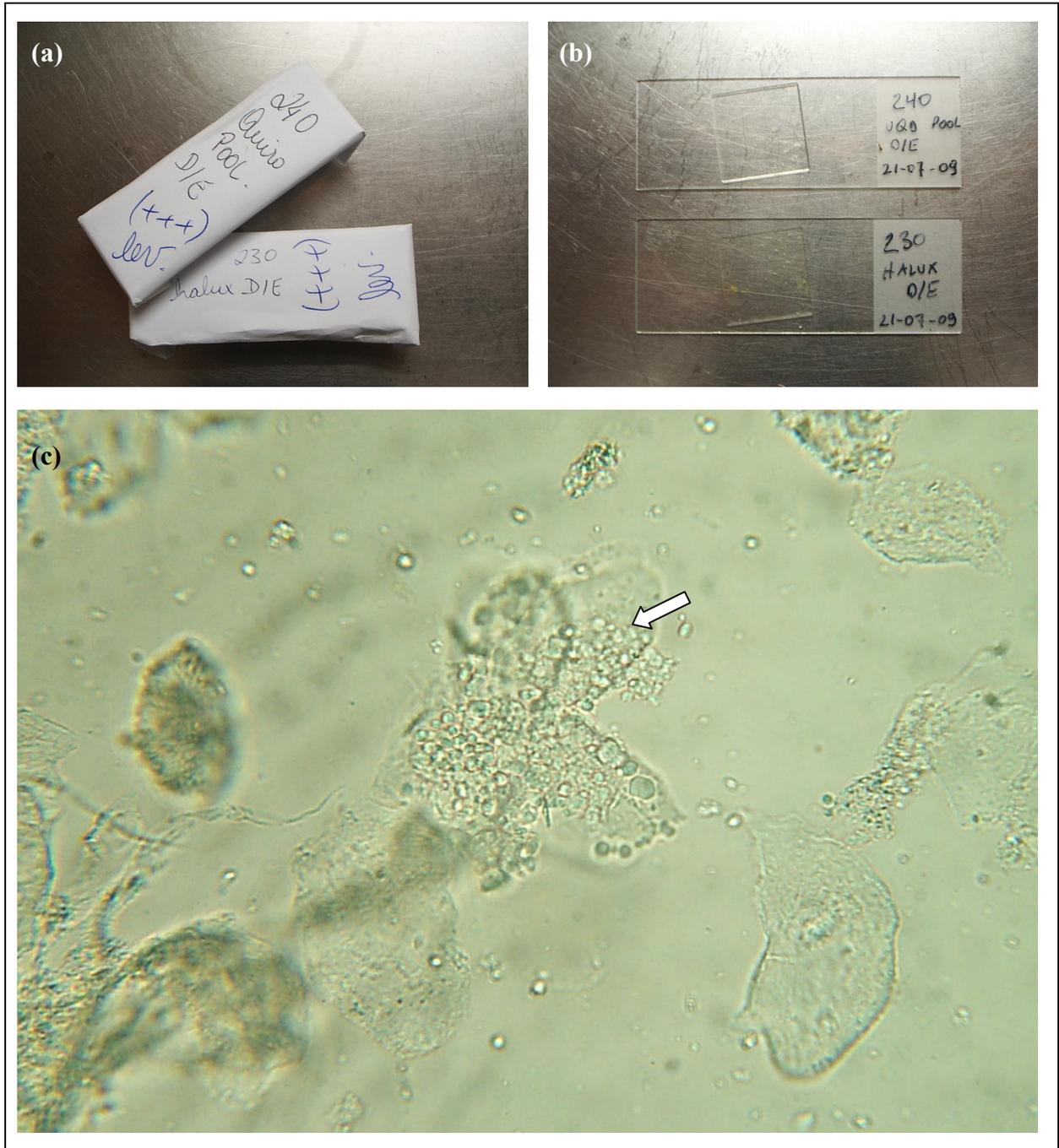
**Quadro 5b: de gênero, idade, profissão/ocupação e sítio de infecção de todos os pacientes (continuação).**

Amostra	Gênero	Idade	Profissão/Ocupação
62/09 upd	Feminino	85 anos	Dona de casa
71/09 updh d/e	Feminino	58 anos	Professora
78/09 cut nad *	Feminino	11 anos	Estudante
84/09 uqd pool	Feminino	49 anos	Dona de casa
107/09 upd	Masculino	32 anos	Vendedor
111/09 uqd d/e *	Feminino	54 anos	Professora
118/09 uqd pool *	Feminino	57 anos	Dona de casa
125/09 pdplant	Feminino	59 anos	Dona de casa
126/09 pdint	Feminino	30 anos	Nutricionista
136/09 uqd	Feminino	79 anos	Dona de casa
140/09 uqd	Feminino	86 anos	Aposentada
145/09 cut mama	Feminino	73 anos	Aposentada
152/09 updh d/e	Feminino	50 anos	Artesã
153/09 uqd d/e	Masculino	28 anos	Funcionário público
154/09 uqd d	Feminino	62 anos	Costureira
175/09 pdplant	Masculino	50 anos	Advogado
184/09 updh d/e	Feminino	58 anos	Servente
187/09 uqd	Feminino	71 anos	Dona de casa
189/09 updh d	Feminino	48 anos	Servente
190/09 pdint *	Feminino	63 anos	Pensionista
209/09 uqd	Feminino	61 anos	Aposentada
217/09 updh d/e	Feminino	54 anos	Médica
218/09 upd	Feminino	32 anos	Secretária
230/09 updh d/e	Feminino	65 anos	Dona de casa
233/09 cut mi	Masculino	58 anos	Serviços gerais
240/09 uqd d/e	Feminino	39 anos	Dentista
247/09 updh d	Masculino	35 anos	Téc. em manutenção
254/09 cut ccab	Masculino	14 anos	Estudante

\* Amostras removidas da contagem geral de pacientes por motivo do microrganismo não ser do gênero *Candida* ou por não ter sido identificado o gênero.

uqd = ungueal quirodáctilo; upd = ungueal pododáctilo; updh = ungueal pododáctilo hálux; pdint = pododáctilo interdigital; pdplant = pododáctilo plantar; cut = cutâneo; pool = mistura; mi = membro inferior; nad = nádegas; mama = mamário; ccab = couro cabeludo; d = direito; d/e = direito e esquerdo.

Foi considerado o exame direto positivo para levedurose as amostras clínicas onde se observou a presença de numerosos blastoconídios associados às escamas dérmicas (Figura 17).



**Figura 17: Exame direto.** (a) Amostra clínica acondicionada e identificada após a coleta. (b) Conjunto em lâmina-laminula contendo amostra clínica tratada com solução de KOH a 20% para observação ao microscópio óptico. (c) Exame direto da amostra 608/08 updh d/e. A seta indica os blastoconídios. Fotos (a) e (b) realizadas com câmera fotográfica digital; e foto (c) por captura da imagem por apoio da objetiva da câmera fotográfica digital (Samsung Digimax 201) na ocular do microscópio óptico (StudarLab/Labimex) com resolução de 400X. KOH = hidróxido de potássio; updh = ungueal pododáctilo hálux; upd = ungueal pododáctilo; d/e = direito e esquerdo.

Foi obtido da cultura inicial em SDA e MYA em tubos o crescimento leveduriforme, informação da macromorfologia, além de constatar outros microrganismos, de não interesse neste estudo como bactérias, *Rhodotorula* e *Trichosporon* (Figura 18).



**Figura 18: Cultura inicial em ágar Sabouraud por 15 dias a temperatura ambiente.** Quatro tubos contendo culturas leveduriformes de interesse (1) com presença de bactérias (2), *Rhodotorula* (3) e *Trichosporon* (4). Foto realizada com câmera fotográfica digital (Samsung Digimax 201). SDA = ágar Sabouraud-dextrose a 4%; e tubos de vidro 150 X 15 mm.

Independente das amostras estarem ou não contaminadas com bactérias, todas foram cultivadas em BHI acrescido de cloranfenicol. Destas, 38 (65,52%) amostras estavam contaminadas com bactérias, sendo que para 15 (25,86%) foi necessário o uso da solução de cloranfenicol com benzilpenicilina benzatina para isolamento (Figura 19). Foram encontradas 15 (25,86%) contaminadas com *Trichosporon*.

Na cultura em MYA (Quadro 6), 36 (62,07%) amostras se desenvolveram enquanto que 22 (37,93%) não. Dentre as espécies de referência que cresceram no MYA foram: *C. albicans* sor. A; *C. albicans* sor. B; *C. dubliniensis*; *C. glabrata*; *C. guilliermondii* e *C. kefyr*.

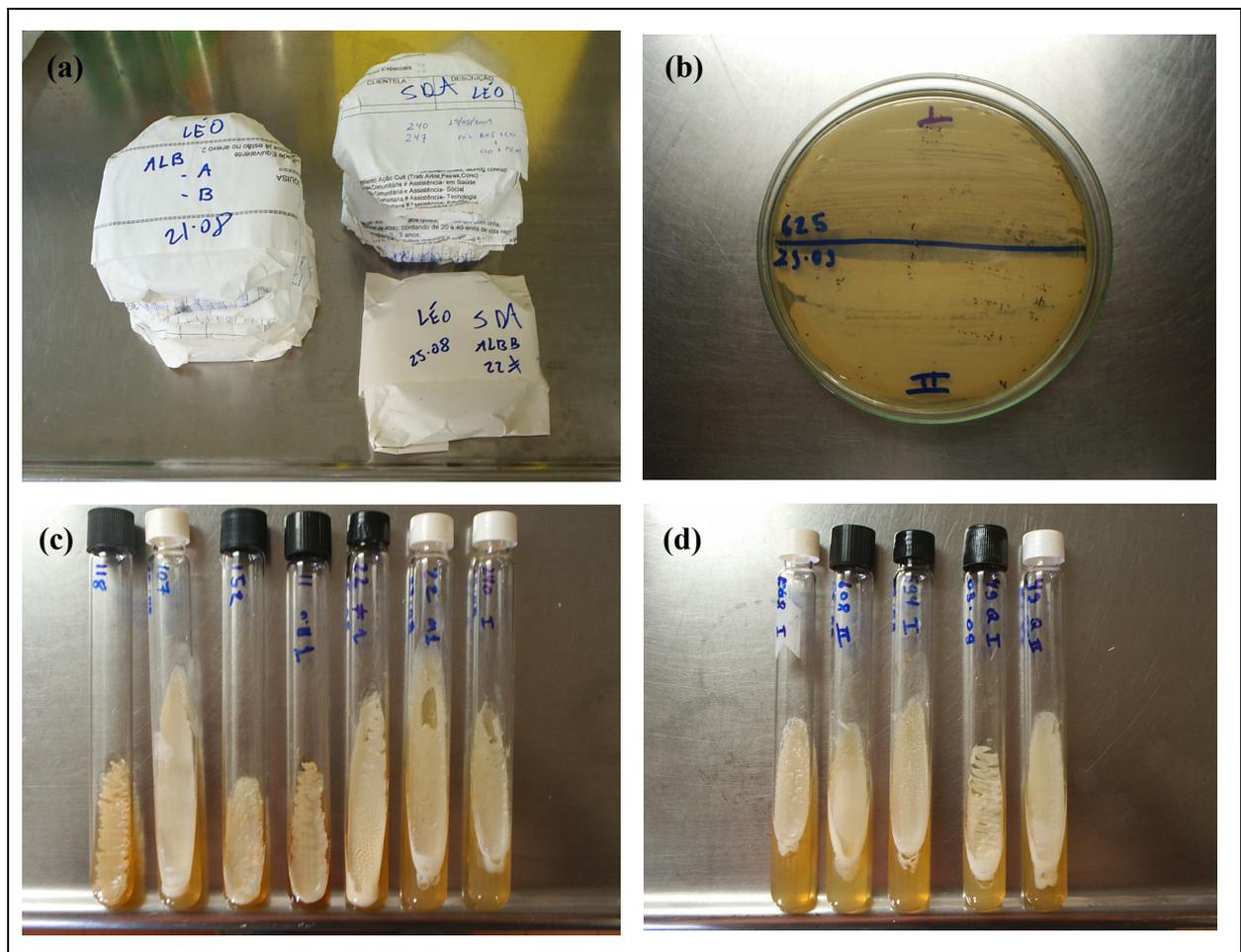
**Quadro 6: Resultados das amostras e referências no ágar Mycosel.**

Amostra	Ocorrência	Amostra	Ocorrência
399/08 upd d/e	+	78/09 cut nad *	-
400/08 uqpd d/e	+	84/09 uqd pool	+
519/08 uqd e/B	+	107/09 upd	+
519/08 uqd e/V	+	111/09 uqd d/e *	+
546/08 uqd	-	118/09 uqd pool *	+
571/08 uqd	+	125/09 pdplant	+
594/08 upd pool I *	-	126/09 pdint	-
594/08 upd pool II	-	136/09 uqd	+
601/08 uqd	+	140/09 uqd	+
606/08 updh d/e	+	145/09 cut mama	-
607/08 upd	-	152/09 updh d/e	-
608/08 updh d/e I	-	153/09 uqd d/e	+
608/08 updh d/e II	+	154/09 uqd d	+
625/08 updh d/e I	-	175/09 pdplant	-
625/08 updh d/e II	+	184/09 updh d/e	-
652/08 uqd e	+	187/09 uqd	-
662/08 pdint d/e	-	189/09 updh d	+
666/08 updh d/e	+	190/09 pdint *	+
671/08 updh d/e	+	209/09 uqd	-
11/09 pdplant d/e I	+	217/09 updh d/e	-
11/09 pdplant d/e II	+	218/09 upd	+
22/09 cut pool I	-	230/09 updh d/e	-
22/09 cut pool II	+	233/09 cut mi	-
24/09 uqd d/e	+	240/09 uqd d/e	-
26/09 uqd d	+	247/09 updh d I	+
37/09 cut mi	-	247/09 updh d II *	+
43/09 updh d/e	+	254/09 cut ccab	-
46/09 updh e	+	-----	-----
49/09 uqd pool I	-	<i>C. albicans</i> sor. A	+
49/09 uqd pool II	+	<i>C. albicans</i> sor. B	+
49/09 upd pool III	+	<i>C. dubliniensis</i>	+
52/09 uqd *	+	<i>C. glabrata</i>	+
55/09 cut ing	+	<i>C. guilliermondii</i>	+
56/09 uqd	+	<i>C. kefyr</i>	+
57/09 uqd d/e	+	<i>C. krusei</i>	-
60/09 pdint d/e	+	<i>C. lusitaniae</i>	-
62/09 upd	-	<i>C. parapsilosis</i>	-
71/09 updh d/e	+	<i>C. tropicalis</i>	-

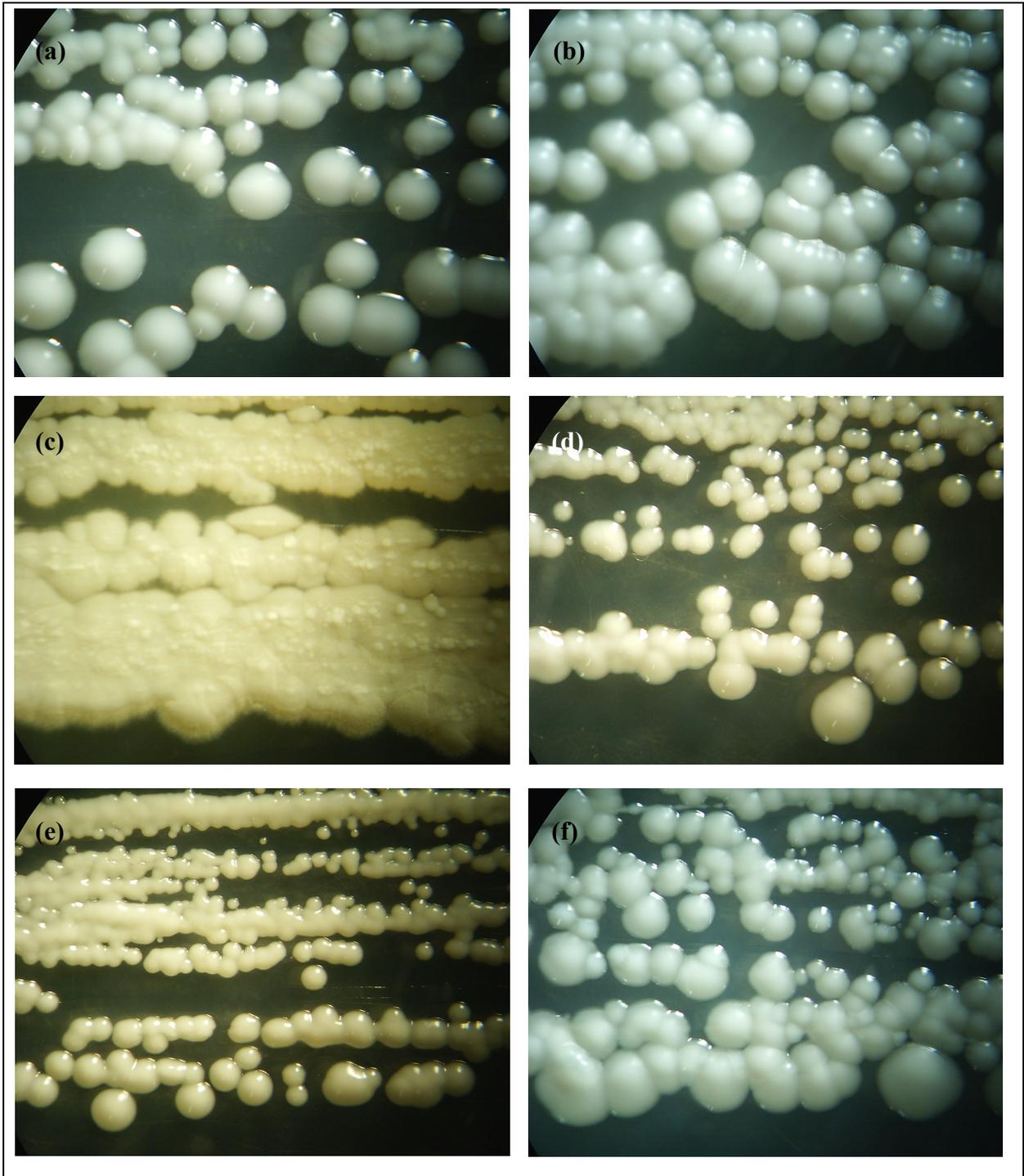
\* Amostras removidas da contagem geral por motivo do microrganismo não ser do gênero *Candida*, por não ter sido identificado o gênero ou a espécie ser semelhante quando se pensava em infecção mista.

(+) = com desenvolvimento no ágar Mycosel; (-) = sem desenvolvimento no ágar Mycosel.

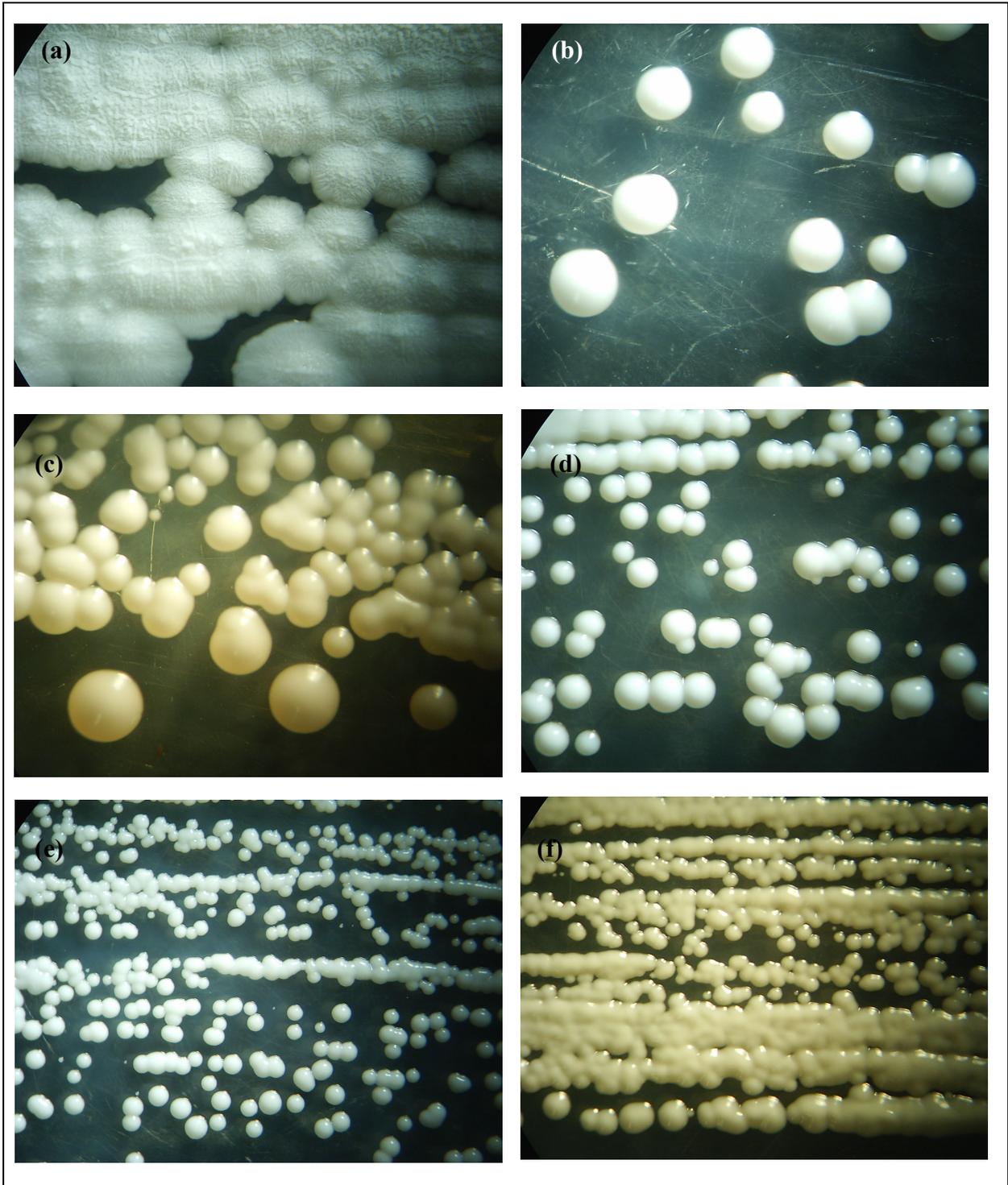
Foram observados na macromorfologia os seguintes parâmetros: (1) pigmentação do branco ao creme com reverso incolor e pigmento não difusível no meio; (2) tamanhos variados das colônias; (3) bordas delineadas a irregulares; (4) textura cremosa homogênea de aspecto úmido ou seco; (5) relevo glabro ou rugoso; e (6) quanto ao brilho, lustroso ou opaco (Figuras 19, 20 e 21). Seis amostras sugestivas de infecções mistas foram observadas por diferença da macromorfologia (Figura 22). A presença de 3 (5,17%) *Trichosporon* e 3 (5,17%) bactérias foram observadas em cinco amostras não eliminadas nas etapas anteriores (Figura 23). No apêndice 9.2 foi detalhado a seqüência de procedimentos nas amostras com presença de bactérias e *Trichosporon*.



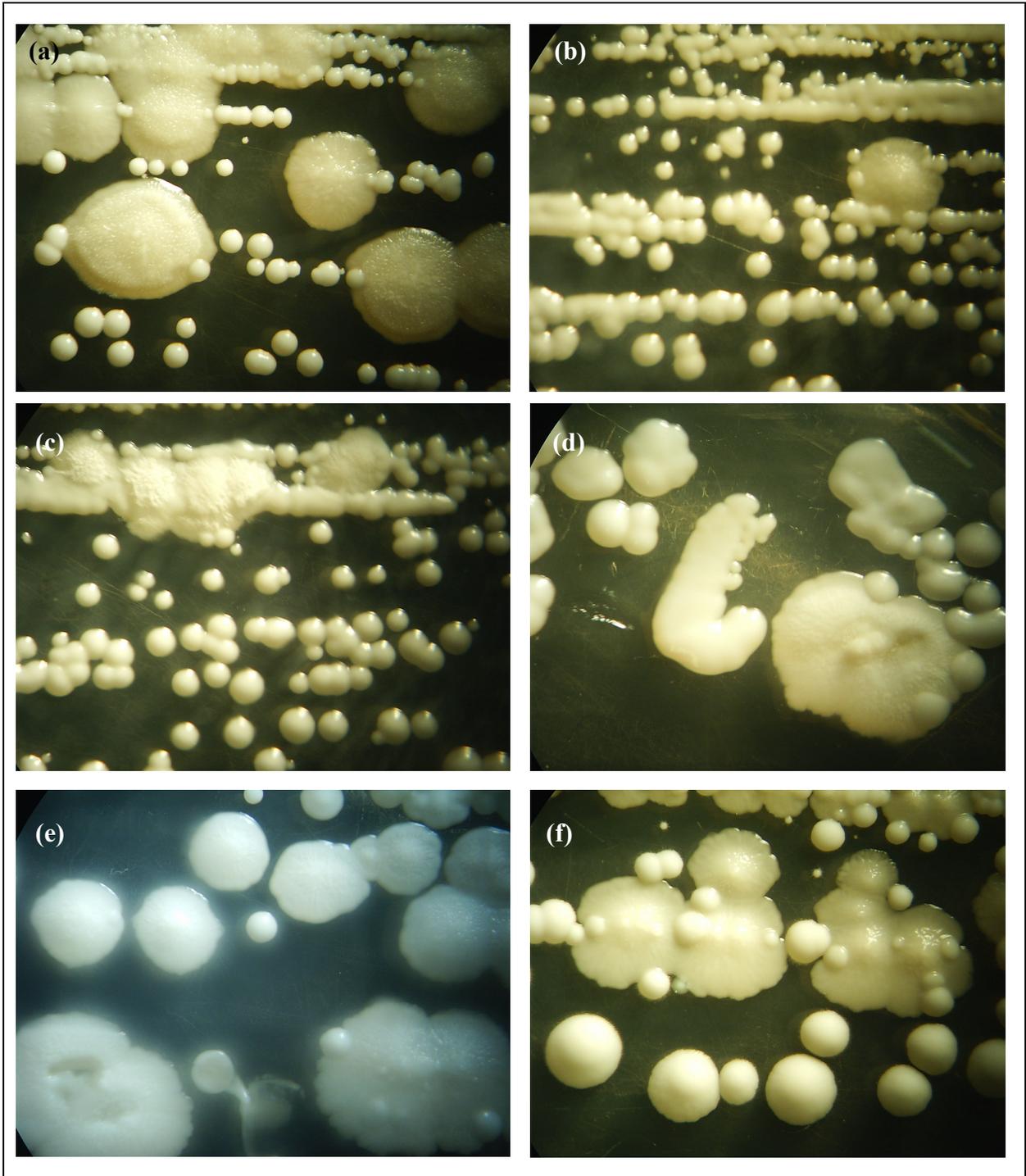
**Figura 19: Acondicionamento, reverso e tubos pós plaqueamento em SDA.** (a) Placas de 90 X 15 mm acondicionadas e identificadas após repique. (b) Reverso incolor, amostra 625/08 *updh d/e* (2 dias a temperatura ambiente). (c) e (d) Tubos de 150 X 15 mm com culturas oriundas de amostras plaqueadas (5 dias a temperatura ambiente). Fotos realizadas com câmera fotográfica digital (Samsung Digimax 201). SDA = ágar Sabouraud-dextrose a 4%; *updh d/e* = ungueal pododáctilo direito e esquerdo.



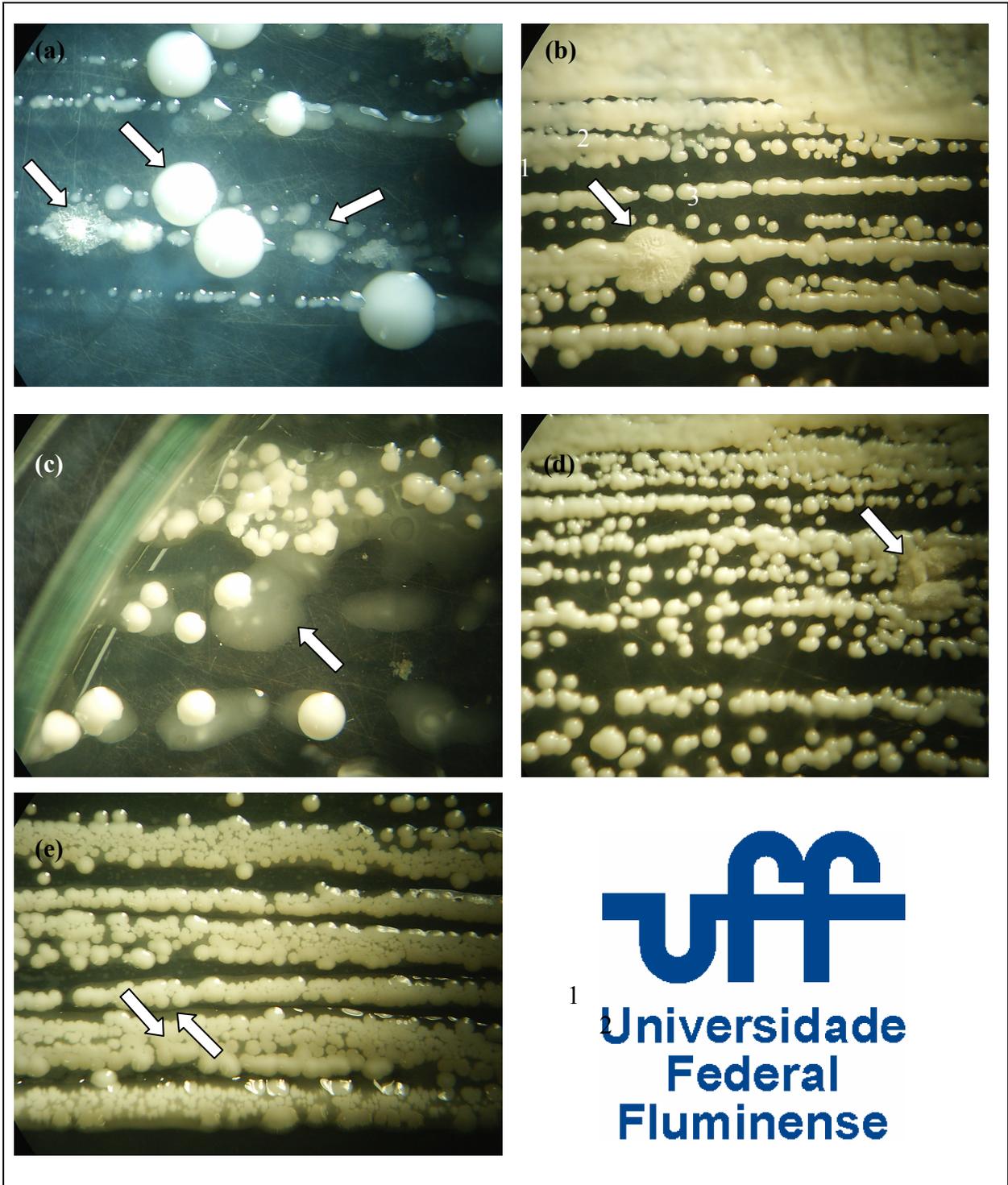
**Figura 20: Macromorfologia das espécies de referência em SDA por 4 dias a temperatura ambiente. (a) *C. albicans* sor. A. (b) *C. glabrata*. (c) *C. krusei*. (d) *C. lusitaniae*. (e) *C. parapsilosis*. (f) *C. tropicalis*. Em função da semelhança entre algumas espécies, optou-se por apenas 6 das 10 referências. Notar o aspecto seco, rugoso e opaco de *C. krusei* das demais que são cremosas, lisas, lustrosas ou opacas. Fotos obtidas por captura da imagem por apoio da objetiva da câmera fotográfica digital (Samsung Digimax 201) na ocular do microscópio estereoscópio (StudarLab/Labimex) com resolução de 10X. SDA = ágar Sabouraud-dextrose a 4 %, placas de Petri 90 X 15 mm.**



**Figura 21: Macromorfologia de algumas amostras coletadas em SDA por 4 dias a temperatura ambiente. (a) 601/08 uqd. (b) 652/08 uqd e. (c) 43/09 updh d/e. (d) 84/09 uqd pool. (e) 145/09 cut mama. (f) 217/09 updh d/e .** Observar a coloração do branco ao creme e diferentes tamanhos das colônias. A amostra (a) de aspecto seco, rugoso e opaco, difere das demais que são cremosas, lisas e lustrosas. Fotos obtidas por captura da imagem por apoio da objetiva da câmera fotográfica digital (Samsung Digimax 201) na ocular do microscópio estereoscópio (StudarLab/Labimex) com resolução de 10X. SDA = ágar Sabouraud-dextrose a 4 %; placas de Petri 90 X 15 mm; *uqd* = ungueal quirodáctilo; *updh* = ungueal pododáctilo hálux; *cut* = cutâneo; *mama* = seios; *e* = esquerdo; *d/e* = direito e esquerdo.



**Figura 22: Plaqueamento de seis amostras sugestivas de infecções mistas em SDA por 4 dias a temperatura ambiente. (a) 594/08 *upd* pool. (b) 608/08 *updh* d/e. (c) 625/08 *updh* d/e. (d) 11/09 *pdplant* d/e. (e) 22/09 *cut* pool. (f) 49/09 *uqd* pool. Notar a diferença em tamanho, textura e relevo das colônias. Fotos obtidas por captura da imagem por apoio da objetiva da câmera fotográfica digital (Samsung Digimax 201) na ocular do microscópio estereoscópio (StudarLab/Labimex) com resolução de 10X. SDA = ágar Sabouraud-dextrose a 4 %; placas de Petri 90 X 15 mm; *upd* = ungueal pododáctilo; *updh* = ungueal pododáctilo hálux; *pdplant* = pododáctilo plantar; *cut* = cutâneo; *uqd* = ungueal quirodáctilo; d/e = direito e esquerdo.**



**Figura 23: Plaqueamento em SDA por 4 dias a temperatura ambiente de amostras com *Trichosporon* e bactérias.** (a) 399/08 *upd d/e*, *Trichosporon* (1), levedura (2) e bactérias (3) (setas). (b) 546/08 *uqd*, *Trichosporon* (seta). (c) 571/08 *uqd*, bactérias (seta). (d) 662/08 *pdint d/e*, *Trichosporon* (seta). (e) 240/09 *uqd d/e*, leveduras (1) e bactérias (2) (setas), as leveduras se encontram no interior da “faixa” bacteriana. Fotos obtidas por captura da imagem por apoio da objetiva da câmera fotográfica digital (Samsung Digimax 201) na ocular do microscópio estereoscópio (StudarLab/Labimex) com resolução de 10X. SDA = ágar Sabouraud-dextrose a 4 %; placas de Petri 90 X 15 mm; *upd* = ungueal pododáctilo; *uqd* = ungueal quirodáctilo; *pdint* = pododáctilo interdigtal; *d/e* = direito e esquerdo.

O resultado do estoque em água destilada estéril se encontra na figura 24.



Figura 24: Estoque em água destilada estéril em tubos de vidro 100 X 15 mm.

Quanto ao CHROMagar *Candida* os resultados estão nos quadros 7 e 8 e figuras 25 e 26.

**Quadro 7: Coloração das amostras no CHROMagar *Candida*.**

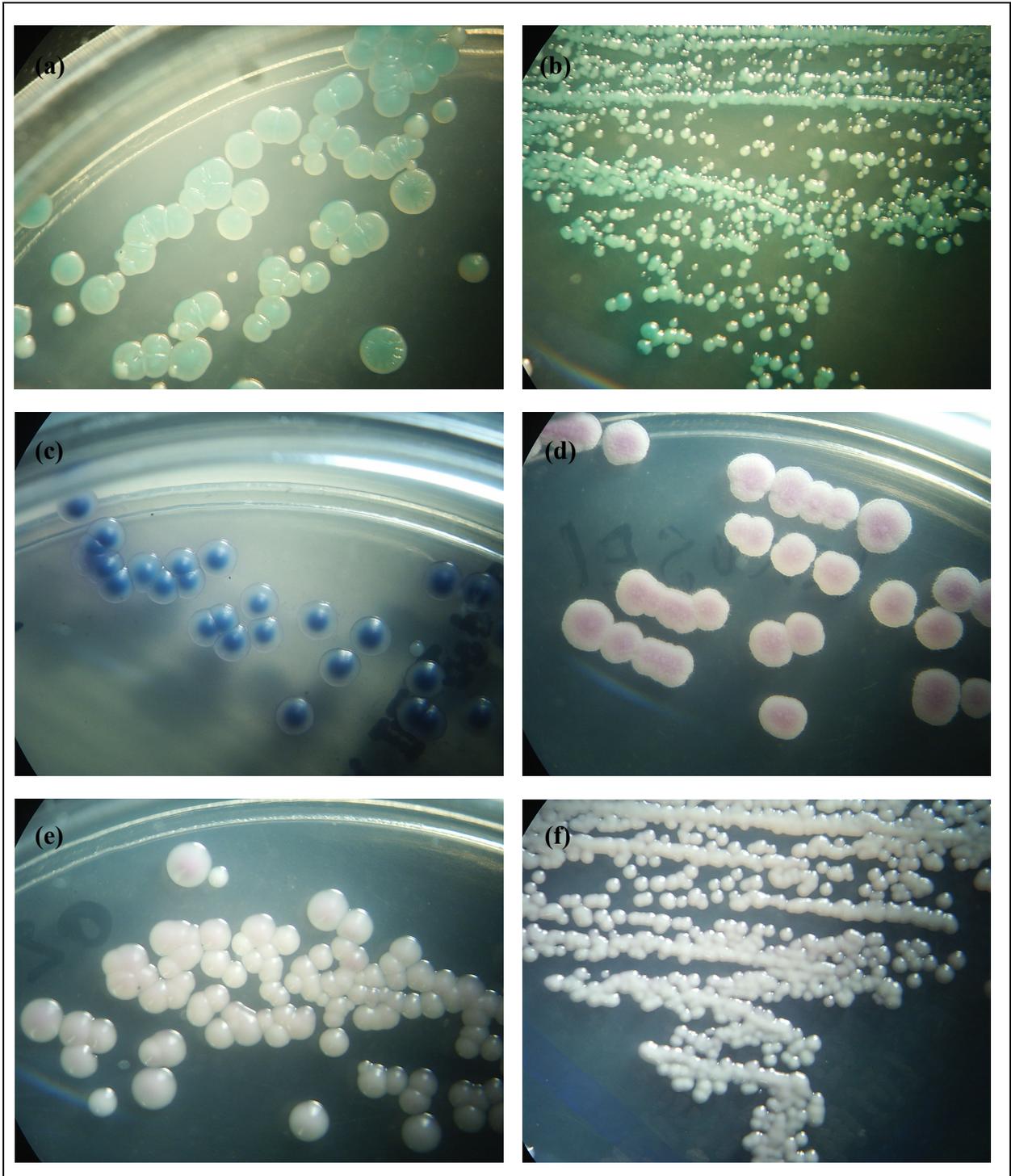
Cor típica das colônias	Número de ocorrências por coloração	Relação em porcentagem
Verdes	13	22,41%
Azuis	2	3,45%
Branças a Rosas	35	61,34%
Violetas*	5	8,62%
Amostras sem crescimento	3	5,17%

\* A coloração violeta não se encontra na bula que acompanha o meio cromogênico.

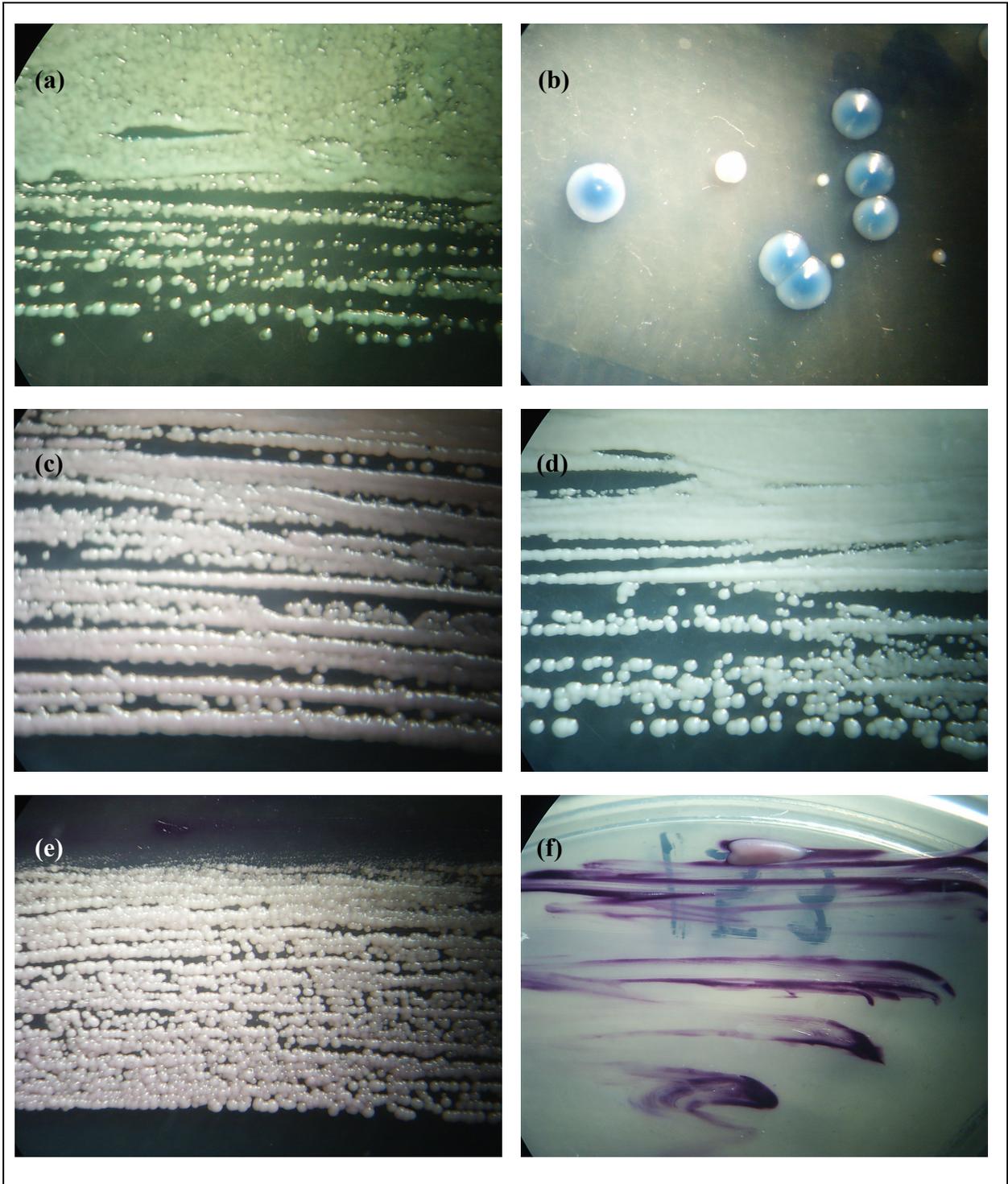
**Quadro 8: Resultados das amostras e referências no CHROMagar Candida.**

Amostra	Coloração	Amostra	Coloração
399/08 upd d/e	Branca	78/09 cut nad *	Branca
400/08 uqpd d/e	Branca	84/09 uqd pool	Verde
519/08 uqd e/B	Branca	107/09 upd	Violeta
519/08 uqd e/V	Verde	111/09 uqd d/e *	Branca
546/08 uqd	Branca	118/09 uqd pool *	Violeta
571/08 uqd	Branca	125/09 pdplant	Branca
594/08 upd pool I *	Branca a Rosa	126/09 pdint	Branca
594/08 upd pool II	Branca a Rosa	136/09 uqd	Verde
601/08 uqd	Branca	140/09 uqd	Verde
606/08 updh d/e	Verde	145/09 cut mama	Branca
607/08 upd	Branca	152/09 updh d/e	Branca
608/08 updh d/e I	Branca a Rosa	153/09 uqd d/e	Violeta
608/08 updh d/e II	Branca	154/09 uqd d	Verde
625/08 updh d/e I	Rosa	175/09 pdplant	Rosa
625/08 updh d/e II	Sem crescimento	184/09 updh d/e	Rosa
652/08 uqd e	Verde	187/09 uqd	Rosa
662/08 pdint d/e	Branca	189/09 updh d	Violeta
666/08 updh d/e	Branca a Rosa	190/09 pdint *	Branca a Rosa
671/08 updh d/e	Branca a Rosa	209/09 uqd	Rosa
11/09 pdplant d/e I	Sem crescimento	217/09 updh d/e	Violeta
11/09 pdplant d/e II	Sem crescimento	218/09 upd	Branca
22/09 cut pool I	Branca a rosa	230/09 updh d/e	Violeta
22/09 cut pool II	Azul	233/09 cut mi	Branca a Rosa
24/09 uqd d/e	Verde	240/09 uqd d/e	Branca a Rosa
26/09 uqd d	Azul	247/09 updh d I	Branca a Rosa
37/09 cut mi	Branca	247/09 updh d II *	Branca a Rosa
43/09 updh d/e	Verde	254/09 cut ccab	Branca
46/09 updh e	Branca	-----	-----
49/09 uqd pool I	Verde	<i>C. albicans</i> sor. A	Verde
49/09 uqd pool II	Branca	<i>C. albicans</i> sor. B	Verde
49/09 upd pool III	Verde	<i>C. dubliniensis</i>	Verde
52/09 uqd *	Branca	<i>C. glabrata</i>	Branca
55/09 cut ing	Verde	<i>C. guilliermondii</i>	Branca
56/09 uqd	Branca	<i>C. kefyr</i>	Branca a Rosa
57/09 uqd d/e	Verde	<i>C. krusei</i>	Rosa Rugosa
60/09 pdint d/e	Branca	<i>C. lusitaniae</i>	Branca
62/09 upd	Branca	<i>C. parapsilosis</i>	Branca
71/09 updh d/e	Branca	<i>C. tropicalis</i>	Azul

\* Amostras removidas da contagem geral por motivo do microrganismo não ser do gênero *Candida*, por não ter sido identificado o gênero ou a espécie ser semelhante quando se pensava em infecção mista.



**Figura 25: CHROMagar *Candida* por 2 dias a 37°C para espécies de referência. (a) *C. albicans* sor. A. (b) *C. dubliniensis*. (c) *C. tropicalis*. (d) *C. krusei*. (e) *C. lusitaniae*. (f) *C. guilliermondii*. As demais produziram colônias do branco ao rosa, salvo *C. albicans* sor. B (verde). Fotos obtidas por captura da imagem por apoio da objetiva da câmera fotográfica digital (Samsung Digimax 201) na ocular do microscópio estereoscópio (StudarLab/Labimex) com resolução de 10X. Placas de Petri 60 X 15 mm.**



**Figura 26: CHROMagar *Candida* por 2 dias a 37°C de algumas amostras coletadas. (a) 49/09 *upd* pool III, verde. (b) 22/09 *cut* pool II, azul. (c) 625/08 *updh* d/e I, rosa. (d) 62/09 *upd*, branca. (e) 594/08 *upd* pool I, branca a rosa. (f) 153/09 *uqd* d/e, violeta, com pouco crescimento e mudança de coloração onde não houve desenvolvimento. Fotos obtidas por captura da imagem por apoio da objetiva da câmera fotográfica digital (Samsung Digimax 201) na ocular do microscópio estereoscópio (StudarLab/Labimex) com resolução de 10X. Placas de Petri 60 X 15 mm; *upd* = ungueal pododáctilo; *cut* = cutâneo; *updh* = ungueal pododáctilo hálux; *uqd* = ungueal quirodáctilo; *d/e* = direito e esquerdo.**

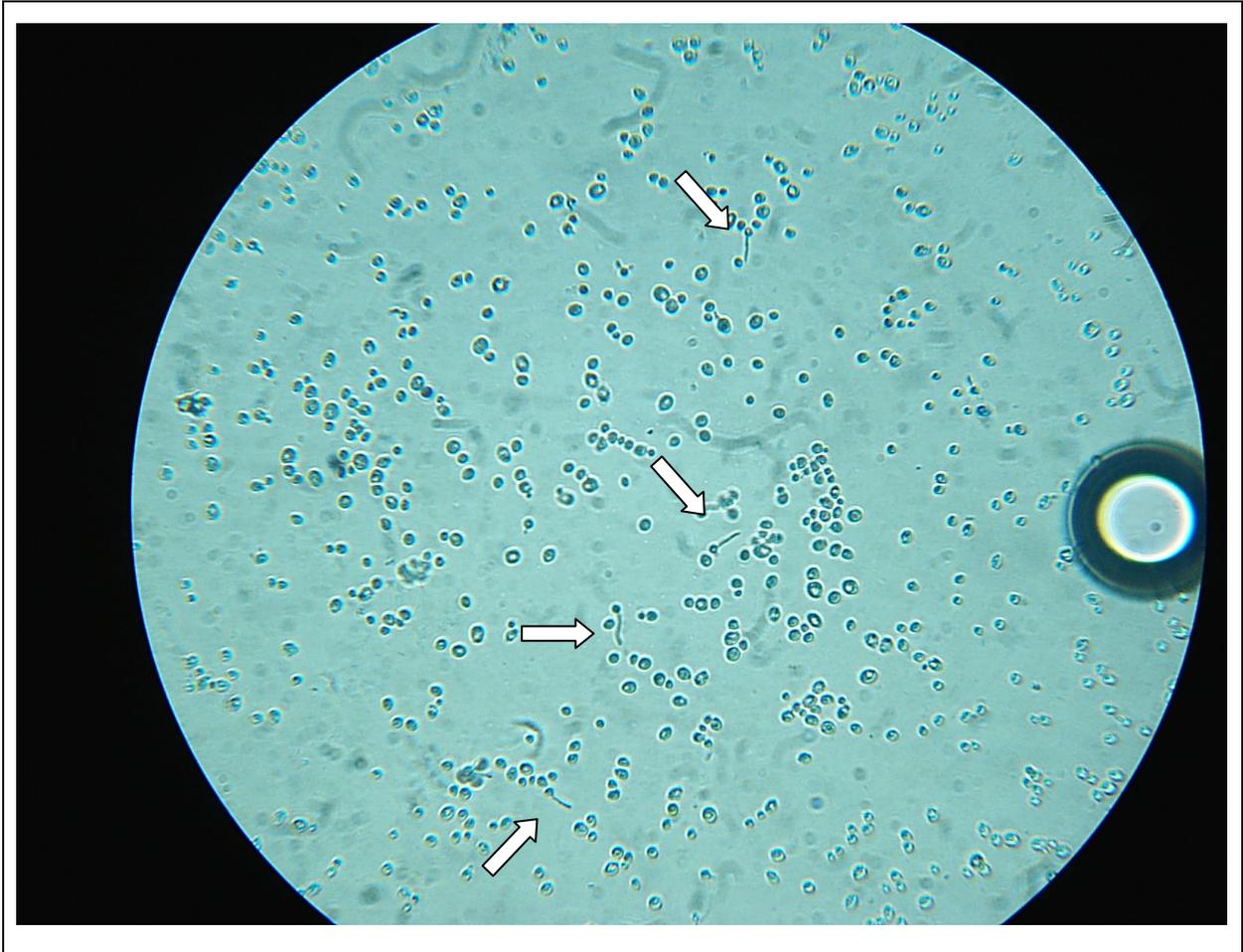
Foi obtido para tubo germinativo positivo 12 (20,69%) amostras, enquanto que em 46 (79,31%) não observamos a presença do mesmo. Dentre as espécies de referência apenas as *C. albicans* e *C.dublinsiensis* produziram o tubo germinativo (Quadro 9 e Figuras 27 e 28).

**Quadro 9: Resultados das amostras e referências para a prova do tubo germinativo.**

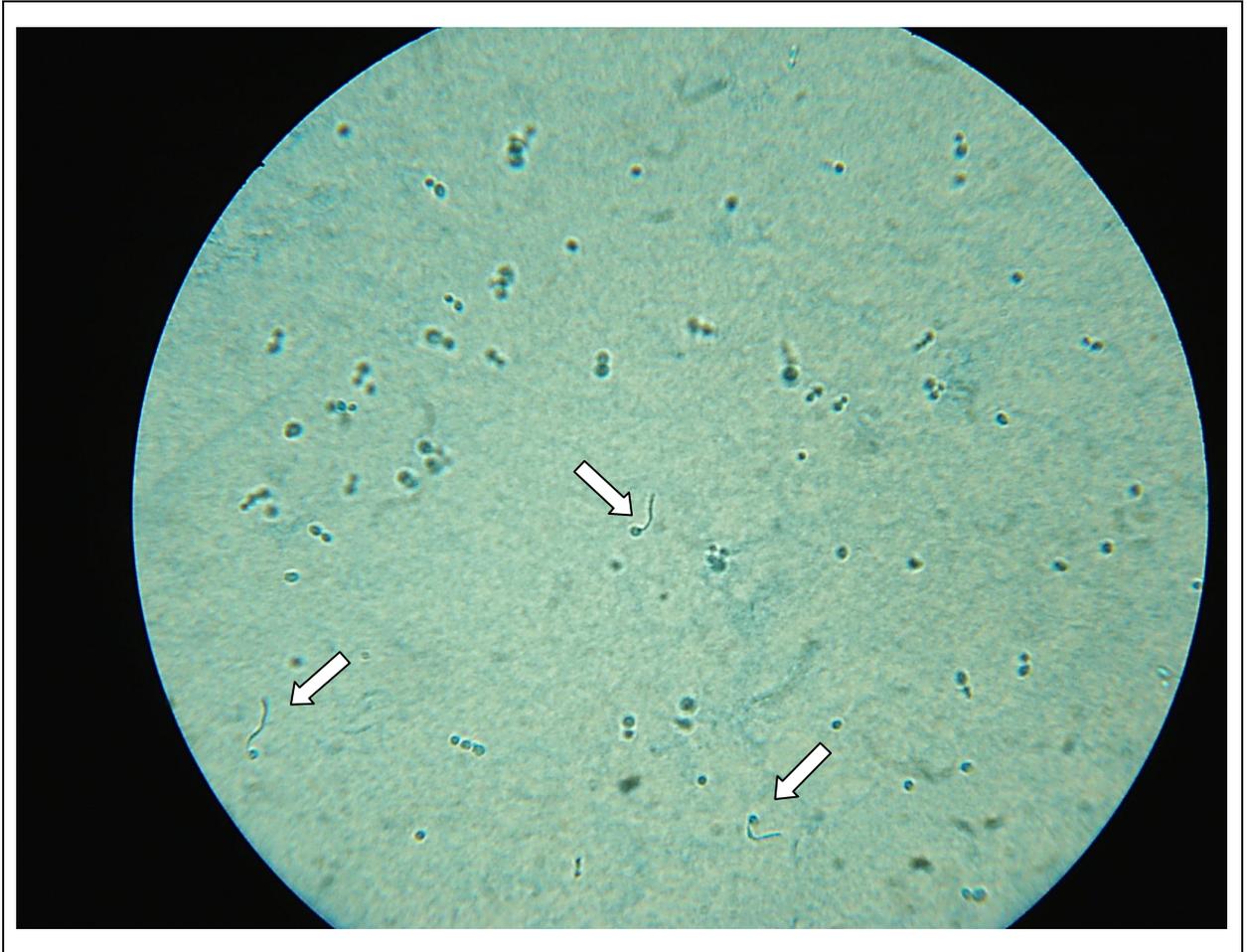
Amostra	Ocorrência	Amostra	Ocorrência
399/08 upd d/e	-	78/09 cut nad *	-
400/08 uqpd d/e	-	84/09 uqd pool	+
519/08 uqd e/B	-	107/09 upd	-
519/08 uqd e/V	+	111/09 uqd d/e *	-
546/08 uqd	-	118/09 uqd pool *	-
571/08 uqd	-	125/09 pdplant	-
594/08 upd pool I *	-	126/09 pdint	-
594/08 upd pool II	-	136/09 uqd	+
601/08 uqd	-	140/09 uqd	+
606/08 updh d/e	+	145/09 cut mama	-
607/08 upd	-	152/09 updh d/e	-
608/08 updh d/e I	-	153/09 uqd d/e	-
608/08 updh d/e II	-	154/09 uqd d	+
625/08 updh d/e I	-	175/09 pdplant	-
625/08 updh d/e II	-	184/09 updh d/e	-
652/08 uqd e	+	187/09 uqd	-
662/08 pdint d/e	-	189/09 updh d	-
666/08 updh d/e	-	190/09 pdint *	-
671/08 updh d/e	-	209/09 uqd	-
11/09 pdplant d/e I	-	217/09 updh d/e	-
11/09 pdplant d/e II	-	218/09 upd	-
22/09 cut pool I	-	230/09 updh d/e	-
22/09 cut pool II	-	233/09 cut mi	-
24/09 uqd d/e	+	240/09 uqd d/e	-
26/09 uqd d	-	247/09 updh d I	-
37/09 cut mi	-	247/09 updh d II *	-
43/09 updh d/e	+	254/09 cut ccab	-
46/09 updh e	-	-----	-----
49/09 uqd pool I	-	<i>C. albicans</i> sor. A	+
49/09 uqd pool II	-	<i>C. albicans</i> sor. B	+
49/09 upd pool III	+	<i>C. dubliniensis</i>	+
52/09 uqd *	-	<i>C. glabrata</i>	-
55/09 cut ing	+	<i>C. guilliermondii</i>	-
56/09 uqd	-	<i>C. kefyr</i>	-
57/09 uqd d/e	+	<i>C. krusei</i>	-
60/09 pdint d/e	-	<i>C. lusitaniae</i>	-
62/09 upd	-	<i>C. parapsilosis</i>	-
71/09 updh d/e	-	<i>C. tropicalis</i>	-

\* Amostras removidas da contagem geral por motivo do microrganismo não ser do gênero *Candida*, por não ter sido identificado o gênero ou a espécie ser semelhante quando se pensava em infecção mista.

(+) = com produção de tubo germinativo; (-) = sem produção de tubo germinativo.



**Figura 27:** Prova do tubo germinativo em 0,5 mL de soro de equino a 37°C por 2 horas, referência *C. albicans* sor. B. Tubos germinativos destacados por setas. Prova feita em tubo de vidro 100 X 15 mm. Foto obtida por captura da imagem por apoio da objetiva da câmera fotográfica digital (Samsung Digimax 201) na ocular do microscópio óptico (StudarLab/Labimex) com resolução de 400X após conjunto lâmina-lamínula corada com azul-algodão.



**Figura 28: Prova do tubo germinativo em 0,5 mL de soro de eqüino a 37°C por 2 horas, amostra 57/09 uqd d/e.** Tubos germinativos destacados por setas. Prova feita em tubo de vidro 100 X 15 mm. Foto obtida por captura da imagem por apoio da objetiva da câmara fotográfica digital (Sansung Digimax 201) na ocular do microscópio óptico (StudarLab/Labimex) com resolução de 400X após conjunto lâmina-laminula corada com azul-algodão. *uqd* = ungueal quirodáctilo direito.

Amostras de coloração verde no CHROMagar *Candida* foram submetidas: (1) a cultura em SDA hipertônico e todas 13 (22,41%) se desenvolveram neste meio; e (2) a cultura em SDA entre 42-45°C e todas 13 (22,41%) se desenvolveram (Quadro 10 e Figuras 29 e 30).

**Quadro 10: Resultados das amostras e referências para o ágar Sabouraud hipertônico e o ágar Sabourud entre 42-45°C.**

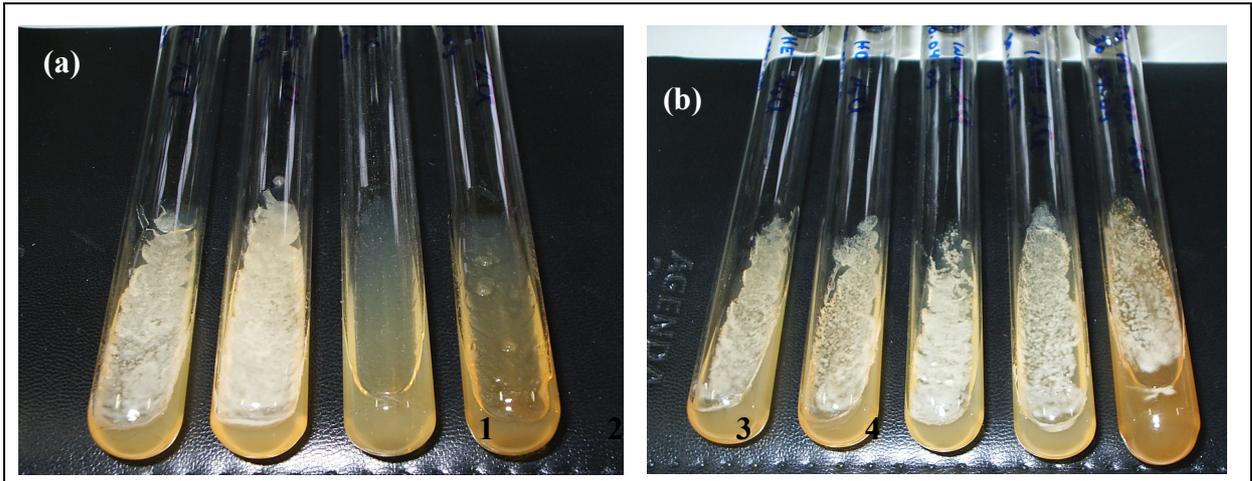
Amostra	Ocorrência	Amostra	Ocorrência
399/08 upd d/e	Nr	78/09 cut nad *	Nr
400/08 uqpd d/e	Nr	84/09 uqd pool	+
519/08 uqd e/B	Nr	107/09 upd	Nr
519/08 uqd e/V	+	111/09 uqd d/e *	Nr
546/08 uqd	Nr	118/09 uqd pool *	Nr
571/08 uqd	Nr	125/09 pdplant	Nr
594/08 upd pool I *	Nr	126/09 pdint	Nr
594/08 upd pool II	Nr	136/09 uqd	+
601/08 uqd	Nr	140/09 uqd	+
606/08 updh d/e	+	145/09 cut mama	Nr
607/08 upd	Nr	152/09 updh d/e	Nr
608/08 updh d/e I	Nr	153/09 uqd d/e	Nr
608/08 updh d/e II	Nr	154/09 uqd d	+
625/08 updh d/e I	Nr	175/09 pdplant	Nr
625/08 updh d/e II	Nr	184/09 updh d/e	Nr
652/08 uqd e	+	187/09 uqd	Nr
662/08 pdint d/e	Nr	189/09 updh d	Nr
666/08 updh d/e	Nr	190/09 pdint *	Nr
671/08 updh d/e	Nr	209/09 uqd	Nr
11/09 pdplant d/e I	Nr	217/09 updh d/e	Nr
11/09 pdplant d/e II	Nr	218/09 upd	Nr
22/09 cut pool I	Nr	230/09 updh d/e	Nr
22/09 cut pool II	Nr	233/09 cut mi	Nr
24/09 uqd d/e	+	240/09 uqd d/e	Nr
26/09 uqd d	Nr	247/09 updh d I	Nr
37/09 cut mi	Nr	247/09 updh d II *	Nr
43/09 updh d/e	+	254/09 cut ccab	Nr
46/09 updh e	Nr	-----	-----
49/09 uqd pool I	+	<i>C. albicans</i> sor. A	+
49/09 uqd pool II	Nr	<i>C. albicans</i> sor. B	+
49/09 upd pool III	+	<i>C. dubliniensis</i>	-
52/09 uqd *	Nr	<i>C. glabrata</i>	Nr
55/09 cut ing	+	<i>C. guilliermondii</i>	Nr
56/09 uqd	Nr	<i>C. kefyr</i>	Nr
57/09 uqd d/e	+	<i>C. krusei</i>	Nr
60/09 pdint d/e	Nr	<i>C. lusitaniae</i>	Nr
62/09 upd	Nr	<i>C. parapsilosis</i>	Nr
71/09 updh d/e	Nr	<i>C. tropicalis</i>	Nr

\* Amostras removidas da contagem geral por motivo do microrganismo não ser do gênero *Candida*, por não ter sido identificado o gênero ou a espécie ser semelhante quando se pensava em infecção mista. Somente as amostras com coloração verde no CHROMagar *Candida* foram submetidas a estas duas etapas, com o intuito de separar *C. albicans* de *C. dubliniensis*. Notar que a única amostra negativa é a espécie de referência *C. dubliniensis*.

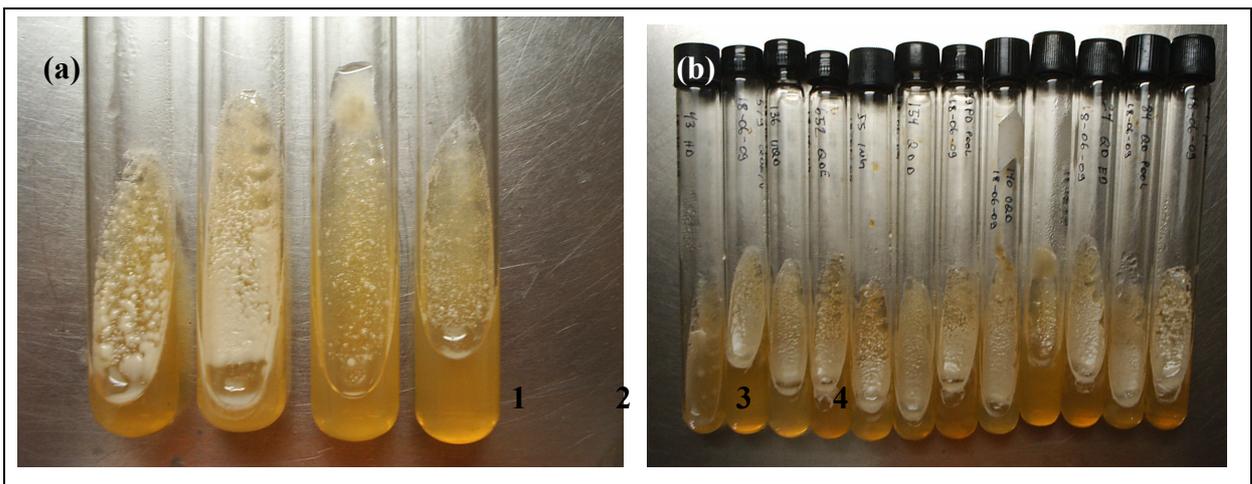
(+) = com desenvolvimento no ágar Sabouraud hipertônico e ágar Sabouraud entre 42-45°C;

(-) = sem desenvolvimento no ágar Sabouraud hipertônico e ágar Sabouraud entre 42-45°C;

(Nr) = não realizado.



**Figura 29:** Culturas em ágar Sabouraud hipertônico (NaCl a 6,5%) por 5 dias a 37°C. (a) Espécies de referência, *C. albicans* sor. A (1); *C. albicans* sor. B (2) e *C. dubliniensis* em duplicata (3 e 4). (b) Algumas das amostras submetidas a esta cultura. Fotos realizadas com câmera fotográfica digital (Samsung Digimax 201). Tubos de 150 X 15 mm; NaCl = Cloreto de sódio.



**Figura 30:** Culturas em ágar Sabouraud por 7 dias entre 42-45°C. (a) Espécies de referência, *C. albicans* sor. A (1); *C. albicans* sor. B (2) e *C. dubliniensis* em duplicata (3 e 4). Notar a diferença de desenvolvimento entre as espécies de referência. (b) Amostras submetidas a esta temperatura. Fotos realizadas com câmera fotográfica digital (Samsung Digimax 201). Tubos de 150 X 15 mm.

Os resultados da bioquímica do VITEK<sup>®</sup> 2 Compact para as amostras e referências se encontram nos quadros 11 a 13. Com relação às espécies de referência o sistema apenas identificou 30% (*C. albicans* sor. B, *C. lusitaniae* e *C. tropicalis*).

**Quadro 11: Distribuição das espécies de acordo com o VITEK<sup>®</sup> 2 Compact.**

Espécies	Número de ocorrências por espécie	Relação em porcentagem
<i>C. parapsilosis</i>	11	18,97%
<i>Candida</i> spp.*	11	18,97%
<i>C. famata</i>	9	15,52%
<i>C. albicans</i>	6	10,34%
<i>C. haemulonii</i>	6	10,34%
<i>S. ciferrii</i>	5	8,62%
<i>C. lipolytica</i>	4	6,90%
<i>C. guilliermondii</i>	3	5,17%
<i>C. tropicalis</i>	3	5,17%

\* 11 amostras acarretaram em dúvida entre duas ou três espécies.

*Stephanoascus ciferrii* é o teleomorfo do anamorfo *Candida ciferrii*.

**Quadro 12: Distribuição das espécies por nível de confiança para o VITEK<sup>®</sup> 2 Compact.**

Nível de confiança	Número de ocorrências por nível de confiança	Relação em porcentagem
Excelente (96 a 99%)	18	31,03%
Muito bom (93 a 95%)	9	15,52%
Bom (89 a 92%)	11	18,97%
Aceitável (85 a 88%)	9	15,52%
Fraca discriminação*	11	18,97%

\* A fraca discriminação ocorre quando há uma identificação multiopcional entre 2 ou 3 microrganismos do mesmo gênero onde totalizam 100%. Além dos níveis citados acima, existem também: o não identificado, que é quando ocorre ausência de pureza e/ou densidade, perfil biológico atípico, dentre outros; e o que não corresponde a nenhum grupo taxonômico na base de dados.

**Quadro 13a: Resultados das amostras e referências para o VITEK® 2 Compact.**

Amostra	Espécie / Nível de confiança
399/08 upd d/e	<i>S. ciferrii</i> / 85%
400/08 uqpd d/e	<i>C. lipolytica</i> / 99%
519/08 uqd e/B	<i>C. famata</i> / 91%
519/08 uqd e/V	<i>C. albicans</i> / 92%
546/08 uqd	<i>C. parapsilosis</i> / 95%
571/08 uqd	<i>C. famata</i> / 88%
594/08 upd pool I *	<i>C. parapsilosis</i> / 86%
594/08 upd pool II	<i>C. parapsilosis</i> / 97%
601/08 uqd	<i>C. lipolytica</i> / 97%
606/08 updh d/e	<i>C. albicans</i> / 99%
607/08 upd	<i>C. parapsilosis</i> / 98%
608/08 updh d/e I	<i>C. famata</i> / 89%
608/08 updh d/e II	<i>S. ciferrii</i> / 85%
625/08 updh d/e I	<i>C. famata</i> / 50% ou <i>C. parapsilosis</i> / 50%
625/08 updh d/e II	<i>C. lipolytica</i> / 88%
652/08 uqd e	<i>C. albicans</i> / 51% ou <i>C. famata</i> / 49%
662/08 pdint d/e	<i>C. parapsilosis</i> / 98%
666/08 updh d/e	<i>C. haemulonii</i> / 93%
671/08 updh d/e	<i>C. famata</i> / 50% ou <i>C. guilliermondii</i> / 50%
11/09 pdplant d/e I	<i>C. haemulonii</i> / 95%
11/09 pdplant d/e II	<i>C. lipolytica</i> / 98%
22/09 cut pool I	<i>C. parapsilosis</i> / 99%
22/09 cut pool II	<i>C. tropicalis</i> / 99%
24/09 uqd d/e	<i>C. albicans</i> / 99%
26/09 uqd d	<i>C. tropicalis</i> / 94%
37/09 cut mi	<i>C. parapsilosis</i> / 99%
43/09 updh d/e	<i>C. albicans</i> / 99%
46/09 updh e	<i>C. parapsilosis</i> / 98%
49/09 uqd pool I	<i>C. tropicalis</i> / 98%
49/09 uqd pool II	<i>C. famata</i> / 50% ou <i>C. parapsilosis</i> / 50%
49/09 upd pool III	<i>C. albicans</i> / 99%
52/09 uqd *	<i>Cryptococcus laurentii</i> / 85%
55/09 cut ing	<i>C. albicans</i> / 99%
56/09 uqd	<i>C. parapsilosis</i> / 98%
57/09 uqd d/e	<i>S. ciferrii</i> / 90%
60/09 pdint d/e	<i>C. famata</i> / 50% ou <i>C. parapsilosis</i> / 50%
62/09 upd	<i>C. famata</i> / 89%
71/09 updh d/e	<i>C. parapsilosis</i> / 89%

\* Amostras removidas da contagem geral por motivo do microrganismo não ser do gênero *Candida*, por não ter sido identificado o gênero ou a espécie ser semelhante quando se pensava em infecção mista.

*Stephanoascus ciferrii* é o teleomorfo do anamorfo *Candida ciferrii*.

Níveis de confiança: Excelente: entre 96 e 99%; Muito bom: entre 93 e 95%; Bom: entre 89 e 92%; Aceitável: entre 85 e 88%; e Fraca discriminação: quando 2 ou 3 escolhas somam 100%.

**Quadro 13b: Resultados das amostras e referências para o VITEK® 2 Compact (continuação).**

Amostra	Espécie / Nível de confiança
78/09 cut nad *	<i>Cryptococcus laurentii</i> / 90%
84/09 uqd pool	<i>S. ciferrii</i> / 94%
107/09 upd	<i>C. haemulonii</i> / 92%
111/09 uqd d/e *	Não identificada
118/09 uqd pool *	Não identificada
125/09 pdplant	<i>C. famata</i> / 87%
126/09 pdint	<i>C. parapsilosis</i> / 96%
136/09 uqd	<i>S. ciferrii</i> / 50% ou <i>C. albicans</i> / 50%
140/09 uqd	<i>S. ciferrii</i> / 90%
145/09 cut mama	<i>C. famata</i> / 49% ou <i>C. parapsilosis</i> / 51%
152/09 updh d/e	<i>C. famata</i> / 50% ou <i>C. parapsilosis</i> / 50%
153/09 uqd d/e	<i>C. haemulonii</i> / 89%
154/09 uqd d	<i>S. ciferrii</i> / 33% ou <i>C. albicans</i> / 33% ou <i>C. famata</i> / 33%
175/09 pdplant	<i>C. famata</i> / 89%
184/09 updh d/e	<i>C. famata</i> / 85%
187/09 uqd	<i>C. guilliermondii</i> / 86%
189/09 updh d	<i>C. haemulonii</i> / 94%
190/09 pdint *	<i>Trichosporon mucoides</i> / 98%
209/09 uqd	<i>C. famata</i> / 95%
217/09 updh d/e	<i>C. haemulonii</i> / 87%
218/09 upd	<i>C. guilliermondii</i> / 94%
230/09 updh d/e	<i>S. ciferrii</i> / 49% ou <i>C. haemulonii</i> / 51%
233/09 cut mi	<i>C. parapsilosis</i> / 91%
240/09 uqd d/e	<i>C. famata</i> / 87%
247/09 updh d I	<i>C. guilliermondii</i> / 93%
247/09 updh d II *	<i>Trichosporon asahii</i> / 85%
254/09 cut ccab	<i>C. famata</i> / 50% ou <i>C. parapsilosis</i> / 50%
-----	-----
<i>C. albicans</i> sor. A	<i>C. guilliermondii</i> / 85%
<i>C. albicans</i> sor. B	<i>C. albicans</i> / 94%
<i>C. dubliniensis</i>	<i>S. ciferrii</i> / 85%
<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i> / 93%
<i>C. guilliermondii</i>	Não identificada
<i>C. kefyr</i>	<i>S. ciferrii</i> / 85%
<i>C. krusei</i>	<i>C. guilliermondii</i> / 95%
<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. lusitaniae</i> / 97%
<i>C. parapsilosis</i>	Não identificada
<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i> / 98%

\* Amostras removidas da contagem geral por motivo do microrganismo não ser do gênero *Candida*, por não ter sido identificado o gênero ou a espécie ser semelhante quando se pensava em infecção mista.

*Stephanoascus ciferrii* é o teleomorfo do anamorfo *Candida ciferrii*.

Níveis de confiança: Excelente: entre 96 e 99%; Muito bom: entre 93 e 95%; Bom: entre 89 e 92%; Aceitável: entre 85 e 88%; e Fraca discriminação: quando 2 ou 3 escolhas somam 100%.

Nos quadros 14 a 16 cruzamos os resultados do VITEK<sup>®</sup> 2 *Compact* com os resultados do ágar Mycosel e CHROMagar *Candida*.

**Quadro 14: Resultados do VITEK<sup>®</sup> 2 *Compact* e ágar Mycosel.**

Resultados do VITEK <sup>®</sup> 2 <i>Compact</i>	Resultados no ágar Mycosel	
	Resistentes	Sensíveis
<i>C. parapsilosis</i> (11)	3	8
<i>Candida</i> spp. (11)	6	5
<i>C. famata</i> (9)	3	6
<i>C. albicans</i> (6)	6	0
<i>C. haemulonii</i> (6)	5	1
<i>S. ciferrii</i> * (5)	5	0
<i>C. lipolytica</i> (4)	4	0
<i>C. guilliermondii</i> (3)	2	1
<i>C. tropicalis</i> (3)	2	1

\* *Stephanoascus ciferrii* é o teleomorfo do anamorfo *Candida ciferrii*.

Para o cruzamento dos resultados do VITEK<sup>®</sup> 2 *Compact* e o Mycosel apenas cinco dos espécimes identificados ao nível de espécie se comportaram de forma diferente da literatura, foram: três espécimes de *C. parapsilosis*, uma de *C. haemulonii* e uma de *C. guilliermondii*.

**Quadro 15: Resultados do VITEK<sup>®</sup> 2 *Compact* e CHROMagar *Candida*.**

Resultados do VITEK <sup>®</sup> 2 <i>Compact</i>	Resultados no CHROMagar <i>Candida</i>				
	Verdes (13)	Azuis (2)	Branças a Rosas (35)	Violetas (5)	Sem crescimento (3)
<i>C. parapsilosis</i> (11)	0	0	11	0	0
<i>Candida</i> spp. (11)	3	0	7	1	0
<i>C. famata</i> (9)	0	0	9	0	0
<i>C. albicans</i> (6)	6	0	0	0	0
<i>C. haemulonii</i> (6)	0	0	1	4	1
<i>S. ciferrii</i> * (5)	3	0	2	0	0
<i>C. lipolytica</i> (4)	0	0	2	0	2
<i>C. guilliermondii</i> (3)	0	0	3	0	0
<i>C. tropicalis</i> (3)	1	2	0	0	0

\* *Stephanoascus ciferrii* é o teleomorfo do anamorfo *Candida ciferrii*.

Dos resultados cruzados entre a bioquímica do VITEK<sup>®</sup> 2 *Compact* e o meio cromogênico, das amostras identificadas ao nível de espécie, foram observados que: (1) houve uma coloração não preconizada pelo fabricante, a violeta; (2) três espécimes (uma *C. haemulonii* e duas *C. lipolytica*) não demonstraram desenvolvimento algum quando no meio cromogênico; (3) quatro espécimes de *C. haemulonii* evidenciaram na cor violeta com pouco ou nenhum crescimento; e (5) três *S. ciferrii* e uma *C. tropicalis* se pigmentaram de cor verde.

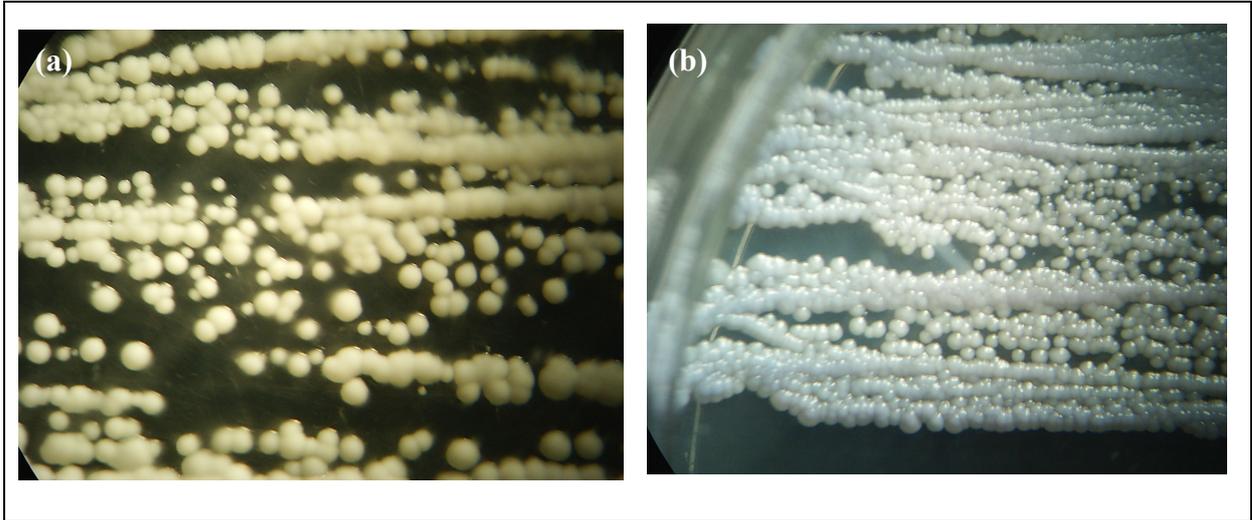
**Quadro 16: Resultados de fraca discriminação do VITEK<sup>®</sup> 2 *Compact* e CHROMagar *Candida*.**

Amostras	Resultados do VITEK <sup>®</sup> 2 <i>Compact</i>	Resultados no CHROMagar <i>Candida</i>
625/08 <i>updh d/e I</i>	<i>C. famata</i> ou <i>C. parapsilosis</i>	Rosa
652/08 <i>uqd e</i>	<i>C. albicans</i> ou <i>C. famata</i>	Verde
671/08 <i>updh d/e</i>	<i>C. famata</i> ou <i>C. guilliermondii</i>	Branca a Rosa
49/09 <i>uqd pool II</i>	<i>C. famata</i> ou <i>C. parapsilosis</i>	Branca
60/09 <i>pdint d/e</i>	<i>C. famata</i> ou <i>C. parapsilosis</i>	Branca
136/09 <i>uqd</i>	<i>S. ciferrii</i> ou <i>C. albicans</i>	Verde
145/09 <i>cut mama</i>	<i>C. famata</i> ou <i>C. parapsilosis</i>	Branca
152/09 <i>updh d/e</i>	<i>C. famata</i> ou <i>C. parapsilosis</i>	Branca
154/09 <i>uqd d</i>	<i>S. ciferrii</i> , <i>C. albicans</i> ou <i>C. famata</i>	Verde
230/09 <i>updh d/e</i>	<i>S. ciferrii</i> ou <i>C. haemulonii</i>	Violeta
254/09 <i>cut ccab</i>	<i>C. famata</i> ou <i>C. parapsilosis</i>	Branca

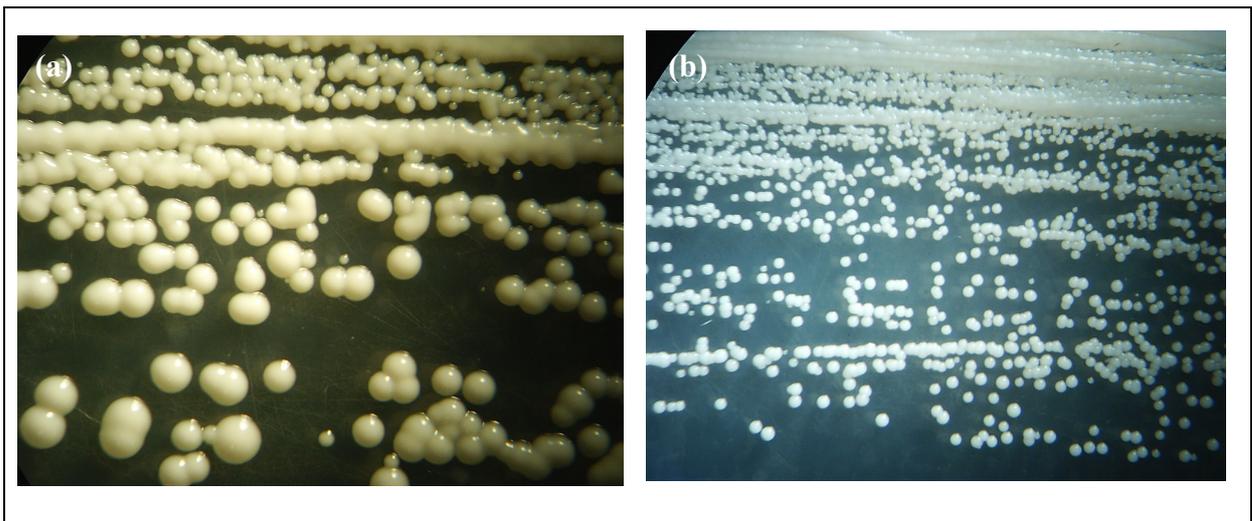
*updh* = ungueal pododáctolo hálux; *uqd* = ungueal quirodáctilo; *pdint* = pododáctilo interdigital; *cut* = cutâneo; *d/e* = direito e esquerdo; *e* = esquerdo; *mama* = seios; *d* = direito; *ccab* = couro cabeludo.

Para os resultados de fraca discriminação do VITEK<sup>®</sup> 2 *Compact* e o meio cromogênico foram observados: (1) seis amostras ficaram entre ser *C. famata* ou *C. parapsilosis* com coloração branca/rosa; (2) a amostra 652/08 *uqd e* é sugestiva de *C. albicans* por conta da cor verde no meio cromogênico; (3) de acordo com nossos resultados a amostra 230/09 *updh d/e* é sugestiva de *C. haemulonii* por conta da coloração violeta; e (4) as demais amostras a coloração das colônias no CHROMagar *Candida* não soluciona a dúvida do VITEK<sup>®</sup> 2 *Compact*.

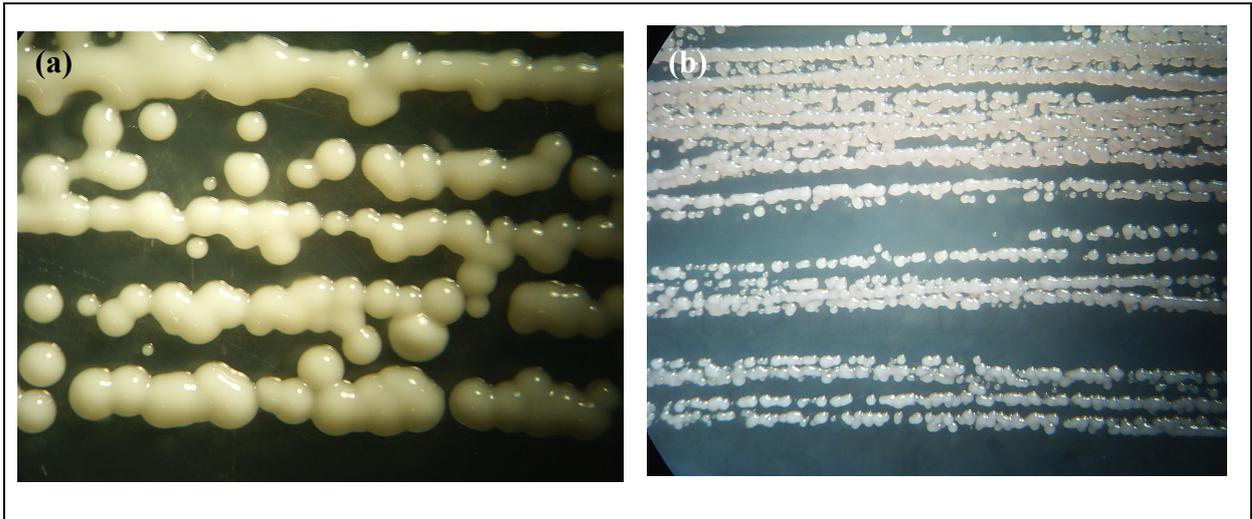
As figuras 31 a 34 apresentam as quatro amostras identificadas presuntivamente como espécies do gênero *Candida* não confirmadas por este estudo, assim sendo removidas da contagem geral das amostras para candidíase.



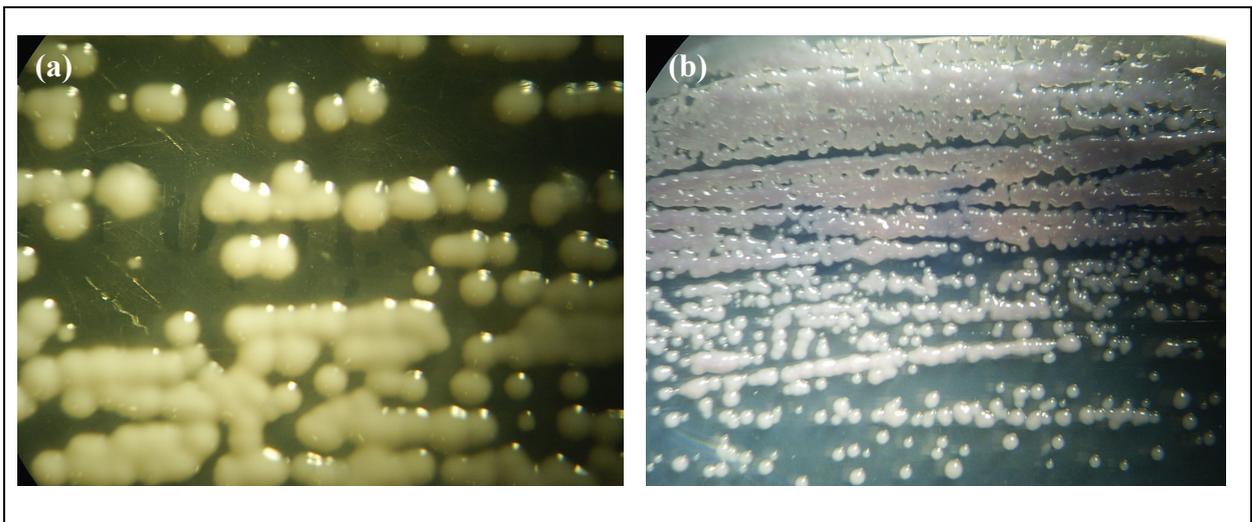
**Figura 31: Amostra 52/09 *uqd* identificada como *Cryptococcus laurentii* pelo VITEK<sup>®</sup> 2 Compact. (a)** 4 dias a temperatura ambiente em SDA. Placas de Petri 90x15mm. **(b)** 2 dias a 37°C em CHROMagar *Candida*. Placas de Petri 60x15mm. Fotos obtidas por captura da imagem por apoio da objetiva da câmera fotográfica digital (Samsung Digimax 201) na ocular do microscópio estereoscópio (StudarLab/Labimex) com resolução de 10X. SDA = ágar Sabouraud-dextrose a 4%; *uqd* = ungueal quirodáctilo.



**Figura 32: Amostra 78/09 *cut nad* identificada como *Cryptococcus laurentii* pelo VITEK<sup>®</sup> 2 Compact. (a)** 4 dias a temperatura ambiente em SDA. Placas de Petri 90x15mm. **(b)** 2 dias a 37°C em CHROMagar *Candida*. Placas de Petri 60x15mm. Fotos obtidas por captura da imagem por apoio da objetiva da câmera fotográfica digital (Samsung Digimax 201) na ocular do microscópio estereoscópio (StudarLab/Labimex) com resolução de 10X. SDA = ágar Sabouraud-dextrose a 4%; *cut* = cutâneo; *nad* = nádegas.

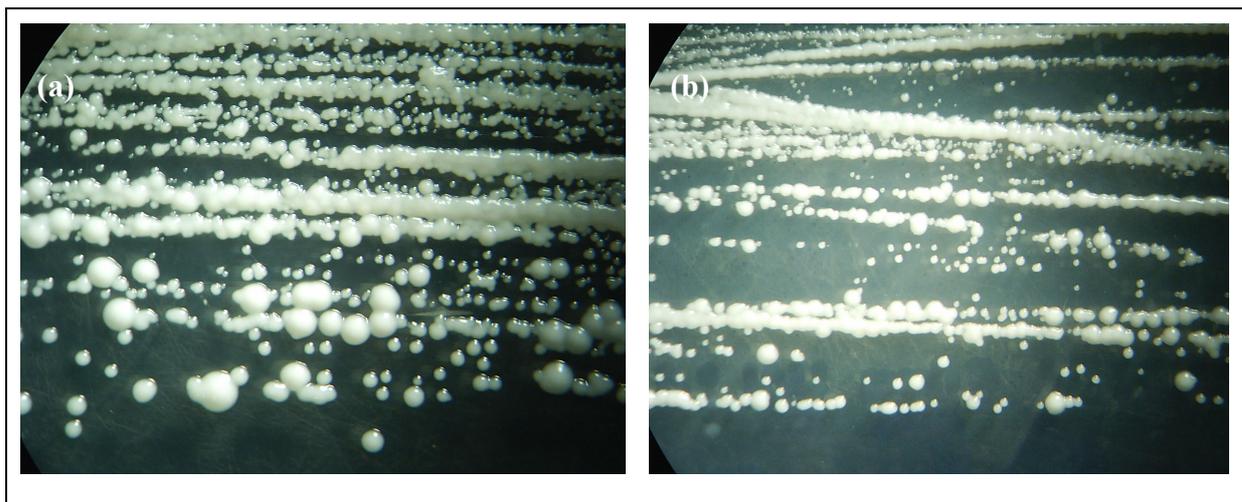


**Figura 33: Amostra 190/09 *pdint* identificada como *Trichosporon mucoides* pelo VITEK<sup>®</sup> 2 Compact. (a) 4 dias a temperatura ambiente em SDA. Placas de Petri 90x15mm. (b) 2 dias a 37°C em CHROMagar *Candida*. Placas de Petri 60x15mm. Fotos obtidas por captura da imagem por apoio da objetiva da câmera fotográfica digital (Samsung Digimax 201) na ocular do microscópio estereoscópio (StudarLab/Labimex) com resolução de 10X. SDA = ágar Sabouraud-dextrose a 4%; *pdint* = pododáctilo interdigital.**

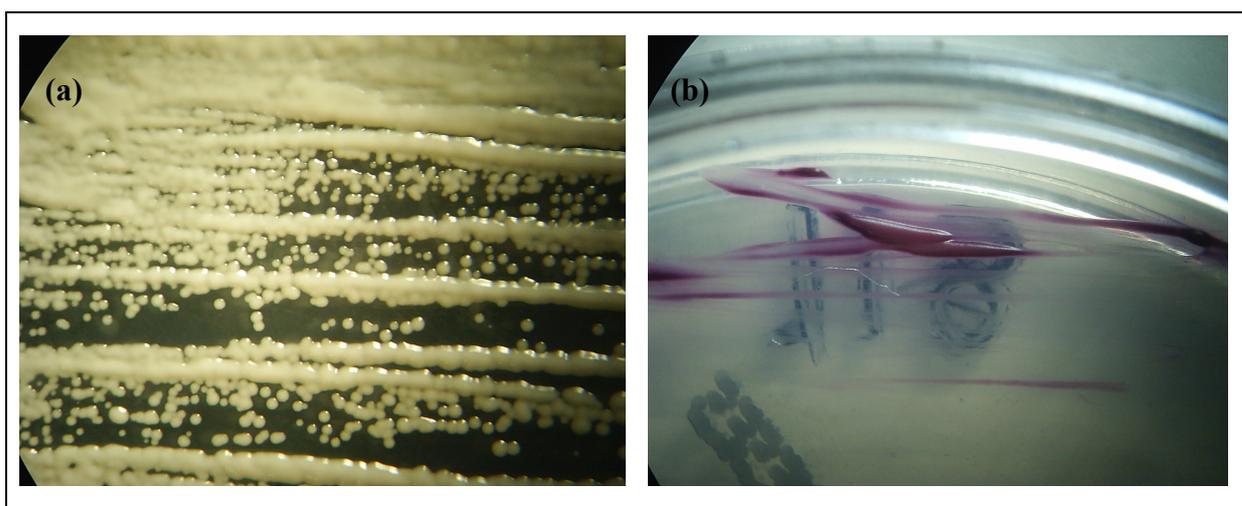


**Figura 34: Amostra 247/09 *updh d II* identificada como *Trichosporon asahii* pelo VITEK<sup>®</sup> 2 Compact. (a) 4 dias a temperatura ambiente em SDA. Placas de Petri 90x15mm. (b) 2 dias a 37°C em CHROMagar *Candida*. Placas de Petri 60x15mm. Fotos obtidas por captura da imagem por apoio da objetiva da câmera fotográfica digital (Samsung Digimax 201) na ocular do microscópio estereoscópio (StudarLab/Labimex) com resolução de 10X. SDA = ágar Sabouraud-dextrose a 4%; *pdint* = pododáctilo interdigital.**

As figuras 35 e 36 mostram as duas amostras identificadas presuntivamente como espécies do gênero *Candida* não identificadas pela bioquímica do VITEK<sup>®</sup> 2 Compact, assim sendo removidas da contagem geral das amostras para candidíase.



**Figura 35: Amostra 111/09 *uqd* de não identificada pelo VITEK<sup>®</sup> 2 Compact. (a)** 4 dias a temperatura ambiente em SDA. Placas de Petri 90x15mm. **(b)** 2 dias a 37°C em CHROMagar *Candida*. Placas de Petri 60x15mm. Fotos obtidas por captura da imagem por apoio da objetiva da câmera fotográfica digital (Samsung Digimax 201) na ocular do microscópio estereoscópio (StudarLab/Labimex) com resolução de 10X. SDA = ágar Sabouraud-dextrose a 4%; *uqd* = ungueal quirodáctilo.



**Figura 36: Amostra 118/09 *uqd pool* não identificada pelo VITEK<sup>®</sup> 2 Compact. (a)** 4 dias a temperatura ambiente em SDA. Placas de Petri 90x15mm. **(b)** 2 dias a 37°C em CHROMagar *Candida*. Placas de Petri 60x15mm. Fotos obtidas por captura da imagem por apoio da objetiva da câmera fotográfica digital (Samsung Digimax 201) na ocular do microscópio estereoscópio (StudarLab/Labimex) com resolução de 10X. SDA = ágar Sabouraud-dextrose a 4%; *uqd* = ungueal quirodáctilo.

Nos quadros 17 e 18 encontramos todas as amostras e referências cruzadas com as técnicas a partir do BHI acrescido de cloranfenicol.

**Quadro 17a: Amostras e técnicas realizadas após exame direto e cultura inicial.**

Amostras 2008	BHI Clo.	SDA Tubo II	MYA	SDA Placa	H <sub>2</sub> O destilada	Chromagar <i>Candida</i>	TG	SDA NaCl	SDA 42-45°C	Vitek <sup>®</sup> 2 Compact (NC em %)	Idade e Gênero
399/08 upd d/e	+ B	+ T	+	L T B	+	branca	Neg	nr	nr	<i>S. cifferri</i> 85%	72 M
400/08 uqpd d/e	+ B	+ T	+	L	+	branca	Neg	nr	nr	<i>C. lipolytica</i> 99%	73 F
519/08 uqd e/B	+ B	+	+	L	+	branca	Neg	nr	nr	<i>C. famata</i> 91%	62 F
519/08 uqd e/V	+ B	+	+	L	+	verde	+	+	+	<i>C. albicans</i> 92%	62 F
546/08 uqd	+ B	+ T	Neg	L T	+	branca	Neg	nr	nr	<i>C. parapsilosis</i> 95%	51 F
571/08 uqd	+ BB	+	+	L B	+	branca	Neg	nr	nr	<i>C. famata</i> 88%	33 F
594/08 upd pool I	+ B	+ T	Neg	L	+	branca/rosa	Neg	nr	nr	<i>C. parapsilosis</i> 86%	08 M
594/08 upd pool II	+ B	+ T	Neg	L	+	branca/rosa	Neg	nr	nr	<i>C. parapsilosis</i> 97%	08 M
601/08 uqd	+ BB	+	+	L	+	branca	Neg	nr	nr	<i>C. lipolytica</i> 97%	55 M
606/08 updh d/e	+ B	+ T	+	L	+	verde	+	+	+	<i>C. albicans</i> 99%	42 F
607/08 upd	+ BB	+	Neg	L	+	branca	Neg	nr	nr	<i>C. parapsilosis</i> 98%	66 M
608/08 updh d/e I	+ B	+ T	Neg	L	+	branca/rosa	Neg	nr	nr	<i>C. famata</i> 89%	39 F
608/08 updh d/e II	+ B	+ T	+	L	+	branca	Neg	nr	nr	<i>S. cifferrii</i> 85%	39 F
625/08 updh d/e I	+ B	+ T	Neg	L	+	rosa	Neg	nr	nr	<i>C. famata</i> 50% ou <i>C. parapsilosis</i> 50%	65 F
625/08 updh d/e II	+ B	+ T	+	L	+	s/c	Neg	nr	nr	<i>C. lipolytica</i> 88%	65 F
652/08 uqd e	+ B	+	+	L	+	verde	+	+	+	<i>C. albicans</i> 51% ou <i>C. famata</i> 49%	57 F
662/08 pdint d/e	+ BB	+ T	Neg	L T	+	branca	Neg	nr	nr	<i>C. parapsilosis</i> 98%	50 F
666/08 updh d/e	+ B	+	+	L	+	branca/rosa	Neg	nr	nr	<i>C. haemulonii</i> 93%	67 F
671/08 updh d/e	+ BB	+ T	+	L	+	branca/rosa	Neg	nr	nr	<i>C. famata</i> 50% ou <i>C. guilliermondii</i> 50%	33 F

BHI Clo. = infusão cérebro coração acrescido de cloranfenicol; SDA = ágar Sabouraud-dextrose a 4%; MYA = ágar Mycosel; H<sub>2</sub>O destilada = estoque em água destilada estéril; TG = tubo germinativo; NaCl = cloreto de sódio.

(+) = positivo; Neg = negativo; B = presença de bactéria; BB = persistência bacteriana; T = presença de *Trichosporon*; L = levedura; s/c = sem crescimento; nr = não realizada; NC = nível de confiança; M = masculino; F = feminino.

uqd = ungueal quirodáctilo; upd = ungueal pododáctilo; updh = ungueal pododáctilo hálux; uqpd = ungueal quiro e pododáctilo; pdint = pododáctilo interdigital; pdplant = pododáctilo plantar; cut = cutâneo; pool = mistura; mi = membro inferior; nad = nádegas; ing = inguinal; mama = mamário; ccab = coro cabeludo; d = direito; e = esquerdo; d/e = direito e esquerdo.

**Quadro 17b: Amostras e técnicas realizadas após exame direto e cultura inicial (continuação).**

Amostras 2009	BHI Clo.	SDA Tubo II	MYA	SDA Placa	H <sub>2</sub> O destilada	Chromagar <i>Candida</i>	TG	SDA NaCl	SDA 42-45°C	Vitek <sup>®</sup> 2 Compact (NC em %)	Idade e Gênero
11/09 pdplant d/e I	+ B	+ T	+	L	+	s/c	Neg	nr	nr	<i>C. haemulonii</i> 95%	38 M
11/09 pdplant d/e II	+ B	+ T	+	L	+	s/c	Neg	nr	nr	<i>C. lipolytica</i> 98%	38 M
22/09 cut pool I	+ B	+	Neg	L	+	branca/rosa	Neg	nr	nr	<i>C. parapsilosis</i> 99%	30 F
22/09 cut pool II	+ B	+	+	L	+	azul	Neg	nr	nr	<i>C. tropicalis</i> 99%	30 F
24/09 uqd d/e	+	+	+	L	+	verde	+	+	+	<i>C. albicans</i> 99%	54 M
26/09 uqd d	+ BB	+	+	L	+	azul	Neg	nr	nr	<i>C. tropicalis</i> 94%	81 F
37/09 cut mi	+ B	+	Neg	L	+	branca	Neg	nr	nr	<i>C. parapsilosis</i> 99%	58 F
43/09 updh d/e	+	+	+	L	+	verde	+	+	+	<i>C. albicans</i> 99%	65 F
46/09 updh e	+	+	+	L	+	branca	Neg	nr	nr	<i>C. parapsilosis</i> 98%	46 F
49/09 uqd pool I	+ BB	+	Neg	L	+	verde	Neg	+	+	<i>C. tropicalis</i> 98%	54 F
49/09 uqd pool II	+ B	+	+	L	+	branca	Neg	nr	nr	<i>C. famata</i> 50% ou <i>C. parapsilosis</i> 50%	54 F
49/09 upd pool III	+ B	+	+	L	+	verde	+	+	+	<i>C. albicans</i> 99%	54 F
52/09 uqd	+	+	+	L	+	branca	Neg	nr	nr	<i>Cryptococcus laurentii</i> 85%	11 F
55/09 cut ing	+ BB	+	+	L	+	verde	+	+	+	<i>C. albicans</i> 99%	47 F
56/09 uqd	+ BB	+	+	L	+	branca	Neg	nr	nr	<i>C. parapsilosis</i> 98%	27 F
57/09 uqd d/e	+ B	+	+	L	+	verde	+	+	+	<i>S. ciferrii</i> 90%	76 F
60/09 pdint d/e	+	+ T	+	L	+	branca	Neg	nr	nr	<i>C. famata</i> 50% ou <i>C. parapsilosis</i> 50%	30 M
62/09 upd	+ BB	+	Neg	L	+	branca	Neg	nr	nr	<i>C. famata</i> 89%	85 F
71/09 updh d/e	+ B	+	+	L	+	branca	Neg	nr	nr	<i>C. parapsilosis</i> 89%	58 F
78/09 cut nad	+ B	+	Neg	L	+	branca	Neg	nr	nr	<i>Cryptococcus laurentii</i> 90%	11 F
84/09 uqd pool	+ BB	+	+	L	+	verde	+	+	+	<i>S. ciferrii</i> 94%	49 F
107/09 upd	+	+	+	L	+	violeta	Neg	nr	nr	<i>C. haemulonii</i> 92%	32 M
111/09 uqd d/e	+ B	+	+	L	+	branca	Neg	nr	nr	Não identificada	54 F
118/09 uqd pool	+	+	+	L	+	violeta	Neg	nr	nr	Não identificada	57 F
125/09 pdplant	+	+	+	L	+	branca	Neg	nr	nr	<i>C. famata</i> 87 %	59 F

BHI Clo. = infusão cérebro coração acrescido de cloranfenicol; SDA = ágar Sabouraud-dextrose a 4%; MYA = ágar Mycosel; H<sub>2</sub>O destilada = estoque em água destilada estéril; TG = tubo germinativo; NaCl = cloreto de sódio.

(+) = positivo; Neg = negativo; B = presença de bactéria; BB = persistência bacteriana; T = presença de *Trichosporon*; L = levedura; s/c = sem crescimento; nr = não realizada; NC = nível de confiança; M = masculino; F = feminino.

uqd = ungueal quirodáctilo; upd = ungueal pododáctilo; updh = ungueal pododáctilo hálux; uqpd = ungueal quiro e pododáctilo; pdint = pododáctilo interdigital; pdplant = pododáctilo plantar; cut = cutâneo; pool = mistura; mi = membro inferior; nad = nádegas; ing = inguinal; mama = mamário; ccab = coro cabeludo; d = direito; e = esquerdo; d/e = direito e esquerdo.

**Quadro 17c: Amostras e técnicas realizadas após exame direto e cultura inicial (continuação).**

Amostras 2009	BHI Clo.	SDA Tubo II	MYA	SDA Placa	H <sub>2</sub> O destilada	Chromagar <i>Candida</i>	TG	SDA NaCl	SDA 42-45°C	Vitek <sup>®</sup> 2 Compact (NC em %)	Idade e Gênero
126/09 pdint	+	+	Neg	L	+	branca	Neg	nr	nr	<i>C. parapsilosis</i> 96%	30 F
136/09 uqd	+ B	+	+	L	+	verde	+	+	+	<i>S. ciferrii</i> 50% ou <i>C. albicans</i> 50%	79 F
140/09 uqd	+ B	+	+	L	+	verde	+	+	+	<i>S. ciferrii</i> 90%	86 F
145/09 cut mama	+	+	Neg	L	+	branca	Neg	nr	nr	<i>C. famata</i> 49% ou <i>C. parapsilosis</i> 51%	73 F
152/09 updh d/e	+	+	Neg	L	+	branca	Neg	nr	nr	<i>C. famata</i> 50% ou <i>C. parapsilosis</i> 50%	50 F
153/09 uqd d/e	+	+	+	L	+	violeta	Neg	nr	nr	<i>C. haemulonii</i> 89%	28 M
154/09 uqd d	+	+	+	L	+	verde	+	+	+	<i>S. ciferrii</i> 33% ou <i>C. albicans</i> 33% ou <i>C. famata</i> 33%	62 F
175/09 pdplant	+	+	Neg	L	+	rosa	Neg	nr	nr	<i>C. famata</i> 89%	50 M
184/09 updh d/e	+	+	Neg	L	+	rosa	Neg	nr	nr	<i>C. famata</i> 85%	58 F
187/09 uqd	+ BB	+	Neg	L	+	rosa	Neg	nr	nr	<i>C. guilliermondii</i> 86%	71 F
189/09 updh d	+	+	+	L	+	violeta	Neg	nr	nr	<i>C. haemulonii</i> 94%	48 F
190/09 pdint	+	+	+	L	+	branca/rosa	Neg	nr	nr	<i>Trichosporon mucoides</i> 98%	63 F
209/09 uqd	+	+	Neg	L	+	rosa	Neg	nr	nr	<i>C. famata</i> 95%	61 F
217/09 updh d/e	+	+	Neg	L	+	violeta	Neg	nr	nr	<i>C. haemulonii</i> 87%	54 F
218/09 upd	+	+	+	L	+	branca	Neg	nr	nr	<i>C. guilliermondii</i> 94%	32 F
230/09 updh d/e	+	+	Neg	L	+	violeta	Neg	nr	nr	<i>S. ciferrii</i> 49% ou <i>C. haemulonii</i> 51%	65 F
233/09 cut mi	+	+	Neg	L	+	branca/rosa	Neg	nr	nr	<i>C. parapsilosis</i> 91%	58 M
240/09 uqd d/e	+ BB	+	Neg	L B	+	branca/rosa	Neg	nr	nr	<i>C. famata</i> 87%	39 F
247/09 updh d I	+ BB	+ T	+	L	+	branca/rosa	Neg	nr	nr	<i>C. guilliermondii</i> 93%	35 M
247/09 updh d II	+	+	+	L	+	branca/rosa	Neg	nr	nr	<i>Trichosporon asahii</i> 85%	35 M
254/09 cut ccab	+	+	Neg	L	+	branca	Neg	nr	nr	<i>C. famata</i> 50% ou <i>C. parapsilosis</i> 50%	14 M

BHI Clo. = infusão cérebro coração acrescido de cloranfenicol; SDA = ágar Sabouraud-dextrose a 4%; MYA = ágar Mycosel; H<sub>2</sub>O destilada = estoque em água destilada estéril; TG = tubo germinativo; NaCl = cloreto de sódio.

(+) = positivo; Neg = negativo; B = presença de bactéria; BB = persistência bacteriana; T = presença de *Trichosporon*; L = levedura; s/c = sem crescimento; nr = não realizada; NC = nível de confiança; M = masculino; F = feminino.

uqd = ungueal quirodáctilo; upd = ungueal pododáctilo; updh = ungueal pododáctilo hálux; upqd = ungueal quiro e pododáctilo; pdint = pododáctilo interdigital; pdplant = pododáctilo plantar; cut = cutâneo; pool = mistura; mi = membro inferior; nad = nádegas; ing = inguinal; mama = mamário; ccab = coro cabeludo; d = direito; e = esquerdo; d/e = direito e esquerdo.

**Quadro 18: Referências e técnicas realizadas.**

Amostras Controles	BHI Clo.	SDA Tubo II	MYA	SDA Placa	H <sub>2</sub> O destilada	Chromagar <i>Candida</i>	TG	SDA NaCl	SDA 42-45°C	Vitek® 2 Compact (NC em %)	Referência
<i>C. albicans</i> sor. A	+	+	+	L	+	verde	+	+	+	<i>C. guilliermondii</i> 85%	36801
<i>C. albicans</i> sor. B	+	+	+	L	+	verde	+	+	+	<i>C. albicans</i> 94%	36802
<i>C. dubliniensis</i>	+	+	+	L	+	verde	+	Neg	Neg	<i>S. ciferrii</i> 85%	MYA-646
<i>C. glabrata</i>	+	+	+	L	+	branca	Neg	nr	nr	<i>C. parapsilosis</i> 93 %	2001
<i>C. guilliermondii</i>	+	+	+	L	+	branca	Neg	nr	nr	Não identificada	6260
<i>C. kefyr</i>	+	+	+	L	+	branca/rosa	Neg	nr	nr	<i>S. ciferrii</i> 85%	46764
<i>C. krusei</i>	+	+	Neg	L	+	rosa/rugosa	Neg	nr	nr	<i>C. guilliermondii</i> 95%	34135
<i>C. lusitaniae</i>	+	+	Neg	L	+	branca	Neg	nr	nr	<i>C. lusitaniae</i> 97%	34449
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	Neg	L	+	branca	Neg	nr	nr	Não identificada	22019
<i>C. tropicalis</i>	+	+	Neg	L	+	azul	Neg	nr	nr	<i>C. tropicalis</i> 98%	1600

BHI Clo. = infusão cérebro coração acrescido de cloranfenicol; SDA = ágar Sabouraud-dextrose a 4%; MYA = ágar Mycosel; H<sub>2</sub>O destilada = estoque em água destilada estéril; TG = tubo germinativo; NaCl = cloreto de sódio.

(+) = positivo; Neg = negativo; L = levedura; nr = não realizada; NC = nível de confiança.

## 6 DISCUSSÃO

Para a realização deste trabalho, os dois critérios de inclusão foram: solicitação médica, o que auxilia nas hipóteses diagnósticas, e a confirmação de que os pacientes não estavam utilizando medicação antifúngica, seja ela sistêmica ou tópica, para evitar diagnóstico falso negativo.

O tipo e a qualidade da amostra clínica, submetida ao diagnóstico, são fatores importantes no sucesso do isolamento e identificação do verdadeiro agente etiológico. Sendo assim, o procedimento de coleta é a etapa mais valiosa do diagnóstico, pois é a partir dela que se realizará toda a seqüência. A assepsia na coleta é fator básico para a redução de contaminantes, e o volume da amostra deve ser suficiente para o exame direto, semeadura nos meios de culturas e de preservação da amostra para futuras comparações. Por estes motivos diferentes autores em micologia e a ANVISA ressaltam a importância da amostra clínica (ANVISA, 2004).

Pele e as unhas foram os principais sítios de infecção, por isso o raspado cutâneo foi realizado utilizando lâmina de microscopia limpas com álcool a 70% ou lâmina de bisturi descartável, logo a amostra clínica foi acondicionada entre duas lâminas e estas envoltas por papel e identificadas. A ANVISA determina o uso de fita adesiva para vedar as duas lâminas, preferimos o papel, pois assim identificamos o paciente no mesmo. Para as unhas é que se requereu raspar a região da hiperqueratose, coletando-se a amostra clínica da região mais profunda da unha (ANVISA, 2004).

DORKO et al. (2002), SOUZA et al. (2007) e GODOY-MARTINEZ et al. (2009) relatam o uso do álcool a 70% para limpeza das lesões cutâneas antes do raspado para

obtenção da amostra clínica, assim como em nosso trabalho, porém MIRANDA et al. (2005) e MARTINS et al. (2007) não entraram em detalhe quanto a limpeza e procedimentos da coleta.

No quadro 4 da página 73 de resultados, comparamos os dados de gênero, idade e sítios de infecção. Onde podemos observar: (1) maior incidência em mulheres; (2) que entre 47 e 73 se encontraram mais da metade dos pacientes; (3) que a média de idade foi superior a 50 anos; (4) que as amostras tanto quirodáctilas, pododáctilas e cutâneas incidiram mais nas mulheres; (5) e tanto amostras ungueais quirodáctilas e pododáctilas também incidiram mais em mulheres.

Paroníquia e onicomicose afetam predominantemente as mãos de mulheres, como governantas, empregadas, lavadeiras, cozinheiras, dentre outras, onde que comumente estão expostas a traumas de trabalho conforme descrito por SIMONETTI et al. (2004).

ARENAS, RUIZ-ESMENJAUD (2004) relataram que a onicomicose envolve mais comumente as unhas dos dedos dos pés em comparação com as das mãos, salvo nas infecções por *Candida*, porém o que encontramos foram 51,92% pododáctilos e 34,62% quirodáctilos. Porém DORKO et al. (2002), SOUZA et al. (2007) e GODOY-MARTINEZ et al. (2009) confirmam que a incidência da onicomicose por *Candida* envolve mais as unhas dos dedos das mãos em comparação com as dos pés.

De acordo com nossos dados a frequência foi maior em mulheres do que em homens, salvo DORKO et al. (2002) onde observado mais em homens do que em mulheres. Vale ressaltar também que a principal ocupação que envolve mulheres, em nosso trabalho, foi a de dona de casa 9/51 (17,65%) e aposentadas 5/51 (9,80%).

DORKO et al. (2002) descreveram a faixa etária entre 50 e 70 anos e média de idade dos pacientes de 55,2 anos; MIRANDA et al., (2005) relatam a faixa etária entre 41 e 60 anos com 67,37% pacientes dentro desta; comparando com nossos dados: faixa etária entre 47 e 73 anos com 52,94% dos pacientes inclusos e média de idade de 51,97 anos, resultados estes não muito distantes entre si.

Em relação ao sítio de infecção, a maior frequência em nossos resultados (40/52, 76,92%) e nos outros autores, salvo o GODOY-MARTINEZ et al. (2009) foram para as

amostras ungueais. E dentre nossas amostras ungueais a de maior ocorrência são as pododáctilas (21/52 40,38%) em comparação com as quirodáctilas (18/52, 34,62%), e quanto ao gênero, tanto as quirodáctilas (15/52, 28,84%) como as pododáctilas (16/52, 30,77%) prevaleceram nas mulheres. Em DORKO et al. (2002), SOUZA et al. (2007) e GODOY-MARTINEZ et al. (2009) prevaleceram as amostras quirodáctilas, somente em MIRANDA et al. (2005) que há a prevalência em pododáctilas. Quanto ao gênero, DORKO et al. (2002) relataram prevalências das amostras ungueais quirodáctilas para mulheres e ungueais pododáctilas para homens; em MIRANDA et al. (2005) prevaleceram as amostras ungueais quirodáctilas e pododáctilas para mulheres.

As nossas amostras cutâneas foram de 6/52 (11,54%) distribuídas em diferentes sítios, como corpo (“pool”), inguinal (virilha), couro cabeludo e membro inferior, este último com duas amostras. MIRANDA et al. (2005) também relataram amostras cutâneas entre interdigitais e virilhas de 29/190 (15,26%). Em nosso trabalho e em MIRANDA et al. (2005) as amostras quirodáctilas e pododáctilas, em comparação com as cutâneas, foram as mais observadas.

O exame direto é a primeira etapa do diagnóstico laboratorial micológico em geral, indicando na maioria das vezes, se o material examinado contém ou não estruturas fúngicas, permitindo assim uma informação imediata ao laboratorista nos passos a seguir. Como a maioria das espécies do gênero *Candida* faz parte da microbiota normal humana, não somente encontrar a levedura nos diz que a infecção é causada por ela, devendo assim levar em conta a carga parasitária (ANVISA, 2004).

Considera-se exame direto de material clínico, preparações montadas entre lâmina e lamínula, imersas em uma substância que facilite a visualização microscópica (SIDRIM, ROCHA, 2004). O material clínico é composto de lipídios e proteínas que são sensíveis ao tratamento alcalino, o que provoca saponificação de lipídios e também a hidrólise de proteínas. O fungo possui parede celular rica em polissacarídeos, que além de serem resistentes à hidrólise alcalina a quente, muitos desses são insolúveis em álcali. Com isso ocorre uma desorganização das células do hospedeiro, mas com manutenção e evidênciação das leveduras, decorrente do clarificante KOH a 20%.

Em se tratando de escamas de pele e fragmentos de unhas, deve-se ter o cuidado com a espessura do material a ser analisado, quanto mais fino, melhor o clarificante desempenha sua função e mais fácil será a visualização dos elementos fúngicos.

Quanto ao exame direto MIRANDA et al. (2005) utilizou KOH a 40%, DORKO et al. (2002), MARTINS et al. (2007), SOUZA et al. (2007) e GODOY-MARTINEZ et al. (2009) utilizaram KOH a 20%, estes dois últimos adicionaram “ink blue” ao exame direto, com a finalidade de facilitar a observação das estruturas.

A positividade para um exame direto com suspeita de candidíase deve evidenciar principalmente a presença de blastoconídios. A ANVISA (2004) relata que o aspecto morfológico do exame direto pode revelar não só blastoconídios como também pseudohifas. As principais características que foram observadas em nossas amostras para serem consideradas suspeitas de levedurose foram a carga parasitária e a presença de blastoconídios gemulantes ou não.

A cultura é absolutamente necessária para o isolamento e identificação do fungo após o exame direto. Entende-se por isolamento primário a capacidade que os microrganismos apresentam de crescer, a partir do material clínico, em um meio de cultura basal. O ágar de Sabouraud é o principal meio de cultura usado em micologia, utiliza-se para o cultivo primário geral dos fungos, por se tratar de um meio não seletivo. A composição do ágar Sabouraud foi, inicialmente, proposta por Raymond Sabouraud, em 1904, e vem apresentando diferentes modificações com o passar dos anos. O ágar Mycosel é uma dessas variações, onde encontramos a adição de cloranfenicol e cicloheximida, o que torna o meio seletivo inibindo o crescimento de bactérias e fungos sapróbios e anemófilos, no entanto, pode inibir o crescimento de fungos patogênicos leveduriformes como também algumas espécies de *Candida* (SIDRIM, ROCHA, 2004).

A ANVISA (2004) direciona para o uso do ágar Mycosel e a fórmula clássica do ágar Sabouraud com dextrose a 4%. Os dois meios de cultura citados foram utilizados pelos seguintes motivos: (1) isolamento primário; (2) visualização de organismos de não interesse neste estudo como bactérias, *Rhodotorula* e *Trichosporon*; (3) observação primária da macromorfologia das espécies do gênero *Candida*; e (4) primeira tentativa de se isolar a levedura de interesse quando mescladas com os de não interesse neste estudo. Quanto ao uso

do SDA e MYA, todos os cinco autores com que comparamos nossos dados também o utilizaram (DORKO et al., 2002; MIRANDA et al., 2005; MARTINS et al., 2007; SOUZA et al., 2007; GODOY-MARTINEZ et al., 2009).

O isolamento de um fungo em meio de cultura não significa, necessariamente, que ele seja o agente etiológico da infecção. A presença de *Candida* na microbiota de pacientes pode resultar em cultura positiva. No entanto, deve-se sempre valorizar o isolamento das espécies do gênero *Candida* quando: (1) a amostra clínica se mostrou positiva no exame direto; (2) lesão de micose cutânea; (3) paciente imunodeprimido ou debilitado; e (4) paciente em uso de antibiótico por longo tempo (ANVISA, 2004).

Comumente leveduras se desenvolvem mescladas com bactérias no isolamento primário, e é absolutamente essencial obter culturas puras para dar prosseguimento a todas as outras etapas (LARONE, 2002), seja ela de diagnóstico ou de pesquisa.

O BHI é um meio enriquecido recomendado para microrganismos fastidiosos, para obtenção, em menor tempo de cultura com melhor desenvolvimento. A ANVISA (2004) recomenda este meio com 50 mg/L de cloranfenicol, porém nós o utilizamos com 500 mg/L (0,5 g/L) para diminuir os contaminantes bacterianos e isolar o fungo de interesse.

Mesmo em algumas culturas de isolamento primário não demonstrando a presença bacteriana, todas as amostras foram inoculadas em BHI acrescido de cloranfenicol, para termos a certeza de mesmo aquelas não vistas, terem sido diminuídas. Mas como relatamos nos resultados 15 (25,86%) de 38 (65,52%) amostras persistiram a contaminação bacteriana, necessitando assim de uma nova cultura no BHI acrescido de cloranfenicol mais a solução de cloranfenicol a 5 g/L e benzilpenicilina benzatina a 9,91 g/L. Após esta etapa as amostras se apresentaram aparentemente puras para repique em SDA e MYA. Nenhum dos cinco autores com que comparamos nosso trabalho utilizou meio e soluções para reduzir as bactérias além no MYA.

Colônias leveduriformes obtidas de amostras clínicas, só devem ser identificadas quando estiverem homogêneas, ou seja, sem contaminação bacteriana ou em mistura de espécies. Para tanto, deve ser realizado o plaqueamento de cada amostra para verificação da

macromorfologia. Assim de cada colônia deve ser feito um repique em SDA para sua identificação (ANVISA, 2004).

Além de verificarmos todos os parâmetros para a macromorfologia apresentados nos resultados, o plaqueamento das amostras nos mostrou: (1) constatação de três amostras com persistência bacteriana e três amostras com presença de *Trichosporon*; e (2) seis amostras sugestivas de infecções mistas detectadas por diferença de macromorfologia. Como o plaqueamento foi realizado por esgotamento por estrias gerando espaçamento entre as colônias, se pôde selecionar a levedura quando misturada com bactérias e/ou *Trichosporon*; e separar em duas amostras, as seis com suspeita de infecção mista.

A manutenção de fungos em certos meios de cultura requer muitos cuidados, pois consomem rapidamente e necessitam repiques freqüentes, gastando tempo e possibilitando contaminação e diminuição da virulência. Devido a essas dificuldades foram desenvolvidos outros métodos para conservação de fungos, como óleo mineral, areia, sílica gel, tecidos secos dos hospedeiros e água destilada. A liofilização e a conservação em nitrogênio líquido são alternativas, embora os resultados sejam variados (DIOGO, SARPIERI, PIRES, 2005).

O processo de Castellani desenvolvido em 1939 para manutenção da viabilidade de fungos patogênicos em água destilada estéril tem sido muito utilizado e modificado, devido: (1) ao baixo custo e fácil manuseio; (2) evitar o desenvolvimento de acarinos; (3) ser aplicada a todos os fungos de um modo geral; (4) evitar o pleomorfismo; (5) diminuir a possibilidade de contaminantes bacterianos; e (6) em médio prazo garantir a recuperação dos fungos (BUENO, GALLARDO, 1998; DIOGO, SARPIERI, PIRES, 2005).

McGINNIS, PADHYE e AJELLO (1974), entre fungos filamentosos, leveduras e actinomicetos, 389/417 (93%) foram recuperados entre 60, 48, 24 e 12 meses, em quatro independentes experimentos. A recuperação das espécies de *Candida* foi de 100% em todos os períodos. RODRIGUES, LÍRIO e LACAZ (1992), de um total de 174 entre fungos filamentosos, leveduras e actinomicetos, das 9 espécies de *Candida* apenas uma foi recuperada nos quatro períodos (6, 12, 18 e 24 meses), e as outras 8 espécies recuperadas apenas em 6 e 12 meses.

Nossas amostras ficaram menos de um ano em estoque em água destilada estéril, o que possibilitou a realização das etapas posteriores. Vale ressaltar algumas observações quando em estoque: (1) densidade equivalente ao padrão Mc Farland n.º 10, para facilitar a recuperação das leveduras; (2) após alguns minutos a suspensão se apresentava com duas fases, devido à sedimentação das leveduras; (3) presença de gotículas de condensação interna com o passar do tempo em alguns tubos, sugerindo interferência da temperatura externa; (4) coloração amarelada da água com ou sem turvação com o passar dos dias em alguns tubos, por se tratar de um estoque para posteriores etapas, muitas vezes os tubos eram abertos, e mesmo sendo feito à chama do bico de Bunsen, algumas amostras se contaminavam com bactérias, o que acarretava em turvação nos mesmos, constatando isso era feito um repique em BHI acrescido de cloranfenicol mais a solução de cloranfenicol com benzilpenicilina seguido de plaqueamento para diminuição quantitativa de bactérias; e (5) presença de espuma, bolhas, que ao abrir alguns tubos se percebia a liberação de gás e odor característico fermentativo, sugerindo produção de CO<sub>2</sub> em função de parte do SDA que se encontrava na água, já que o tubo se mantinha fechado proporcionando um ambiente com menor tensão de O<sub>2</sub>.

Desde meados de 1950, existem vários meios de cultivo capazes de gerar o crescimento com cores distintas das colônias, segundo as espécies de leveduras. Nos últimos anos, diferentes meios de cultura com adição de cromógenos têm sido comercializados, esses possibilitam diferenciar *C. albicans* de outras leveduras de interesse clínico. Esses meios têm como fundamento a alteração na cor desenvolvida pelas colônias através de indicadores de pH e fermentação de compostos específicos ou substratos cromogênicos. Na década de 90 surgiu o CHROMagar, que tem sido utilizado para isolar e identificar presuntivamente *C. albicans*, *C. krusei*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis*, como também identificar infecções mistas. Este meio se baseia na utilização do substrato β-glicosaminidase que diferencia as leveduras de acordo com a morfologia e a cor das colônias. A utilização deste meio facilita a detecção e a identificação destas leveduras e, também, fornece resultados presuntivos em menor tempo que os obtidos pelos métodos já padronizados (ARAÚJO et al., 2005).

O CHROMagar *Candida* a princípio foi utilizado para observação de quatro cores distintas, sugerindo assim *C. albicans* (verde), *C. tropicalis* (azul), *C. krusei* (rosa rugosa) e as demais espécies (branco ao rosa), sendo que *C. krusei* como única espécie onde a morfologia auxiliava na identificação. Com o aparecimento das espécies emergentes aumentando o leque

de opções em agentes etiológicos para candidíase, este cenário mudou, diferentes autores já mencionam: (1) a visualização de outras cores e tons (claro, escuro, metálico, violeta, roxa, lilás, dentre outras); (2) padrões de morfologias (liso, brilhoso, opaco, morfologia de bordas de colônias); (3) temperatura de incubação entre 30 e 37°C; (4) tempo maior de incubação chegando a 3 dias; e (5) cultivo de espécies de outros gêneros (*Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* e *Trichosporon*). Essa variedade de cores, tons, morfologia, temperatura, tempo de incubação e gêneros se podem observar no trabalho de GARCÍA-MARTOS et al. (1998).

Optamos por seguir a bula do fabricante no que tange a observação das cores (verde, azul, rosa e branca) e tempo de incubação de 2 dias a 37°C, exceto por notar duas situações onde algumas amostras mostravam pouco crescimento ou com apenas a mudança de coloração para violeta; e três amostras que não se desenvolveram no CHROMagar *Candida*. E como a cor branca e rosa não demonstravam diferença entre espécies, agrupamos as mesmas em um único grupo, que por sinal foi o maior com 35/58 (61,34%).

MARTINS et al. (2007) e SOUZA et al. (2007) utilizaram o meio cromogênico, enquanto que em DORKO et al. (2002), MIRANDA et al. (2005) e GODOY-MARTINEZ et al. (2009) não utilizaram em suas metodologias o meio em questão.

Infecções mistas podem ser identificadas no CHROMagar, salvo quando mistura de espécies forem de cor brancas a rosas as duas, onde a morfologia, neste caso pode vir a ajudar na diferenciação. Em nosso trabalho apenas uma infecção mista foi detectada no meio cromogênico, onde uma mistura de colônias brancas e verdes foi observada, e a partir daí, uma amostra foi reconhecida como duas (519/08 uqd e/B e 519/08 uqd e/V). A partir de diferentes materiais clínicos de um mesmo paciente como descrito em KALCANCI et al. (2005) e identificadas do mesmo sítio de lesão com o uso do CHROMagar *Candida*, em uma onicomicose, como descrito por LIMA et al. (2008).

A prova do tubo germinativo, descrita por Tschadjian, em 1960, é um método simples de triagem que permite a distinção entre *C. albicans* ou *C. dubliniensis* (tubo germinativo positivo) de outras espécies de levedura (tubo germinativo negativo). O tubo germinativo aparece como uma extensão da célula leveduriforme, com ausência de septos, de lados paralelos e não apresentando constricção no ponto de conexão com a célula mãe, quando esta

entra em contato com soro humano ou de outros animais, à temperatura de 37°C, durante 2 a 3 horas (BERARDINELLI, OPHEIM, 1985; SIDRIM, ROCHA, 2004).

Definimos o tempo de incubação por 2 horas, pois com mais tempo, as outras espécies de referência, sem ser *C. albicans* e *C. dubliniensis*, estavam apresentando tubo germinativo positivo. Outro fator que observamos foi que nem todas as leveduras apresentavam o tubo germinativo quando as amostras consideradas positivas, porém quando consideradas negativas, dentro do tempo e temperatura estipulados, não desenvolviam tal morfologia. Este também foi fator para consideramos a prova do tubo germinativo positiva.

A prova do tubo germinativo já está consolidada há tempos na literatura e com algumas alterações desde a sua utilização. O volume se manteve a 0,5 mL de soro humano, de cavalo ou coelho; a temperatura na literatura varia de 35 a 37°C; o tempo de incubação encontramos de 2 a 6 horas, porém com *C. albicans* gerando tubo germinativo entre 2 e 3 horas; quanto a preparação encontramos desde amostras em suspensão em salina, água destilada e diretas do sangue; e em relação a positividade do teste entre autores varia desde a presença do tubo germinativo, presença de 50 % ou 100 células por lâmina (BARLOW, ALDERSLEY, 1974; WARWOOD, BLAZEVIC, 1977; BERARDINELLI, OPHEIM, 1985; SHEPPARD et al., 2008).

*C. albicans* e *C. dubliniensis* se comportam com coloração aparentemente verde no CHROMagar e ambas são positivas para a prova do tubo germinativo (AHMAD et al., 2004). Quando cruzadas as duas etapas, verificamos que 13/58 (22,41%) amostras ficaram verdes no meio cromogênico e que 12/58 (20,69%) demonstraram tubo germinativo positivo. Até aqui estas amostras eram sugestivas de serem *C. albicans* ou *C. dubliniensis*, salvo a amostra 49/09 *uqd pool I* que verde no CHROMagar apresentou tubo germinativo negativo. Mais informações a seguir ao cruzarmos estes resultados com as provas bioquímicas.

A diferenciação de *C. albicans* e *C. dubliniensis* pode ser feita através de caracterizações fenotípicas como: (1) diferença de tonalidade de verde (claras e escuras) no CHROMagar; (2) colônias com ou sem fluorescência sob UV no SDA “Methyl-blue” 93; (3) atividade de  $\beta$ -glucosidase; (4) desenvolvimento ou não em SDA hipertônico; (5) desenvolvimento ou não em SDA entre 42-45°C; (6) crescimento diferenciado no ágar semente de Níger; (7) não produção ou produção de clamidoconídios no ágar caseína; (8)

crescimento diferenciado no ágar tabaco; dentre outras (MOSAID, SULLIVAN, COLEMAN, 2003; MOSCA et al., 2003; KHAN et al., 2004).

Com a finalidade de diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis*, optamos em realizar as etapas do SDA hipertônico e cultivo entre 42-45°C, pois são testes não onerosos que apresentam bons resultados. No entanto estas duas etapas foram realizadas apenas nas amostras que se desenvolveram com coloração verde no CHROMagar, já que estas que pertencem aos dois testes complementares.

Para as 13 amostras de coloração verde no CHROMagar, a cultura em SDA hipertônico a 37°C apresentou desenvolvimento. Segundo o artigo de ALVES et al. (2002) o teste de tolerância ao cloreto de sódio a 6,5% é tradicional em microbiologia para a identificação de diferentes microrganismos, e que até aquele momento não tinha sido usado para diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis*. Da mesma forma as 13 amostras de coloração verde no CHROMagar apresentaram desenvolvimento no SDA entre 42-45°C. Após estas duas etapas de testes, as amostras de coloração verde sugestivas de *C. albicans* ou *C. dubliniensis* passaram a indicar *C. albicans*, exceto a amostra 49/09 uqd pool I, por conta do tubo germinativo negativo.

ALVES et al. (2002) de um total de 266 isolados clínicos mais três referências, totalizando 250 *C. albicans* e 19 *C. dubliniensis*, constataram que todos os isolados de *C. albicans* exibiram desenvolvimento significativo no ágar Sabouraud hipertônico com 4 dias, enquanto que todos os isolados de *C. dubliniensis* não exibiram qualquer crescimento detectável visualmente durante o mesmo período.

AKGÜL e ÇERIKÇIOĞLU (2009) em um estudo com 300 amostras positivas para tubo germinativo identificadas presuntivamente como *C. albicans*, realizou 7 testes fenotípicos, incluindo crescimento entre 42-45°C e Sabouraud hipertônico com 6,5% de NaCl, mais o API ID 32 C e o PCR como identificação definitiva. Do total de 300 amostras duas foram identificadas como *C. dubliniensis* pelos testes definitivos e apenas pelo teste fenotípico para o Sabouraud hipertônico, os demais testes para as amostras apresentaram resultados falso positivos para *C. albicans*.

O desenvolvimento entre 42 e 45°C, principalmente entre 45°C fixo é uma forma fenotípica de se diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis* (PINEDA et al., 2008). PINJON et al. (1998) investigou o desenvolvimento de 120 isolados de *C. dubliniensis* e 98 de *C. albicans* a 42 e 45°C no ágar Sabouraud-glucose a 2% e em outro meio composto de peptona e dextrose. Nenhum dos 120 isolados de *C. dubliniensis* se desenvolveu a 45°C em ambos os meios de cultura, enquanto que 11 foram capazes de se desenvolver a 42°C no ágar Sabouraud-glucose a 2%. Por outro lado, todos os isolados de *C. albicans*, exceto um, se desenvolveram em ambos os meios a 45°C.

O sistema VITEK<sup>®</sup> 2 Compact (bioMérieux) é um método bioquímico automatizado para identificar microrganismos. Os cartões para identificação de leveduras (VITEK<sup>®</sup> 2 YST) baseiam-se em métodos bioquímicos estabelecidos e em substratos recentemente desenvolvidos, distribuídos em 46 testes colorimétricos que medem: assimilação de 20 carboidratos; assimilação de 6 ácidos orgânicos; 8 substratos para detecção de oxidases; 9 substratos para a detecção de aril-amidases; e mais testes que detectam fosfatase, urease e assimilação de nitrato. Os cartões são incubados no interior do aparelho a 35,5°C e após 18 horas uma leitura é feita a cada 15 minutos, o que leva a um perfil de identificação, estabelecido de acordo com algoritmo específico. O resultado final é comparado com um banco de dados que gera a identificação ou não do microrganismo de acordo com o nível de confiança (GRAF et al., 2000; HATA et al., 2007). Nos apêndices 9.3 e 9.4 detalhamos os conteúdos dos poços e os microrganismos identificados pelo VITEK<sup>®</sup> 2 YST, respectivamente.

Limitações para o VITEK<sup>®</sup> 2 YST: (1) não utilizar amostras com flora mista; (2) qualquer alteração e modificação no procedimento podem afetar os resultados; (3) microrganismos raros ou recentemente descritos podem não estar inclusos na base de dados; e (4) à medida que as estirpes ficam disponíveis é que são acrescentadas ao banco de dados (VITEK<sup>®</sup> 2 YST e VITEK<sup>®</sup> 2 Compact, bioMérieux<sup>®</sup> S.A.).

Na ocorrência de fraca discriminação o aparelho sugere testes suplementares, que permite ao usuário decidir uma identificação multiopcional (VITEK<sup>®</sup> 2 YST e VITEK<sup>®</sup> 2 Compact, bioMérieux<sup>®</sup> S.A.). Em nosso trabalho não utilizamos tais testes, nestes casos determinamos apenas o gênero, *Candida spp.* Das 58 amostras, 47 (81,03%) o sistema

VITEK<sup>®</sup> 2 possibilitou identificar entre os parâmetros excelente, muito bom, bom e aceitável, e 11 (18,97%) com fraca discriminação, 10 para duas e 1 para três espécies.

Segundo os trabalhos de AUBERTINE et al. (2006) e LOIËZ et al. (2006) os cartões VITEK<sup>®</sup> 2 YST vieram a substituir os cartões VITEK<sup>®</sup> 2 ID-YST, onde as principais diferenças são: (1) que o novo é por sistema colorimétrico e o antigo por sistema fluorimétrico; (2) o novo leva 18 horas enquanto que o antigo levava 15 horas para chegar aos resultados; (3) o novo abrange 14 gêneros e o antigo 11 gêneros; e (4) o novo identifica mais espécies que o antigo, porém diferentes trabalhos relatam diferentes números de espécies identificadas tanto para o sistema colorimétrico como para o sistema fluorimétrico. No entanto, AUBERTINE et al. (2006) conclui que o novo cartão é melhor do que o antigo, já LOIËZ et al. (2006) conclui que o antigo cartão é melhor do que o novo, mas admite que se requerem mais estudos para confirmar ou não os seus resultados.

Quando comparamos nossos resultados (quadro 11 página 93 de resultados) de espécies identificadas com cinco outros autores (páginas 49 e 50 na introdução), temos: (1) nossos resultados e de SOUZA et al. (2007) com mais variedades de espécies; (2) nossos resultados, MARTINS et al. (2007) e SOUZA et al. (2007) com *C. parapsilosis* como a mais prevalente; (3) DORKO et al. (2002), MIRANDA et al. (2005) e GODOY-MARTINEZ et al. (2009) com *C. albicans* como a mais prevalente; (4) DORKO et al. (2002), MIRANDA et al. (2005) e GODOY-MARTINEZ et al. (2009) com *C. parapsilosis* como a segunda mais prevalente; (5) *C. famata* aparece em nossos resultados como a segunda mais prevalente, diferente dos outros que apenas em SOUZA et al. (2007) aparece com 0,57%; (6) *C. tropicalis* ocorre oscilando entre as segundas e quintas posições nos diferentes trabalhos e em último no nosso; e (7) *Candida spp.* se iguala em porcentagem de *C. parapsilosis* em nossos resultados e aparece apenas em GODOY-MARTINEZ et al. (2009) em terceira posição.

CROCCO et al. (2004) relataram que as espécies mais comumente encontradas nas unhas são a *Candida albicans*, seguida de *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* com menor frequência. Estas espécies ocorreram em todos os trabalhos dos cinco autores, salvo *C. krusei* que não foi identificada em nossos resultados. Observamos que *C. albicans* e *C. parapsilosis* oscilam entre as primeiras e segundas posições na maioria dos resultados mencionados.

Como destacado anteriormente, o ágar Mycosel é um meio seletivo que inibe o crescimento de bactérias e fungos sapróbios e anemófilos, no entanto pode inibir o crescimento de vários fungos leveduriformes patogênicos, sendo que as espécies de *Candida* podem se comportar como sensíveis, resistentes ou de caráter variável. Comportamento de algumas das espécies de *Candida* quando no ágar Mycosel: Resistentes: *C. albicans*, *C. ciferrii*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. haemulonii*, *C. kefyr*, *C. lipolytica* e *C. viswanathii*; Sensíveis: *C. colliculosa*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. norvegensis*, *C. parapsilosis* e *C. zeylanoides*; Variáveis: *C. famata* e *C. tropicalis* (LARONE, 2002; GARCÍA-MARTOS et al., 2004; MICOLOGY ONLINE. The University of Adelaide – Austrália).

Quando comparamos nossos resultados (quadro 14 página 96 de resultados) com o que a literatura fornece, obtivemos: (1) *C. albicans*, *S. ciferrii* e *C. lipolytica* condizentes com comportamento resistente; (2) *C. famata* e *C. tropicalis* condizentes com comportamento variável; (3) uma *C. haemulonii* e uma *C. guilliermondii* que eram para ser resistentes, também se apresentam como espécimes sensíveis; e (4) três *C. parapsilosis* que eram para ser sensíveis, também se apresentaram como espécimes resistentes. Tal vez a explicação para os espécimes não condizentes com a literatura esteja nos chamados complexos, onde uma espécie pode conter duas ou mais espécies, como descritos em LEHMANN et al. (1993), BAI, LIANG, JIA (2000), KOCSUBÉ et al. (2007) e GOMEZ-LOPEZ et al. (2008).

Com relação às espécies de referência no MYA, *C. glabrata* se apresentou como resistente, sendo que era para se comportar como sensível de acordo com a literatura.

Os antigos cartões VITEK<sup>®</sup> 2 ID-YST (sistema fluorimétrico) continham o teste para o actidione (cicloheximida), já os novos cartões VITEK<sup>®</sup> 2 YST (sistema colorimétrico) não possuem o teste (GRAF et al., 2000). Não sabemos o motivo da remoção do actidione, mas sua ausência nos cartões VITEK<sup>®</sup> 2 YST sugerem que testes de resultados variáveis não são bons para diferenciar espécies.

Comparando a macromorfologia obtida em SDA das amostras de acordo com o resultado do VITEK<sup>®</sup> 2 Compact, obtivemos: (1) semelhança entre as amostras de *C. parapsilosis*, salvo uma onde observamos duas diferentes morfologias oriundas de mesmo sítio de um paciente; (2) semelhança entre as amostras de *C. famata*, *C. albicans*, *C.*

*haemulonii* e *C. guilliermondii*; (3) semelhança entre as amostras de *C. lipolytica*; (4) entre as amostras de *S. ciferrii* e *C. tropicalis* existe uma de cada com semelhança morfológica a *C. lipolytica*; e (5) as amostras não definidas pelo VITEK<sup>®</sup> 2 Compact apresentaram macromorfologias aparentadas entre as descritas acima.

Das seis amostras com suspeita de infecção mista detectadas no SDA apenas uma (594/08 upd pool I e II) não se confirmou pelo VITEK<sup>®</sup> 2 Compact, porém apresentou diferente morfologia.

No livro de LARONE, D. H. (2002) encontramos a descrição da macromorfologia das colônias de algumas espécies de *Candida*, como: (1) *C. albicans*, de coloração creme, cremosas e homogêneas; (2) *C. dubliniensis*, de cor creme, pastosa e homogênea; (3) *C. tropicalis*, de coloração creme, enrugada próximo as bordas ou de aspecto franjado; (4) *C. parapsilosis*, cremosa por vezes desenvolvendo aparência rendada; (5) *C. lusitaniae*, de cor creme, homogênea brilhosa; (6) *C. krusei*, de coloração creme, plana, seca, podendo apresentar bordas franjadas; (7) *C. kefyr*, cremosa homogênea; (8) *C. guilliermondii*, planas, lustrosas, bordas homogêneas e cor creme podendo tornar-se marrom clara a rosácea com o passar do tempo; (9) *C. lipolytica*, cremosa, homogênea, podendo apresentar aparência rendada; (10) *C. zeylanoides*, de coloração creme ao amarelado, homogênea e opaca; e (11) *C. glabrata*, de cor branca ao creme, pastosas homogêneas.

GARCÍA-MARTOS et al. (2004) em descrição de um caso clínico por *C. ciferrii* em imunodeprimido, relataram colônias brancas ligeiramente membranosas; e RODERO et al. (2002) e KHAN et al. (2007) em relatos de casos de fungemias por *C. haemulonii*, observaram colônias de cor quase brancas ao creme de aspecto liso e homogêneo.

Do cruzamento dos resultados obtidos para o CHROMagar *Candida* e as provas bioquímicas do VITEK<sup>®</sup> 2 Compact, observamos: (1) que todas as amostras identificadas como *C. parapsilosis*, *C. famata* e *C. guilliermondii* apresentaram colorações que variavam entre o branco e o rosa; (2) as amostras identificadas como *C. albicans* apresentaram coloração verde; (3) que das seis identificadas como *C. haemulonii*, quatro apresentaram coloração violeta com pouco e/ou nenhum crescimento, uma apresentou coloração branca rosácea e outra não se desenvolveu no meio cromogênico; (4) das cinco identificadas como *S. ciferrii*, três apresentaram cor verde e duas brancas; (5) das quatro identificadas como *C.*

*lipolytica*, duas apresentaram coloração branca e as outras duas não se desenvolveram no meio cromogênico; (6) das três identificadas como *C. tropicalis*, duas apresentaram cor azul e uma verde; e (7) das onze onde apenas identificamos o gênero, sete apresentaram coloração entre o branco e o rosa, três verdes e uma violeta.

Segundo a bula do fabricante do meio cromogênico, salvo *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, todas as outras deveriam apresentar coloração entre o branco e o rosa, porém: (1) observamos coloração violeta para 4/6 (66,67%) das amostras identificadas como *C. haemulonii*; (2) que nem todas as amostras de cor verde eram *C. albicans*, três delas foram identificadas como *S. ciferrii*; e (3) uma amostra (49/09 *uqd pool I*) identificada como *C. tropicalis* apresentou coloração verde.

GARCÍA-MARTOS et al. (1998) com relação aos seus resultados no CHROMagar apresenta que *C. albicans* aparece com coloração verde esmeralda; *C. famata*, rosa claro sem brilho; *C. guilliermondii*, rosa claro brilhante; *C. lipolytica*, branca rosácea rugosa e navicular; *C. parapsilosis*, rosa claro sem brilho e enrugada; e *C. tropicalis*, azul rosácea sem brilho e com halo ao redor.

ARAÚJO et al. (2005) com 53 leveduras do gênero *Candida*, compara os testes convencionais morfologia das colônias, tubo germinativo, produção de clamidoconídios e assimilação de carboidratos com o CHROMagar *Candida* entre 24 e 48 horas, onde observa uma concordância para 5 *C. krusei* (rosa, rugosa), 4 *C. glabrata* (lilás) e 3 *C. parapsilosis* (rosa, lisa). Para *C. albicans* apenas 30 de 34 produziram coloração verde; e para *C. tropicalis* apenas 5 de 7 produziram coloração azul.

GARCÍA-MARTOS et al. (2004) em descrição de um caso clínico por *C. ciferrii* em imunodeprimido, relataram que no meio cromogênico *C. ciferrii* apresentou colônias de tonalidade azul turquesa com um halo ao redor da mesma e com desenvolvimento na presença de cicloheximida.

A amostra 49/09 *uqd pool I* identificada como *C. tropicalis* pelo VITEK<sup>®</sup> 2 Compact, apresentou coloração verde no tempo determinado pela bula do fabricante do meio cromogênico. Após o resultado da bioquímica aumentamos o tempo de dois para quatro dias, onde observamos a cor azul.

SIVAKUMAR et al. (2009) em um estudo na Índia utilizando o CHROMagar e outros testes convencionais para diferenciar espécies de *Candida*, obtiveram *C. albicans* (41); *C. tropicalis* (8); *C. krusei* (40); *C. guilliermondii* (24); *C. kefyr* (2); *C. parapsilosis* (4); e *C. glabrata* (16) de 135 isolados de candidíase orofaríngea em pacientes HIV positivos. Entre os oito isolados de *C. tropicalis*, apenas cinco apresentaram colônias azuis, as outras três apresentaram colônias verdes claras não podendo assim ter sido diferenciadas de *C. albicans*. Mediante este fato, 87 amostras de *C. tropicalis* da coleção do laboratório foram semeadas no CHROMagar, onde a maioria apresentou colônias azuis, exceto duas amostras que apresentaram colônias esverdeadas.

Muitas técnicas, se realizadas de forma isolada, não geram muita informação ou apenas sugerem o agente etiológico. O meio cromogênico quando utilizado de forma única apenas sugere, mas não identifica de forma definitiva. Para as amostras onde o VITEK<sup>®</sup> 2 Compact definiu apenas o gênero, gerando uma dúvida entre duas ou três espécies, o CHROMagar *Candida* pode sugerir (ou definir) qual delas é a espécie em questão. O quadro 15 (página 94 de resultados) mostra as amostras de fraca discriminação para o VITEK<sup>®</sup> 2 Compact e os resultados do CHROMagar *Candida*.

O cruzamento dos resultados de fraca discriminação para o VITEK<sup>®</sup> 2 Compact e os resultados do CHROMagar *Candida* temos: (1) 6/11 (54,54%) das amostras ficaram entre *C. famata* e *C. parapsilosis* com coloração branca; (2) a amostra 652/08 uqd e é sugestiva de *C. albicans* por conta da cor verde no CHROMagar; (3) de acordo com nossos resultados a amostra 230/09 updh d/e é sugestiva de *C. haemulonii* por conta da coloração violeta; e (4) as demais amostras a coloração das colônias no CHROMagar *Candida* não soluciona a dúvida do VITEK<sup>®</sup> 2 Compact.

Na comparação entre os resultados do VITEK<sup>®</sup> 2 Compact, o SDA e o CHROMagar *Candida*, observamos que a macromorfologia de algumas das amostras identificadas, pode não ser semelhante quando nos dois meios de cultura. Para as quatro identificadas como *C. lipolytica* pelo VITEK<sup>®</sup> 2 Compact, duas não apresentaram crescimento no meio cromogênico, já as outras duas apresentaram com coloração branca e aspecto liso brilhante. No SDA as quatro apresentaram com o diferencial de aspecto rugoso com bordas rendadas e duas de aspecto seco.

Por mais que tentamos, algumas espécies fúngicas de não interesse não foram detectadas nas etapas anteriores ao VITEK<sup>®</sup> 2 *Compact*, assim sendo somente nesta etapa que elas foram identificadas. Obtivemos *Cryptococcus laurentii* para as amostras 52/09 *uqd* e 78/09 *cut nad* (Figuras 31 e 32, página 98 de resultados). Quando comparamos o crescimento das colônias tanto no SDA como no CHROMagar *Candida*, observamos uma semelhança na macromorfologia quando comparadas com a maioria das espécies de *Candida* aqui identificadas.

Da mesma forma como identificamos o *Cryptococcus laurentii* após o VITEK<sup>®</sup> 2 *Compact*, também observamos a presença de duas espécies de *Trichosporon*. Obtivemos *Trichosporon mucoides* para a amostra 190/09 *pdint* e *Trichosporon asahii* para a amostra 247/09 *updh d II* (Figuras 33 e 34, página 99 de resultados). Ao se comparar as colônias em SDA e CHROMagar *Candida*, observamos semelhança na macromorfologia quando comparadas com algumas espécies de *Candida* identificadas.

As amostras 111/09 *uqd de* e 118/09 *uqd pool* (Figuras 35 e 36, página 100 de resultados) identificadas presuntivamente como espécies de *Candida* foram removidas do estudo pelo fato de não terem sido identificadas nas provas bioquímicas do VITEK<sup>®</sup> 2 *Compact*.

Os dados obtidos no presente trabalho substanciam a necessidade de maiores esforços no sentido de utilização de técnicas diversificadas com o objetivo de diagnósticos de maior confiabilidade, devido às diferentes espécies de *Candida* observadas com cada vez mais frequência. Vale ressaltar que a candidíase cutânea pode evoluir para um estado mais agravado, em decorrência do oportunismo, especialmente em indivíduos imunodebilitados, e que as diferentes espécies exibem padrão diferenciado de susceptibilidade aos antifúngicos, logo o diagnóstico preciso visa ao tratamento direcionado. Nosso estudo será continuado com procedimentos moleculares para maior investigação destes isolados clínicos, testes de sensibilidade antifúngica e avaliação da atividade enzimática.

## 7 CONCLUSÕES

De acordo com nossos resultados e com o que foi discutido concluímos:

Pacientes suspeitos de candidíase apresentam infecções por outros agentes etiológicos.

As onicomicoses pelo gênero *Candida* representam mais de 75% dos casos de candidíase cutânea.

É possível supor presuntivamente infecções mistas por espécies do gênero *Candida* por observação da macromorfologia quando estriadas em ágar Sabouraud pela técnica do esgotamento em placas de Petri.

Quatro das seis leveduras identificadas como *C. haemulonii* quando no CHROMagar *Candida* apresentam coloração violeta, padrão de coloração diferente do indicado pelo fabricante, demonstrando pouco ou nenhum crescimento.

Três das cinco leveduras identificadas como *S. ciferrii* se pigmentam com verde quando no CHROMagar *Candida*, de forma diferente do preconizado pelo fabricante, apresentando ainda presença de tubo germinativo em soro eqüino, desenvolvimento em ágar Sabouraud hipertônico e ágar Sabouraud entre 42-45°C e com. Apresentando assim perfil semelhante ao de *C. albicans*.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). *Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica*. Módulo VII. 2004. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod\\_7\\_2004.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_7_2004.pdf)>. Acesso em: 20 de setembro de 2008.

AHEARN, D. G.; MCGLOHN, M. S.; In vitro susceptibility of sucrose-negative *Candida tropicalis*, *Candida lusitanae*, and *Candida norvegensis* to amphotericin B, 5-fluorocytosine, miconazole, and ketoconazole. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 19, n. 3, p. 412-416, mar. 1984.

AHMAD, S.; KHAN, Z.; MOKADDAS, E.; KHAN, Z. U. Isolation and molecular identification of *Candida dubliniensis* from non-human immunodeficiency virus-infected patients in Kuwait. *Journal of Medical Microbiology*, v. 53, p. 633-637, 2004.

AKGÜL, Ö.; ÇERIKÇIOĞLU, N. Hypertonic sabouraud dextrose agar as a substrate for differentiation of *Candida dubliniensis*. *Mycopathologia*, v. 167, p. 357-359, 2009.

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

ARAÚJO, A. J. G.; BASTOS, O. M.; SOUZA, M. A. J.; OLIVEIRA, J. C. Ocorrência de onicomicoses em pacientes atendidos em consultório dermatológicos da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. *Anais Brasileiro de Dermatologia*, v. 78, n. 3, p. 299-308, maio-jun. 2003.

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

ARENAS, R.; RUIZ-ESMENJAUD, J. Onicomicose na infância: uma perspectiva atual com ênfase na revisão do tratamento. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 79, n. 2, p. 225-232, mar-abr. 2004.

ARRESE, J. E.; VALVERDE, J. C.; PIERARD, G. E. Un nuevo enfoque sobre la epidemiología de las onicomicosis. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 22, p. 163-166, 2005.

AUBERTINE, C. L.; RIVERA, M.; ROHAN, S. M.; LARONE, D. H. Comparative study of the new colorimetric VITEK 2 yeast identification cards versus the older fluorometric card and of CHROMagar candida as a source medium with the new card. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 1, p. 227-228, jan. 2006.

BADDLEY, J. W.; BENJAMIM-JR, D. K.; PATEL, M.; MIRÓ, J.; ATHAN, E.; BARSIC, B.; BOUZA, E.; CLARA, L.; ELLIOTT, T.; KANAFANI, Z.; KLEIN, J.; LERAKIS, S.; LEVINE, D.; SPELMAN, D.; RUBINSTEIN, E.; TORNOS, P.; MORRIS, A. J.; PAPPAS, P.; FOWLER-JR, V. G.; CHU, V. H.; CABELL, C. *Candida* infective endocarditis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 27, p. 519-529, 2008.

BAI, F.-Y.; LIANG, H.-Y.; JIA, J.-H. Taxonomic relationships among the taxa in the *Candida guilliermondii* complex, as revealed by comparative electrophoretic karyotyping. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 50, p. 417-422, 2000.

BARCHIESI, F.; SPREGNINI, E.; TOMASSETTI, S.; ARZENI, D.; GINNINI, D.; SCALISE, G. Comparison of the fungicidal activities of caspofungin and amphotericin B against *Candida glabrata*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, n. 12, p. 4989-4992, dec. 2005.

BARLOW, A. J. E.; ALDERSLEY, T. Factors present in serum and seminal plasma which promote germ-tube formation and mycelial growth of *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology*, v. 82, p. 261-272, 1974.

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

BERNARDIS, F.; MÜHLSCHLEGEL, F. A.; CASSONE, A.; FONZI, W. A. The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, v. 66, n. 7, p. 3317-3325, jul. 1998.

BISWAS, S.; DIJCK, P. V.; DATTA, A. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 71, n. 2, p. 348-376, jun. 2007.

BISWAS, S. K.; YOKOYAMA, K.; WANG, L.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. Typing of *Candida albicans* isolates by sequence analysis of the cytochrome b gene and differentiation from *Candida stellatoidea*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 4, p. 1600-1603, apr. 2001.

BLÁZQUEZ, E. P. Fondo de ojo en el paciente crítico no neutropénico: enoftalmitis candidiásica. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 23, p. 16-19, 2006.

BOUGNOUX, M.-E.; GUEHO, E.; POTOCKA, A.-C. Resolutive *Candida utilis* fungemia in a nonneutropenic patient. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, n. 6, p. 1644-1645, jun. 1993.

BRENA, S.; RUBIO, M. C.; SALESA, R.; IGLESIAS, I.; GIL, J.; REZUSTA, A.; MORAGUES, M. D.; PONTÓN, J. Genotipos de *Candida dubliniensis* en aislamientos clínicos. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 21, p. 20-23, 2004.

BROCCA, S.; SECUNDO, F.; OSSOLA, M.; ALBERGHINA, L.; CARRERA, G.; LOTTI, M. Sequence of the lid affects activity and specificity of *Candida rugosa* lipase isoenzymes. *Protein Science*, v. 12, p. 2312-2319, 2003.

BROWN, A. J. B.; GOW, N. A. R. Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends in Microbiology*, v. 7, n. 8, p. 333-338, aug. 1999.

BUENO, J.; GALLARDO, R. Preservación de hongos filamentosos em agua destilada estéril. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 15, p. 166-168, 1998.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Discrimination between *Candida albicans* and other pathogenic species of the genus *Candida* by their differential sensitivities to toxins of a panel of killer yeasts. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 9, p. 3362-3364, sep. 2001.

CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, v. 9, n. 7, p. 327-335, jul. 2001.

CANDIDO, R. C.; AZEVEDO, R. V. P.; KOMESU, M. C. Enzimotipagem de espécies do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 33, n. 5, p. 437-442, set-out., 2000.

CANTÓN, E.; PEMÁN, J.; SASTRE, M.; ROMERO, M.; ESPINEL-INGROFF, A. Killing kinetics of caspofungin, micafunigin, and amphotericin B against *Candida guilliermondii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, n. 8, p. 2829-2832, aug. 2006.

CARDONA-CASTRO, N.; REVANKAR, G.; ORTIZ, P.; CUERVO, C.; KIRKPATRICK, W. R.; McATEE, R. K.; PATTERSON, T. F. Proteinase detection, DNA typing and antimycotic susceptibility of *Candida* isolates from colombian women with vulvovaginal candidiasis. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 19, p. 89-94, 2002.

CARRASCO, L.; RAMOS, M.; GALISTEO, R.; PISA, D.; FRESNO, M.; GONZÁLES, M. E. Isolation of *Candida famata* from a patient with acute zonal occult outer retinopathy. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 2, p. 635-640, feb. 2005.

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

CHAFFIN, W. L.; LÓPEZ-RIBOT, J. L.; CASANOVA, M.; GOZALBO, D.; MARTÍNEZ, J. P. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 62, n. 1, p. 130-180, mar. 1998.

CHAKRABARTI, A.; RAO, P.; TARAI, B.; SHIVAPRAKASH, R.; WIG, J. *Candida* in acute pancreatitis. *Surgery Today*, v. 37, p. 207-211, 2007.

CHANUSSOT, C.; ARENAS, R. Infección micótica plantar e interdigital en pacientes con onicomicosis. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 24, p. 118-121, 2007.

CHAVES, G. M.; CAVALCANTI, M. A. Q.; PORTO, A. L. F. Pathogenicity characteristics of stocked and fresh yeast strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, p. 197-202, 2003.

CHENG, S.; CLANCY, C. J.; CHECKLEY, M. A.; ZHANG, Z.; WOZNIAK, K. L.; SESHAN, K. R.; JIA, H. Y.; FIDEL-Jr, P.; COLE, G.; NGUYEN, M. H. The role of *Candida albicans* NOT5 in virulence depends upon diverse host factors in vivo. *Infection and Immunity*, v. 73, n. 11, p. 7190-7197, nov. 2005.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 5, p. 599-607, set-out. 2003.

COLOMBO, A. L.; GUMARÃES, T. Candidúria: uma abordagem clínica e terapêutica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n. 3, p. 332-337, mai.-jun. 2007.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 8, p. 2816-2823, aug. 2006.

COOGAN, M. M.; FIDEL-JR, P. L.; KOMESU, M. C.; MAEDA, N.; SAMARANAYAKE, L. P. *Candida* and mycotic infections, *Advances in Dental Research*, v. 19, p. 130-138, apr. 2006.

CORTÉS, C. M.; OKSENBERG, D. R.; AFANI, A. S.; DEFILIPPI, C. C.; MADRID, A. M. S. Candidiasis esofágica en paciente inmunocompetentes: estudio clínico e inmunológico. *Revista Médica de Chile*, v. 132, p. 1394-1389, 2004.

CRAMPIN, H.; FINLEY, K.; GERAMI-NEJAD, M.; COURT, H.; GALE, C.; BERMAN, J.; SUDBERY, P. *Candida albicans* hyphae have a Spitzenkörper that is distinct from the polarisome found in yeast and pseudohyphae. *Journal of Cell Science*, v. 118, n. 13, p. 2935-2947, 2005.

CROCCO, E. I.; MIMICA, L. M. J.; MURAMATU, L. H.; GARCIA, C.; SOUZA, V. M.; RUIZ, L. R. B.; ZAITZ, C. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica *in vitro*: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 76, n. 6, p. 689-697, nov. 2004.

D'ANTONIO, D.; ROMANO, F.; PONTIERI, E.; FIORITONI, G.; CARACCILO, C.; BIANCHINI, S.; OLIOSSO, P.; STANISCIA, T.; SFERRA, R.; BOCCIA, S.; VETUSCHI, A.; FEDERICO, G.; GAUDIO, E.; CARRUBA, G. Catheter-related candidemia caused by *Candida lipolytica* in a patient receiving allogeneic bone marrow transplantation. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 4, p. 1381-1386, apr. 2002.

D'ANTONIO, D.; VIOLANTE, B.; MAZZONI, A.; BONFINI, T.; CAPUANI, M. A.; D'ALOIA, F.; IACONE, A.; SCHIOPPA, F.; ROMANO, F. A nosocomial cluster of *Candida*

*inconspicua* infections in patients with hematological malignancies. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 3, p. 792-795, mar. 1998.

DARMSTADT, G. L.; DINULOS, J. G.; MILLER, Z. Congenital cutaneous candidiasis: clinical presentation, pathogenesis, and management guidelines. *Pediatrics*, v. 105, p. 438-444, 2000.

DESNOS-OLLIVIER, M.; RAGON, M.; ROBERT, V.; RAOUX, D.; GANTIER, J.-C.; DROMER, F. *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*), a rare human fungal pathogen often misidentified as *Pichia guilliermondii* (*Candida guilliermondii*). *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, n. 10, p. 3237-3242, oct. 2008.

DIOGO, H. C.; SARPIERI, A.; PIRES, M. C. Preservação de fungos em água destilada. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 80, n. 6, p. 591-594, 2005.

DORKO, E.; JAUTOVA, J.; TKÁČIKOVA, C.; WANTRUBOVA, A. The frequency of *Candida* species in onychomycosis. *Folia Microbiologica*, v. 47, n. 6, p. 727-731, 2002.

DOUGLAS, L.J. Medical importances of biofilms in *Candida* infections. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 19, p. 139-143, 2002.

DURÁN, E. L.; MUJICA, M. T.; JEWUCHOWICZ, V. M.; FINQUELIEVICH, J. L.; PINONI, M. V.; IOVANNITTI, C. A. Estudio de la variabilidad genética entre aislamientos clínicos de *Candida albicans* formadores de biopelículas. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 24, 268-271, 2007.

ESCOBAR, M. L.; CARMONA-FONSECA, J. Onicomicosis por hongos ambientales no dermatofíticos. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 2, p. 6-10, 2003.

FAVEL, A.; MICHEL-NGUYEN, A.; DATRY, A.; CHALLIER, S.; LECLERC, F.; CHASTIN, C.; FALLAGUE, K.; REGLI, P. Susceptibility of clinical isolates of *Candida lusitanae* to five systemic antifungal agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 53, p. 526-529, 2004.

FIDEL-JR, P. L.; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clinical Microbiology Review*, v. 12, n. 1, p. 80-96, jan. 1999.

FORCHE, A.; MAY, G.; BECKERMAN, J.; KAUFFMAN, S.; BECKER, J.; MAGEE, P. T. A system for studying genetic changes in *Candida albicans* during infection. *Fungal Genetics and Biology*, v. 39, p. 38-50, 2003.

FOXMAN, F. The epidemiology of vulvovaginal candidiasis: risk factors. *American Journal of Public Health*, v. 80, n.3, p. 329-341, 1990.

FRANQUET, T.; MÜLLER, N. L.; LEE, K. S.; OIKONOMOU, A.; FLINT, J. D. Pulmonary candidiasis after hematopoietic stem cell transplantation: thin-section CT findings. *Radiology*, v. 236, n. 1, p. 332-337, jul. 2005.

FUJINO, S.; AKIYAMA, D.; AKABOSHI, S.; FUJITA, T.; WATANABE, Y.; TAMAI, Y. Purification and characterization of phospholipase B from *Candida utilis*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 70, n. 2, p. 377-386, 2006.

FURMAN, R. M.; AHEARN, D. G. *Candida ciferrii* and *Candida chiropterorum* isolated from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 18, n. 5, p. 1252-1255, nov. 1983.

GAMBOA, A. B.; MENDOZA, M.; FERNÁNDEZ, A.; DÍAZ, E. Detection of *Candida dubliniensis* in patients with candidiasis in Caracas, Venezuela. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 23, p. 81-81, 2006.

GARCÍA-MARTOS, P.; GARCÍA-AGUDO, R.; HERNÁNDEZ-MOLINA, J. M.; MARÍN, P.; TALLERO, E.; MIRA, J. Identificación de levaduras de interés clínico en el medio de cultivo CHROMagar *Candida*. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 15, p. 131-135, 1998.

GARCÍA-MARTOS, P.; RUIZ-ARAGÓN, J.; GARCÍA-AGUDO, L.; SALDARREAGA, A.; LOZANO, M. C.; MARÍN, P. Aislamiento de *Candida ciferrii* en un paciente inmunodeficiente. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 21, p. 85-86, 2004.

GEIGER, A. M.; FOXMAN, B.; GILLESPIE, B. W. The epidemiology of vulvovaginal candidiasis among university students. *American Journal of Public Health*, v. 85, n. 8, p. 1146-1148, 1995.

GIRMENIA, C.; PIZZARELLI, G.; CRISTINI, F.; BARCHIESI, F.; SPREGHINI, E.; SCALISE, G.; MARTINO, P. *Candida guilliermondii* fungemia in patients with hematologic malignancies. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 7, p. 2458-2464, jul. 2006.

GODOY, G.; WAHAB, S. A.; LIMA, A. L. H.; MOREIRA, H. Endoftalmite por *Candida albicans* após transplante penetrante de córnea – relato de caso. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, v. 67, p. 349-352, 2004.

GODOY-MARTINEZ, P.; NUNES, F. G.; TOMIMORI-YAMASHITA, J.; URRITIA, M.; ZAROR, L.; SILVA, V.; FISCHMAN, O. Onychomycosis in São Paulo, Brasil. *Mycopathologia*, v. 168, p. 111-116, 2009.

GOMEZ-LOPEZ, A.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; RODRIGUEZ, D.; ALMIRANTE, B.; PAHISSA, A.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA-ESTRELLA, M. Prevalence and susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: results from population-based surveillance of candidemia in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, n. 4, p. 1506-1509, apr. 2008.

GONZÁLES, M. I.; MENDOZA, M.; ALBORNOZ, M. B.; APITZ-CASTRO, R. Efectos del ajoeno sobre dermatofitos, *Candida albicans* y *Malassezia furfur*. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 15, p. 277-281, 1998.

GRAF, B.; ADAM, T.; ZILL, E.; GÖBEL, U. B. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of yeasts and yeast-like organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 5, p. 1782-1785, may, 2000.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in Fungal Taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, n. 3, p. 454-500, jul. 1999.

GULLU, A. U.; AKCAR, M.; ARNAZ, A.; KIZILAY, M. *Candida parapsilosis* tricuspid native valve endocarditis: 3-year follow-up after surgical treatment. *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery*, v. 7, p. 513-514, 2008.

GUNSILIUS, E.; LASS-FLÖRL, C.; KÄHLER, C. M.; GASTL, G.; PETZER, A. L. *Candida ciferrii*, a new fluconazole-resistant yeast causing systemic mycosis in immunocompromised patients. *Annals of Hematology*, v. 80, p. 178-179, 2001.

GUPTA, A.; MI, H.; WROE, C.; JAQUES, B.; TALBOT, D. Fatal *Candida famata* peritonitis complicating sclerosing peritonitis in a peritoneal dialysis patient. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 21, p. 2036-2037, 2006.

HAKKI, M.; STAAB, J. F.; MARR, K. A. Emergence of *Candida krusei* isolate with reduced susceptibility to caspofungin during therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, n. 7, p. 2522-2524, jul. 2006.

HATA, D. J.; HALL, L.; FOTHERGILL, A. W.; LARONE, D. H.; WENGENACK, N. L. Multicenter evaluation of the new VITEK 2 advanced colorimetric yeast identification card. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, n. 4, p. 1087-1092, apr. 2007.

HAZEN, K. C.; THEISZ, G. W.; HOWELL, S. A. Chronic urinary tract infection due to *Candida utilis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, n. 3, p. 824-827, mar. 1999.

HERNANDEZ, S.; GONZALEZ, G. M.; MCCARTHY, D. I.; COLOMBO, A. L.; NAJVAR, L. K.; BOCANEGERA, R.; GRAYBILL, J. R. Alternative to amphotericin B for *Candida rugosa* infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 54, p. 477-480, 2004.

HILMIOGLU-POLAT, S.; METIN, D. Y.; INCI, R.; DERELI, T.; KILINÇ, I.; TÜMBAY, E. Non-dermatophytic molds as agents of oychomycosis in Izmir, Turkey – a prospective study. *Mycopathologia*, v. 160, p. 125-1258, 2005.

HROMATKA, B. S.; NOBLE, S. M.; JOHNSON, A. D. Transcriptional Response of *Candida albicans* to Nitric Oxide and the Role of the *YHB1* Gene in Nitrosative Stress and Virulence. *Molecular Biology of the Cell*, v. 16, p. 4814-4826, oct. 2005.

HUBE, B. From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology*, v. 7, p. 336-341, 2004.

JAMES, J. J.; LAKSHMI, B. S.; RAVIPRASAD, V.; ANANTH, M. J.; KANGUEANE, P.; GAUTAM, P. Insights from molecular dynamics simulations into pH-dependent enantioselective hydrolysis of ibuprofen esters by *Candida rugosa* lipase. *Protein Engineering*, v. 16, n. 12, p. 1017-1024, 2003.

JAYATILAKE, J. A. M. S.; TILAKARATNE, W. M.; PANAGODA, G. J. Candidal onychomycosis: a mini-review. *Mycopathologia*, v. 168, p. 165-173, 2009.

JONG, A. Y.; CHEN, S. H. M.; STINS, M. F.; KIM, K. S.; TUAN, T. L.; HUANG, S.-H. Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. *Journal of Medical Microbiology*, v. 52, p. 615-622, 2003)

JONG, A. Y.; STINS, M. F.; HUANG, S.-H.; CHEN, S. H. M.; KIM, K. S. Traversal of *Candida albicans* across Human Blood-Brain Barrier In Vitro. *Infection and Immunity*, v. 69, n. 7, p. 4536-4544, jul. 2001.

KALKANCI, A.; KOKTURK, N.; SENOL, E.; ACAR, K.; GUZEL, O.; SANCAK, B.; KUSTIMUR, S.; HAZNEDAR, R. Could *Candida dubliniensis* be involved in lung fungal balls? *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 22, p. 157-159, 2005.

KHAN, Z. U. AHMAD, S.; MOKADDAS, E.; CHANDY, R. Tobacco agar, a new medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 10, p. 4796-4798, oct. 2004.

KHAN, Z. U.; AL-SWEIH, N. A.; AHMAD, S.; AL-KAZEMI, N.; KHAN, S.; JOSEPH, L.; CHANDY, R. Outbreak of fungemias among neonates caused by *Candida haemulonii* resistant to amphotericin B, itraconazole, and fluconazole. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, n. 6, p. 2025-2027, june. 2007.

KNIGHT, S. A. B.; VILAIRE, G.; LESUISSE, E.; DANCIS, A. Iron acquisition from transferrin by *Candida albicans* depends on the reductive pathway. *Infection and Immunity*, v. 73, n. 9, p. 5482-5492, sept. 2005.

KOBAYASHI, H.; KOMIDO, M.; WATANABE, M.; MATSUDA, K.; SUZUKI, M.; IKEDA, T.; OYAMADA, H.; SHIBATA, N.; SUZUKI, S. Structure of cell wall mannan of *Candida kefyr* IFO 0586. *Infection and Immunity*, v. 62, n. 10, p. 4425-4431, oct. 1994.

KOBRYNSKI, L.; TANIMUNE, L.; KILPATRICK, L.; CAMPBELL, D. E.; DOUGLAS, S.D. Production of T-helper cell subsets and cytokines by lymphocytes from patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 3, n. 6, p. 740-745, nov. 1996.

KOCSUBÉ, S.; TÓTH, M.; VÁGVÖLGYI, C.; DÓCZI, L.; PESTI, M.; PÓCSI, I.; SBAZÓ, J.; VARGAS, J. Occurrence and genetic variability of *Candida parapsilosis* sensu lato in Hungary. *Journal of Medical Microbiology*, v. 56, p. 190-195, 2007.

KONDO, K.; SAITO, T.; KAJIWARA, S.; TAKAGI, M.; MISAWA, N. A transformation system for the yeast *Candida utilis*: use of a modified endogenous ribosomal protein gene as a drug-resistant marker and ribosomal DNA as an integration target for vector DNA. *Journal of Bacteriology*, v. 177, n. 24, p. 7171-7177, dec. 1995.

KUHN, D. M.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infection and Immunity*, v. 70, n. 2, p. 878-888, feb. 2002.

KWON-CHUNG, K. J.; WICKES, B.L.; SALKIN, I. F.; KOTZ, H. L.; SOBEL, J. D. Is *Candida stellatoidea* disappearing from the vaginal mucosa? *Journal of Clinical Microbiology*, v. 28, n. 3, p. 600-601, mar. 1990.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. *Tratado de micologia médica Lacaz*. 9 ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104 p.

LAFHEY, S. F.; BUTLER, G. Potype swiching affects biofilm formatio by *Candida parapsilosis*. *Microbiology*, v. 151, p. 1073-1081, 2005.

LAN, L.; XU, J. Multiple gene genealogical analyses suggest divergence and recent clonal dispersal in the opportunistic pathogen *Candida guilliermondii*. *Microbiology*, v. 152, p. 1539-1549, 2006.

LARONE, D. H. *Medically important fungi: a guide to identification*. 4 ed. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 2002, 409 p.

LARREGINA, A.; BARTOLETTI, B.; ROMANO, H.; PANICCIA, L.; POLINI, N. N. Candidiasis hepatoesplénica en un paciente com leucemia mielóide aguda. *Revista Argentina de Microbiología*, v. 36, p. 28-30, 2004.

LEHMANN, P. F.; WU, L.-C.; PRUITT, W. R.; MEYER, S. A.; AHEARN, D. G. Unrelatedness of groups of yeasts within the *Candida haemulonii* complex. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, n. 7, p. 1683-1687, jul. 1993.

LILIC, D.; GRAVENOR, I.; ROBSON, N.; LAMMAS, D. A.; DRYSDALE, P.; CALVERT, J. E.; CANT, A. J.; ABINUM, M. Deregulated production of protective cytokines in response to *Candida albicans* infection in patiens with chronic mucocutaneous candidiasis. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 10, p. 5690-5699, oct. 2003.

LI, L.; REDDING, S.; DONGARI-BAGTZOGLOU, A. *Candida glabrata*, an emerging oral opportunistic pathogen. *Journal of Dental Research*, v. 86, n. 3, p. 204-215, 2007.

LIMA, K. M.; DELGADO, M.; REGO, R. S. M. R.; CASTRO, C. M. M. B. *Candida albicans* e *Candida tropicalis* isoladas de onicomucose em pacientes HIV-positivo: co-resistência in vitro aos azólicos. *Revista de Patologia Tropical*, v. 37, n. 1, p. 57-64, jan.-abr. 2008.

LOGUE, M. E.; WONG, S.; WOLF, K. H.; BETLER, G. A genome sequence survey shows that tha pathogenic yeast *Candida parapsilosis* has a devective *MTL1* allele at its mating locus. *Eukaryotic Cell*, v. 4, n. 6, p. 1009-1017, jun. 2005.

LOÏEZ, C.; WALLET, F.; SENDID, B.; COURCOL, R. J. Evaluation of VITEK 2 colorimetric cards versus fluorimetric cards for identification of yeasts. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 56, p. 455-457, 2006.

LUPETTI, A.; GUZZI, G.; PALADINE, A.; SWART, K.; CAMPA, M.; SENESI, S. Molecular typing of *Candida albicans* in oral candidiasis: karyotype epidemiology with humam immunodeficiency virus-seropositive patiens in comparison with that with healthy carries. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 5, p. 1238-1242, may 1995.

LUPETTI, A.; TAVANTI, A.; DAVINI, P.; GHELARDI, E.; CORSINI, V.; MERUSI, I.; BOLDRINI, A.; CAMPA, M.; SENESI, S. Horizontal transmission of *Candida parapsilosis*

candidemia in a neonatal intensive care unit. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 7, p. 2363-2369, jul. 2002.

LUSINI, M.; CHELLO, M.; POLLARI, F.; COVINO, E. Giant vegetation in prosthetic valve *Candida albicans* endocarditis. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, v. 34, p. 456, 2008.

MAGEE, B. B.; MAGEE, P. T. Recent advances in the genomic analysis of *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 22, p. 187-193, 2005.

MAJOROS, L.; KARDOS, G.; BELÁK, Á.; MARÁZ, A.; ASZTALOS, L.; CSÁNKY, E.; BARTA, Z.; SZABÓ, B. Restriction enzyme analysis of ribosomal DNA shows that *Candida inconspicua* clinical isolates can be misidentified as *Candida norvegensis* with traditional diagnosis producers. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 11, p. 5250-5253, nov. 2003.

MAJOROS, L.; KARDOS, G.; FEISZT, P.; SZABÓ, B. Efficacy of anphotericin B and flucytosine against fluconazole-resistant *Candida inconspicua* clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 56, p. 253-254, 2005a.

MAJOROS, L.; KARDOS, G.; SZABÓ, B.; KOVÁCS, M.; MARÁZ, A. Fluconazole susceptibility testing of *Candida inconspicua* clinical isolates: comparison of four methods. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 55, n. 2, p. 275-276, 2005b.

MAJOROS, L.; KARDOS, G.; SZABÓ, B.; SIPCZKI, M. Caspofungin susceptibility testing of *Candida inconspicua*: correlation of different methods with minimal fungicidal concentration. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, n. 8, p. 3486-3488, aug. 2005c.

MARTINS, E. A.; GUERRER, L. V.; CUNHA, K. C.; SOARES, M. M. C. N.; ALMEIDA, M. T. G. Onicomiose: estudo clínico, epidemiológico e micológico no município de São José do Rio Preto. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n. 5, p. 596-598, set-out. 2007.

McCULLOUGH, M. J.; CLEMOS, K. V.; STEVENS, D. A. Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, n. 2, p. 417-421, feb. 1999.

McGINNIS, M. R.; PADHYE, A. A.; AJELLO, L. Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeasts, and some aerobic actinomycetes in sterile distilled water. *Applied Microbiology*, v. 28, n. 2, p. 218-222, aug. 1974.

McMANUS, B. A.; COLEMAN, D. C.; MORAN, G.; PINJON, E.; DIOGO, D.; BOUGNOUX, M.-E.; BORECKÁ-MELKUSOVA, S.; BUJDÁKOVA, H.; MURPHY, P.; D'ENFERT, C.; SULLIVAN, D. J. Multilocus sequence typing reveals that the population structure of *Candida dubliniensis* is significantly less divergent than that of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, n. 2, p. 652-664, feb. 2008.

MEDEIROS, E. A. S.; LOTT, T. J.; COLOMBO, A. L.; GODOY, P.; COUTINHO, A. P.; BRAGA, M. S.; NUCCI, M.; BRANDT, M. E. Evidence for pseudo-outbreak of *Candida*

*guilliermondii* fungemia in a university hospital in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, n. 3, p. 942-947, mar. 2007.

MENEZES, E. A.; CAVALCANTE, M. S.; FARLAS, R. B.; TEIXEIRA, A. B.; PINHEIRO, F. G.; BEZERRA, B. P.; TORRES, J. C. N.; CUNHA, F. A. Frequência e atividade enzimática de *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de crianças de uma creche da prefeitura de fortaleza. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 41, n. 1. p. 9-13, fev. 2005.

MENEZES, E. A.; GUERRA, A. C. P.; RODRIGUES, R. C. B.; PEIXOTO, M. M. L. V.; LIMA, L. S.; CUNHA, F. A. Isolamento de *Candida* spp. no mamilo de lactantes do banco de leite humano da universidade federal do ceará e teste de susceptibilidade a antifúngicos. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 40, n. 5, p. 299-305, ago. 2004.

MESA, L. M.; ARCAÑA, N.; CAÑAS, O.; MACHADO, Y.; CALVO, B. Evaluación de los caracteres fenotípicos para diferenciar *Candida albicans* de *Candida dubliniensis*. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 21, p. 135-138, 2004.

MICOLOGY ONLINE. The University of Adelaide – Austrália.

Disponível em: <<http://www.mycology.adelaide.edu.au/>>. Acesso em: 02 de setembro de 2009.

MILLER, N. S.; DICK, J. D.; MERZ, W. G. Phenotypic switching in *Candida lusitanae* on copper sulfate indicator agar: association with amphotericin B resistance and filamentation. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 4, p. 1536-1539, apr. 2006.

MIRANDA, K.C.; ARAUJO, C. R.; KHRAIS, C. H. A.; LEMOS, J. A.; COSTA, C. R.; SOUZA, L. K. H.; PASSOS, X. S.; FERNANDES, F. L.; SILVA, M. R. R. Identificação de leveduras do gênero *Candida* nas unhas e em descamação de pele em Goiânia (GO), durante o ano de 2003. *Revista de Patologia Tropical*, v. 34, n. 1, p. 123-128, maio-ago. 2005.

MONGE, R. A.; ROMÁN, E.; NOMBELA, C.; PLA, J. The MAP kinases signal transduction network in *Candida albicans*. *Microbiology*, v. 152, p. 905-912. 2006.

MORAN, G.; STOKES, C.; THEWES, S.; HUBE, B.; COLEMAN, D. C.; SULLIVAN, D. Comparative genomics using *Candida albicans* DNA microarrays reveals absence and divergence of virulence-associated genes in *Candida dubliniensis*. *Microbiology*, v. 150, p. 3363-3382, 2004.

MORGAN, M. A.; WILKOWSKE, C. J.; ROBERTS, G. D. *Candida pseudotropicalis* fungemia and invasive disease in an immunocompromised patient. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 20, n. 5, p. 1006-1007, nov. 1984.

MOSAID, A. A.; SULLIVAN, D. J.; COLEMAN, D. C. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on pal's agar. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 10, p. 4787-4789, oct. 2003.

MOSCA, C. O.; MORAGUES, M. D.; LLOVO, J.; MOSAID, A. A.; COLEMAN, D. C.; PONTÓN, J. Casein agar: a useful medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 3, p. 1259-1262, mar. 2003.

MUNSON, E. L.; TROY, D.R.; WEBER, J. K.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A. Presumptive identification of *Candida kefyr* on levine formulation of eosin methylene blue agar. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 11, p. 4281-4284, nov. 2002.

NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S. J.; HUBE, B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 67, n. 3, p. 400-428, sep. 2003.

NETO, A. A.; HAMDAN, J. S.; SOUZA, R. C. Prevalência de cândida na flora vaginal de mulheres atendidas num serviço de planejamento familiar. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 21, n. 8, p. 441-445, 1999.

NETO, M. M.; COSTA, R. S.; REIS, M. A.; GARCIA, T. M. P.; FERRAZ, A. S.; SABER, L. T. S.; BATISTA, E. P. N.; MUGLIA, V.; FIGUEIREDO, J. F. C. Candidíase em pacientes transplantados renais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 30, n. 6, p. 485-491, nov.-dez. 1997.

NIELSEN, H.; STENDERUP, J.; BRUUN, B.; LADEFOGED, J. *Candida norvegensis* peritonitis and invasive disease in a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 28, n. 7, p. 1664-1665, jul 1990.

NOËL, T.; FAVEL, A.; MICHEL-NGUYEN, A.; GOUMAR, A.; FALLAGUE, K.; CHASTIN, C.; LECLERC, F.; VILLARD, J. Differentiation between atypical isolates of *Candida lusitanae* and *Candida pulcherrima* by determination of mating type. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 3, p. 1430-1432, mar. 2005.

NOËL, T.; FRANÇOIS, F.; PAUMARD, P.; CHASTIN, C.; BRÈTHES, D.; VILLARD, J. Flucytosine-fluconazole cross-resistance in purine-cytosine permease-deficient *Candida lusitanae* clinical isolates: indirect evidence of a fluconazole uptake transporter. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, n. 4, p. 1275-1284, apr. 2003.

ODDS, F. C.; Effects of temperature on anti-*Candida* activities of antifungal antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 37, n. 4, p. 685-691, apr. 1993.

OKAWA, Y.; GOTO, K. Antigenicity of cell wall mannans of *Candida albicans* and *Candida stellatoidea* cultured at high temperatures in BACTEC médium. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 29, n. 8, p. 1723-1727, aug. 2006.

OKEKE, C. N.; TSUBOI, R.; OGAWA, H. Quantification of *Candida albicans* actin mRNA by the lightcycler system as a means of assessing viability in a model of cutaneous candidiasis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 10, p. 3491-3494, oct. 2001.

OKUNGBOWA, F. I.; ISIKHUEMHEN, O. S.; DEDE, A. P. O. The distribution frequency of *Candida* species in the genitourinary tract among symptomatic individuals in Nigerian cities. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 20, p. 60-63, 2003.

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

OYEFARA, B. I.; KIM, H. C.; DANZIGER, R. N.; CARROLL, M.; GREENE, J. M.; DOUGLAS, S. D. Autoimmune hemolytic anemia in chronic mucocutaneous candidiasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 1, n. 1, p. 38-43, jan. 1994.

PEMÁN, J.; APARISI, N.; GARCÍA-ESTEBAN, C.; GOBERNADO, M. Utilidad de una nueva técnica comercial, GLABRATA RTT, para la identificación rápida de *Candida glabrata*. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 21, p. 82-84, 2004.

PERAZZO, P. S. L.; MARTIN, L. R. L.; MOURA, M. P. C.; MELO, M. A. M.; CARVALHO, M. S. Candidíase laringea isolada em paciente imunocompetente: relato de caso e revisão literária pertinente. *Revista Brasileira de otorrinolaringologia*, v. 70, n. 2, p. 278-282, mar.-abr. 2004.

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

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; COLOMBO, A. L.; KIBBLER, C.; NG, K. P.; GIBBS, D. L.; NEWELL, V. A.; GLOBAL ANTIFUNGAL SUVEILLANCE GROUP. *Candida rugosa*, an emerging fungal pathogen with resistance to azoles: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 10, p. 3578-3582, oct. 2006a.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; GIBBS, D. L.; NEWELL, V. A.; NAGY, E.; DOBIASOVA, S.; RINALDI, M.; BARTON, R.; VESELOV, A.; GLOBAL ANTIFUNGAL SURVEILLANCE GROUP. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program, 2001 to 2005. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, n. 2, p. 515-521, feb. 2008.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; MENDEZ, M.; KIBBLER, C.; ERZSEBET, P.; CHANG, S.-C.; GIBBS, D.L.; NEWELL, V. A. GLOBAL ANTIFUNGAL SURVEILLANCE GROUP. *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 10, p. 3551-3556, oct. 2006b.

PINEDA, G.; SCOLLO, K.; SANTISO, G.; LEHMANN, E.; ARECHAVALA, A. Aislamiento de *Candida dubliniensis* em distintos materiales clínicos. Análisis de métodos fenotípicos de diferenciación com *Candida albicans*. *Revista Argentina de Microbiología*, v. 40, p. 211-217, 2008.

PINJON, E.; SULLIVAN, D.; SALKIN, I.; SHANLEY, D.; COLEMAN, D. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 7, p. 2093-2095, jul. 1998.

PISA, D.; RAMOS, M.; MOLINA, S.; GARCÍA, P.; CARRASCO, L. Evolution of antibody response and fungal antigens in the serum of a patient infected with *Candida famata*. *Journal of Medical Microbiology*, v. 56, p. 571-578, 2007.

RAJAGOPALAN, B.; MATHEWS, M. S.; JACOB, M. Vaginal colonisation by *Candida lipolytica*. *Genitourinary Medicine*, v. 72, p. 146-147, 1996.

RAMAGE, G.; SAVILLE, S. P.; THOMAS, D. P.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryotic Cell*, v. 4, n. 4, p. 633-638, apr. 2005.

RAMAGE, G.; VANDEWALLE, K.; WICKES, B. L.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 18, p. 163-170, 2001.

RAY, D.; GOSWAMI, R.; BANERJEE, U.; DADHWAL, V.; GOSWAMI, D.; MANDAL, P.; SREENIVAS, V.; KOCHUPILLAI, N. Prevalence of *Candida glabrata* and its response to boric acid vaginal suppositories in comparison with oral fluconazole in patients with diabetes and vulvovaginal candidiasis. *Diabetes Care*, v. 30, n. 2, p. 312-317, feb. 2007.

REICHART, P. A.; SAMARANAYAKE, L. P.; SAMARANAYAKE, Y. H.; GROTE, M.; POW, E.; CHEUNG, B. High oral prevalence of *Candida krusei* in leprosy patients in northern Thailand. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 12, p. 4479-4485, dec. 2002.

RODERO, L.; CUENCA-ESTRELLA, M.; CÓRDOBA, S.; CAHN, P.; DAVEL, G.; KAUFMAN, S.; GUELFAND, L.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J.L. Transient fungemia caused by an amphotericin B-resistant isolate of *Candida haemulonii*, *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 6, p. 2266-2269, jun. 2002.

RODRIGUES, E. G.; LÍRIO, V. S.; LACAZ, C. S. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse medico em água destilada. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 34, n. 2, p. 159-165, mar.-abr. 1992.

RODRIGUES, G. M. C.; CAPOBIANCO, T. D.; ATIQUÉ, T. S. C.; CONCEIÇÃO, L. M.; FRAGA, V. D.; GIANNINI, M. J. S.; MAIA, I. L.; MACHADO, R. L. D.; ALMEIDA, M. T. G.; ROSSIT, A. R. B. Estudo de colonização por *Candida* sp. na cavidade oral de indivíduos soropositivos e soronegativos para HIV-1 no Noroeste Paulista, Brasil. *Revista Panamericana de Infectología*, v. 9, n. 3, p. 26-31, 2007.

RODRÍGUEZ, V. E.; FREULER, C. B.; EZCURRA, C.; DURLACH, R. A. Colecistitis aguda e infección de la via biliar por *Candida*. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 24, p. 152-154, 2007.

ROILIDES, E.; FARMAKI, E.; EVDORIDOU, J.; FRANCESCONI, A.; KASAI, M.; FILIOTI, J.; TSIVITANIDOU, M.; SOFIANOU, D.; FREMENOPOULOS, G.; WALSH, T. J. *Candida tropicalis* is a neonatal intensive care unit: epidemiologic and molecular analysis of na outbreak of infection with na uncommon neonatal pathogen. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 2, p. 735-741, feb. 2003.

ROMANI, L.; BISTONI, F.; PUC CETTI, P. Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. *Current Opinion in Microbiology*, v. 6, p. 338-343, 2003.

SÁNCHEZ-VARGAS, L. O.; PÉREZ-RIOS, P.; ROMO-GARCÍA, J.; CORONA-IZQUIERDO, F. P.; HIDLAGO-LOPERENA, H.; FRANCO-MARTÍNEZ, F. Determinación

de pH salival y cultivo en pacientes con candidosis bucal VHI positivos y VHI negativos. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 19, p. 155-160, 2002.

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

SANDVEN, P.; BEVANGER, L.; DIGRANES, A.; HAUKLAND, H. H.; MANNSAKER, T.; GAUSTAD, P. Candidemia in Norway (1991 to 2003): results from a nationwide study. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 6, p. 1977-1981, jun. 2006.

SANDVEN, P.; NILSEN, K.; DIGRANES, A.; TJADE, T.; LASSEN, J. *Candida norvegensis*: a fluconazole-resistant species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 41, n. 6, p. 1375-1376, jun. 1997.

SCHMITT, J.; BROCCA, S.; SCHMID, R. D.; PLEISS, J. Blocking the tunnel: engineering of *Candida rugosa* lipase mutants with short chain length specificity. *Protein Engineering*, v. 15, n. 7, p. 595-601, 2002.

SENDID, B.; LACROIX, C.; BOUGNOUX, M.-E. Is *Candida kefyr* an emerging pathogen in patients with oncohematological diseases? *Clinical Infectious Diseases*, v. 43, p. 666-667, 2006.

SHEMER, R.; WEISSMAN, Z.; HASHMAN, N.; KORNIETZER, D. A highly polymorphic degenerate microsatellite for molecular strain typing of *Candida krusei*. *Microbiology*, v. 147, p. 2021-2028, 2001.

SHEPPARD, D. C.; LOCAS, M.-C.; RESTIERI, C.; LAVERDIERE, M. Utility of the germ tube test for direct identification of *Candida albicans* from positive blood culture bottles. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, p. 10, p. 3508-3509, oct. 2008.

SHINOBU, C. S.; OGATTA, S. F. Y.; BIZERRA, F.; FURLANETO, L.; PERALTA, R. M.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Lack of association between genotypes and virulence factors in *C. albicans* strains isolated from vagina secretion. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 467-471, 2007.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 388 p.

SIMONETTI, O.; BERNADINI, M. L.; ARZENI, D.; CELLINI, A.; BARCHIESI, F.; OFFIDANI, A. Epidemiology of onychomycosis and paronychia in the area of Ancona (Italy) over a period of 5 years. *Mycopathologia*, v. 158, p. 271-274, 2004.

SIVAKUMAR, V. G.; SHANKAR, P.; NALINA, K.; MENON, T. Use of CHROMagar in the differentiation of common species of *Candida*. *Mycopathologia*, v. 167, p. 47-49, 2009.

SOLL, D. R.; LOCKHART, S. R.; ZHAO, R. Mating and virulence of *Candida albicans*. *Mycologist*, v. 17, p. 64-69, may. 2003a.

SOLL, D. R.; LOCKHART, S. R.; ZHAO, R. Relationship between Switching and Mating in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, v. 2, n. 3, p. 390-397, jun. 2003b.

SOUZA, E. A. F.; ALMEIDA, L. M. M.; GUILHERMETTI, E.; MOTA, V. A.; ROSSI, R. M.; SVIDZINSKI, T. I. E. Frequência de onicomicoses por leveduras em Maringá, Paraná, Brasil. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 82, n. 2, p. 151-156, 2007.

STARY, A.; SOELTZ-SZOETS, J.; ZIEGLER, C.; KINGHORN, G. R.; ROY, K. B. Comparison of the efficacy and safety of oral fluconazole, and topical clotrimazole in patients with candida balanitis. *Genitourinary Medicine*, v. 72, p. 98-102, 1996.

SUDBERY, P.; GOW, N.; BERMAN, J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, v. 12, n. 7, p. 313-324, jul. 2004.

SUJITA, T.; TAKASHIMA, M.; POONWAN, N.; MEKHA, N. *Candida pseudohaemulonii* sp. nov., na amphotericin B- and azole-resistant yeast species, isolated from the blood of a patient from Thailand. *Microbiology and Immunology*, v. 50, n. 6, p. 469-473, 2006.

SULLIVAN, D. J.; MORAN, G.; DONNELLY, S.; GEE, S.; PINJON, E.; McCARTAN, B.; SHANLEY, D. B.; COLEMAN, D. C. *Candida dubliniensis*: an update. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 16, p. 72-76, 1999.

TAN, G. L.; PETERSON, E. M. Chromagar candida medium for direct susceptibility testing of yeast from blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 4, p. 1727-1731, apr. 2005.

TILL, J. W. O. Van; MODDERMAN, P. W.; BOER, M.; HART, M. H. L.; BELD, M. G. H. B.; BOERMEESTER, M. A. Mannose-binding lectin deficiency facilitates abdominal *Candida* infections in patients with secondary peritonitis. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 15, n. 1, p. 65-70, jan. 2008.

TIRABOSCHI, I. N.; CARNOVALE, S.; BENETUCCI, A.; FERNÁNDEZ, N.; KURLAT, I.; FOCCOLI, M.; LASALA, M. B. Brote de candidemia por *Candida albicans* em neonatologia. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 24, p. 263-267, 2007.

TUMBARELLO, M.; POSTERARO, B.; TRECARICHI, E. M.; FIORI, B.; ROSSI, M.; PORTA, R.; DONATI, K. G.; SORDA, M. L.; SPANU, T.; FADDA, G.; CAUDA, R.; SANGUINETTI, M. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, n. 6, p. 1843-1850, jun. 2007.

URIZAR, J. M. A. Candidiasis orales. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 19, p. 17-21, 2002.

VANDEPUTTE, P.; LARCHER, G.; BERGÈS, T.; RENIER, G.; CHABASSE, D.; BOUCHARA, J.-P. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolates of *Candida tropicalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, p. 11, p. 4608-4615, nov. 2005.

VIGOURUX, S.; MORIN, O.; MOREAU, P.; HAROUSSEAU, J.-L.; MILPIED, N. Candidemia in patients with hematologic malignancies: analysis of 7 years' experience in a single center. *Haematologica*, v. 91, p. 717-718, 2006.

VITEK<sup>®</sup> 2 YST e VITEK<sup>®</sup> 2 Compact, bioMérieux<sup>®</sup> S.A. Dados fornecidos pelo fabricante através da usuária do aparelho, setor de Patologia Clínica (Bacteriologia) do Instituto Fernandez Figueira – FIOCRUZ. Em novembro de 2009.

VOS, M. C.; ENDTZ, H. P.; HORST-KREFT, D.; DOORDUIJN, J.; LUGTENBURG, E.; VERBRUGH, H. A.; LÖWENBERG, B.; MARIE, S.; PELT, C.; BELKUM, A. *Candida krusei* transmission among hematology patients resolved by adapted antifungal prophylaxis and infection control measures. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 3, p. 1111-1114, mar. 2006.

WAGNER, D. K.; SOHNLE, P. G. Cutaneous defenses against dermatophytes and yeasts. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 8, n. 3, p. 317-335, jul. 1995.

WALSH, T. J.; SALKIN, I. F.; DIXON, D. M.; HURD, N. J. Clinical, microbiological, and experimental animal studies of *Candida lipolytica*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 27, n. 5, p. 927-931, may 1989.

WARWOOD, N. M.; BLAZEVIC, D. J. Comparison of cream of rice agar and horse serum for differentiating germ tubes of *Candida albicans* from filaments of *Candida tropicalis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 5, n. 4, p. 501-502, apr. 1977.

WAUGH, M. A.; EVANS, E. G. V.; NAYYAR, K. C.; FONG, R. Clotrimazole (canesten) in the treatment of candidal balanitis in men. *British Journal of Venereal Diseases*, v. 54, p. 184-186, 1978.

WEBER, K.; SOHR, R.; SCHULZ, B.; FLEISCHHACKER, M.; RUHNKE, M. Secretion of *E*, *E*-Farnesol and biofilm formation in eight different *Candida* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, n. 5, p. 1859-1861, may 2008.

WHITEWAY, M.; BACHEWICH, C. Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annual Review of Microbiology*, v. 61, p. 529-553, 2007.

YOSIPOVITCH, G.; TUR, E.; COHEN, O.; RUSECKI, Y. Skin surface pH in intertriginous areas in NIDDM patients: possible correlation to candidal intertrigo. *Diabetes Care*, v. 16, n. 4, p. 560-563, apr. 1993.

ZAUGG, C.; ZEPELIN, M. B.-V.; REICHARD, U.; SANGLARD, D.; MONOD, M. Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. *Infection and Immunity*, v. 69, n. 1, p. 405-412, jan. 2001.

ZIARRUSTA, G. B. Vulvogaginitis candidiásica. *Revista Iberoamericana de Micologia*, v. 19, p. 22-24, 2002.

9 APÊNDICES

## 9.1 MODELO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Título do Projeto: “Agentes de Candidíase Cutânea: Identificação das Espécies, Testes de Atividade de Fosfolipase e Proteinase, e Sensibilidade a Antifúngicos”.

Pesquisadores responsáveis: Esp. Leonardo Silva Barbedo e Dr.<sup>a</sup> Diana Bridon da Graça Sgarbi.

Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense (UFF).

Laboratório de Estruturas Superficiais de Fungos, 2.º andar, sala 209. Rua Professor H. Pires de Mello 101, São Domingos, Niterói – RJ. Telefone de contato: (21) 2629-2410.

Nome do voluntário: \_\_\_\_\_

R.G.: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ anos.

Responsável legal (quando for o caso): \_\_\_\_\_

R.G.: \_\_\_\_\_

O (A) Sr. (ª) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa “Agentes de Candidíase Cutânea: Identificação das Espécies, Testes de Atividade de Fosfolipase e Proteinase, e Sensibilidade a Antifúngicos”, de responsabilidade dos pesquisadores Leonardo Silva Barbedo (Especialista) e Diana Bridon da Graça Sgarbi (Doutora).

A candidíase é uma doença causada por microorganismos conhecidos como *Candida* (fungos), e se manifesta em diferentes partes do corpo. Pode ser encontrada tanto em crianças como adultos, principalmente debilitados e aqueles em condições favoráveis. Quando presente na pele é conhecida como candidíase cutânea, abrangendo a pele propriamente dita, unhas, regiões entre os dedos (frieiras), dobras da pele, boca (sapinho), língua, dentre outras partes.

Objetivos: Especificar qual o microorganismo do grupo *Candida*, fazer testes de “agressividade” (fosfolipase e proteinase), e testes de medicamentos (antifúngicos), nestes microorganismos.

Justificativa: Conhecer especificamente qual o microorganismo, a forma que ele agride, e o melhor medicamento a ser usado, possibilitará um melhor tratamento para outros da comunidade com a mesma doença.

Metodologia: O material será coletado por pessoal capacitado, e se for um microorganismo do grupo *Candida*, será por nós pesquisado.

Toda e qualquer informação obtida será confidencial, ou seja, o nome do voluntário não será associado aos resultados, e sim será atribuído um número para cada voluntário, logo, somente os pesquisadores envolvidos saberão quem está relacionado a cada número.

A participação é voluntária, e que este consentimento poderá ser anulado a qualquer momento por desejo do voluntário.

Para esclarecer quaisquer outras dúvidas, procurar os pesquisadores responsáveis.

**Esp. Leonardo Silva Barbedo**  
Mestrando do PPGMPA, UFF  
Tels.: (21) 2260-3044 e 87377725  
E-mail: lsbarbedo@hotmail.com

**Dr.<sup>a</sup> Diana Bridon da Graça Sgarbi**  
Professora de Micologia, UFF  
Tel.: (21) 2629-2410  
E-mail: dbridon@globo.com

**Declaro ter sido informado e concordo com os devidos termos mencionados para participação como voluntário do projeto de pesquisa acima descrito, autorizando a utilização e a divulgação dos resultados obtidos, por meios de comunicação científica, desde que meu nome não seja revelado.**

Niterói, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável por obter o consentimento.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente ou seu representante legal.

\_\_\_\_\_  
Testemunha I.

\_\_\_\_\_  
Testemunha II.

**Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina do Hospital Universitário Antônio Pedro.**  
Rua Marquês de Paraná 303, 4.º andar do Prédio Anexo, Centro, Niterói – RJ – 24230-030  
Tel.: (21) 2629-9189 – E-mail: ética@vm.uff.br

9.2a SEQUÊNCIA DE PROCEDIMENTOS NAS AMOSTRAS COM PRESENÇA DE BACTÉRIAS OU *Trichosporon*

Amostra	BHI + Clo + Pen	Tubo II de SDA	Placa de SDA
399/08 upd d/e	B	T	BT
400/08 uqpd d/e	B	T	-
519/08 uqd e/B	B	-	-
519/08 uqd e/V	B	-	-
546/08 uqd	B	T	T
571/08 uqd	BB	--	B
594/08 upd pool I *	B	T	-
594/08 upd pool II	B	T	-
601/08 uqd	BB	-	-
606/08 updh d/e	B	T	-
607/08 upd	BB	-	-
608/08 updh d/e I	B	T	-
608/08 updh d/e II	B	T	-
625/08 updh d/e I	B	T	-
625/08 updh d/e II	B	T	-
652/08 uqd e	B	-	-
662/08 pdint d/e	BB	T	T
666/08 updh d/e	B	-	-
671/08 updh d/e	BB	T	-
11/09 pdplant d/e I	B	T	-
11/09 pdplant d/e II	B	T	-
22/09 cut pool I	B	-	-
22/09 cut pool II	B	-	-
24/09 uqd d/e	-	-	-
26/09 uqd d	BB	-	-
37/09 cut mi	B	-	-
43/09 updh d/e	-	-	-
46/09 updh e	-	-	-
49/09 uqd pool I	BB	-	-
49/09 uqd pool II	B	-	-
49/09 upd pool III	B	-	-
52/09 uqd *	-	-	-
55/09 cut ing	BB	-	-

\* Amostras removidas da contagem geral por motivo do microrganismo não ser do gênero *Candida*, por não ter sido identificado o gênero ou a espécie ser semelhante quando se pensava em infecção mista.

BHI + Clo + Pen = infusão cérebro coração + cloranfenicol + benzilpenicilina benzatina;

SDA = ágar Sabouraud-dextrose a 4%;

B = amostra com presença de bactéria;

BB = amostra onde a etapa de BHI acrescido de cloranfenicol não foi suficiente para diminuir as bactérias, logo uma nova cultura de BHI com cloranfenicol mais a solução de benzilpenicilina benzatina foi realizada;

T = amostra com presença de *Trichosporon*.

9.2b SEQUÊNCIA DE PROCEDIMENTOS NAS AMOSTRAS COM PRESENÇA DE BACTÉRIAS OU *Trichosporon* (Continuação)

Amostra	BHI + Clo + Pen	Tubo II de SDA	Placa de SDA
56/09 uqd	BB	-	-
57/09 uqd d/e	B	-	-
60/09 pdint d/e	-	T	-
62/09 upd	BB	-	-
71/09 updh d/e	B	-	-
78/09 cut nad *	B	-	-
84/09 uqd pool	BB	-	-
107/09 upd	-	-	-
111/09 uqd d/e *	B	-	-
118/09 uqd pool *	-	-	-
125/09 pdplant	-	-	-
126/09 pdint	-	-	-
136/09 uqd	BB	-	-
140/09 uqd	B	-	-
145/09 cut mama	-	-	-
152/09 updh d/e	-	-	-
153/09 uqd d/e	-	-	-
154/09 uqd d	-	-	-
175/09 pdplant	-	-	-
184/09 updh d/e	-	-	-
187/09 uqd	BB	-	-
189/09 updh d	-	-	-
190/09 pdint *	-	-	-
209/09 uqd	-	-	-
217/09 updh d/e	-	-	-
218/09 upd	-	-	-
230/09 updh d/e	-	-	-
233/09 cut mi	-	-	-
240/09 uqd d/e	BB	-	B
247/09 updh d I	BB	T	-
247/09 updh d II *	-	-	-
254/09 cut ccab	-	-	-

\* Amostras removidas da contagem geral por motivo do microrganismo não ser do gênero *Candida*, por não ter sido identificado o gênero ou a espécie ser semelhante quando se pensava em infecção mista.

BHI + Clo + Pen = infusão cérebro coração + cloranfenicol + benzilpenicilina benzatina;

SDA = ágar Sabouraud-dextrose a 4%;

B = amostra com presença de bactéria;

BB = amostra onde a etapa de BHI acrescido de cloranfenicol não foi suficiente para diminuir as bactérias, logo uma nova cultura de BHI com cloranfenicol mais a solução de benzilpenicilina benzatina foi realizada;

T = amostra com presença de *Trichosporon*.

9.3 CONTEÚDOS DOS POÇOS VITEK<sup>®</sup> 2 YST (n.º do poço, teste e quantidade)

3 L-Lisina ARILAMIDASE LysA 0.0228 mg
4 Assimilação L-MALATO IMLTa 0.15 mg
5 Leucina -ARILAMIDASE LeuA 0.0234 mg
7 ARGININA GP ARG 0.15 mg
10 Assimilação ERITRITOL ERYa 0.3 mg
12 Assimilação GLICEROL GLYLa 0,16 µL
13 Tirosina ARILAMIDASE TyrA 0.0276 mg
14 BETA-N-ACETIL-GLUCOSAMINIDASE BNAG 0.0408 mg
15 Assimilação ARBUTINA ARBa 0.3 mg
18 Assimilação AMIGDALINA AMYa 0.3 mg
19 Assimilação D-GALACTOSE dGALa 0.3 mg
20 Assimilação GENTIOBIOSE GENa 0.3 mg
21 Assimilação D-GLUCOSE dGLUa 0.3 mg
23 Assimilação LACTOSE LACa 0.96 mg
24 Assimilação METIL-A-D-GLUCOPIRANOSÍDEO MAdGa 0.3 mg
26 Assimilação D-CELLOBIOSE dCELa 0.3 mg
27 GAMA-GLUTAMIL-TRANSFERASE GGT 0.0228 mg
28 Assimilação D-MALTOSE dMALa 0.3 mg
29 Assimilação D-RAFINOSE dRAFa 0.3 mg
30 PNP-N-acetil-BD-galactosaminidase 1 NAGA1 0.0306 mg
32 Assimilação D-MANOSE dMNEa 0.3 mg
33 Assimilação D-MELIBIOSE dMELa 0.3 mg
34 Assimilação D-MELEZITOSE dMLZa 0.3 mg
38 Assimilação L-SORBOSE ISBEa 0.3 mg
39 Assimilação L-RAMNOSE IRHAa 0.3 mg
40 Assimilação XILITOL XLTa 0.3 mg
42 Assimilação D-SORBITOL dSORa 0.1875 mg
44 Assimilação SACAROSE/SUCROSE SACa 0.3 mg
45 UREASE URE 0.15 mg
46 ALFA-GLUCOSIDASE AGLU 0.036 mg
47 Assimilação D-TURANOSE dTURa 0.3 mg
48 Assimilação D-TREALOSE dTREa 0.3 mg
49 Assimilação NITRATO NO3a 0.03 mg
51 Assimilação L-ARABINOSE IARAa 0.3 mg
52 Assimilação D-GALACTURONATO dGATa 0.15 mg
53 Hidrolise ESCULINA ESC 0.225 mg
54 Assimilação L-GLUTAMATO IGLTa 0.15 mg
55 Assimilação D-XILOSE dXYLa 0.3 mg
56 Assimilação DL-LACTATO LATa 0.15 mg
58 Assimilação ACETATO ACEa 0.15 mg
59 Assimilação CITRATO (SÓDIO) CITa 0.15 mg
60 Assimilação GLUCURONATO GRTas 0.15 mg
61 Assimilação L-PROLINA IPROa 0.15 mg
62 Assimilação 2-CETO-D-GLUCONATO 2KGa 0.15 mg
63 Assimilação N-ACETIL-GLUCOSAMINA NAGa 0.15 mg
64 Assimilação D-GLUCONATO dGNTa 0.15 mg

Os cartões VITEK<sup>®</sup> 2 YST possuem 64 poços.

Os poços com números entre 1 e 64 não designados neste quadro estão vazios.

## 9.4 MICRORGANISMOS IDENTIFICADOS PELO VITEK® 2 YST

<i>Candida albicans</i>	<i>Candida utilis</i>
<i>Candida boidinii</i>	<i>Candida zeylanoides</i>
<i>Candida catenulata</i>	<i>Cryptococcus albidus</i>
<i>Candida colliculosa</i>	<i>Cryptococcus laurentii</i>
<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>Candida famata</i>	<i>Cryptococcus terreus</i>
<i>Candida freyschussii</i>	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Geotrichum capitatum</i>
<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Geotrichum klebahnii</i>
<i>Candida haemulonii</i>	<i>Kloeckera spp</i>
<i>Candida inconspicua</i>	<i>Malassezia furfur</i>
<i>Candida intermedia</i>	<i>Malassezia pachydermatis</i>
<i>Candida kefyr</i>	<i>Pichia farinosa</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Kodamaea ohmeri</i>
<i>Candida lambica</i>	<i>Prototheca wickerhamii</i>
<i>Candida lipolytica</i>	<i>Prototheca zopfii</i>
<i>Candida lusitaniae</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>
<i>Candida magnoliae</i>	<i>Rhodotorula minuta</i>
<i>Candida norvegensis</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>
<i>Candida pulcherrima</i>	<i>Stephanoascus ciferrii</i>
<i>Candida rugosa</i>	<i>Trichosporon asahii</i>
<i>Candida sake</i>	<i>Trichosporon inkin</i>
<i>Candida sphaerica</i>	<i>Trichosporon mucoides</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>

52 espécies distribuídas em 14 gêneros.

*Stephanoascus ciferrii* é o teleomorfo do anamorfo *Candida ciferrii*.

# 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](#)