

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia

JOSÉ ANTONIO GUIMARÃES FERREIRA

**Epidemiologia de candidemia em quatro hospitais gerais
de Belo Horizonte, MG, Brasil, e avaliação da formação
de biofilmes por espécies de *Candida*.**

Orientadora:
Prof^a Dr^a Maria Aparecida de Resende

Co-orientador:
Dr. Rodney M. Donlan

Belo Horizonte, 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia

JOSÉ ANTONIO GUIMARÃES FERREIRA

**Epidemiologia de candidemia em quatro hospitais gerais
de Belo Horizonte, MG, Brasil, e avaliação da formação
de biofilmes por espécies de *Candida*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração: Microbiologia

Orientadora:
Prof^a Dr^a Maria Aparecida de Resende

Co-orientador:
Dr. Rodney M. Donlan

Belo Horizonte, 2009

Ferreira, José Antonio Guimarães

Epidemiologia de candidemia em quatro hospitais gerais de Belo Horizonte, MG, Brasil, e avaliação da formação de biofilmes por espécies de *Candida*. [manuscrito]/José Antonio Guimarães Ferreira. -2009.

131 f.; 29,5 cm

Orientadora: Prof^ª Dr^a Maria Aparecida de Resende. Co-orientador: Dr. Rodney M. Donlan

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais- Instituto de Ciências Biológicas- Programa de Pós- graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia- Teses. 2. Biofilmes- Teses. 3. *Candida* sp.4. Epidemiologia. Resende, Maria Aparecida de. II. Universidade Federal de Minas Gerais- Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 119

Dedico

Ao meu Senhor e Salvador Jesus Cristo, por ser a única verdade imutável e por me acompanhar por toda a minha história.

Dedico

À minha esposa amada, Ana Paula, pelo apoio incondicional, amizade, incentivo em todos os momentos e orações durante esta jornada. Você é meu maior presente!

Dedico

Aos meus amados pais, José Vicente e Ivone, pelos valiosos ensinamentos e por todo o carinho dispensado durante a minha formação como ser humano. Obrigado!

Aos meus irmãos, Miguel e Mauro, aos meus sogros, Jane e Wander e aos meus cunhados, Adriana, Cristiano, Poliana e Lígia pelo carinho, apoio e orações.

Agradecimentos

Após esta longa caminhada, consegui realmente entender o que Carlos Drummond de Andrade queria dizer com a seguinte citação: “A orquestra, por mais afinada, não dispensa o apoio e a presença de um bom condutor...” **Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida de Resende**, agradeço pelo seu apoio durante todos estes anos de trabalho sob sua orientação no Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Este período foi duro, porém fundamental na minha decisão entre dois caminhos: ou desistir do meu sonho, ou agarrá-lo, como quem está prestes a perder uma grande chance. Tudo isto me proporcionou crescimento e maturidade, pilares de autoconhecimento e impulsos fundamentais para continuar minha trajetória científica. Hoje meu sonho se concretiza dando asas a outros, fazendo de mim seu sempre aprendiz.

Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. Carlos Ernesto Ferreira Starling**, por compartilhar comigo os desafios do controle das infecções hospitalares, também seu tema de pesquisa, sendo um interlocutor disposto a estimular, ouvir com interesse e ânimo todas as questões, dúvidas e problemas que surgiram durante o processo de reflexão. Por ser um ajudador paciente e generoso e pela coragem de ousar trabalhar com novas idéias e conceitos, correndo os riscos inerentes a esta atitude. Por sua amizade e pela alegria de trabalharmos juntos, eu lhe agradeço.

Ao **Dr. Rodney Donlan**, exemplo de luta, dignidade e perseverança; pelo incentivo e grande apoio técnico, e pelos meses de convivência e trabalho intenso no Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, EUA.

Aos amigos e colegas, **Dr. Estevão Urbano** e **Braúlio Couto**, que me incentivaram e me encorajaram, mesmo antes do início desta trajetória e que durante esta jornada me apoiaram no campo profissional e pessoal.

Aos colegas e colaboradores internacionais diretos e indiretos: **Dr. Mahmoud Ghannoum** e **Dr^a. J. Chandra** (Case Western Reserve, EUA), **Dr. Thomas Walsh** e **Dr. Patrick Murray** (National Institute of Health, EUA), **Dr^a. Denise Cardo**, **Dr. Mathew Arduino**, **Dr^a. Roberta Carey** e **Dr^a. Margaret Willians** (Division of Healthcare Quality Promotion, CDC, EUA) pelas sempre desafiantes discussões e sugestões pertinentes.

Há pessoas indispensáveis, há pessoas inesquecíveis e há quem seja ambos e ainda amigos. **Liz Perez** e **Janice Carr**, agradeço por todo aprendizado que foi muito divertido e pela intensa participação na parte experimental desta tese na Division of Health Care Quality Promotion, CDC, EUA.

Aos **alunos de iniciação científica e pós-graduandos** do Laboratório de Micologia da UFMG que participaram do mesmo momento da minha vida, sempre bem-humorados, prestativos e que me ensinaram muita coisa com seus exemplos de vida e trabalho, tornando este momento muito mais divertido.

Aos companheiros de trabalho e diretores da **Faculdade da Saúde e Ecologia Humana (FASEH)**, **Universidade Vale do Rio Verde (UNINCOR)**, **Pós- Graduação da Faculdade São Camilo** e **CEBIO- Centro de Pesquisa em Biotecnologia**, pela cobertura, direta ou indireta, que me deram nessa longa travessia, assim como pela confiança e compreensão durante os momentos de ausência.

A todas as pessoas que também fazem ou fizeram parte da “Família SCIH” do **Hospital Vera Cruz**, **Hospital LifeCenter**, **Hospital São Francisco de Assis** e **Hospital da Baleia**.

Meu muitíssimo obrigado pelas múltiplas e inestimáveis contribuições.

Ao **CNPq**, que financiou grande parte deste projeto e à **Merck Sharp and Dohme**, pelo fundamental apoio durante a realização dos experimentos no Centers for Disease Control and Prevention, EUA.

À **Prof^a. Dr^a. Erna Geessien Kroon**, sub-coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Ao **Douglas Nunes de Oliveira**, secretário da Pós- Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Finalmente, há muito mais a quem agradecer... A todos aqueles que, embora não nomeados, me brindaram com seu inestimável apoio em distintos momentos e por sua presença afetiva e inesquecível, o meu reconhecido e carinhoso muito obrigado!

Todos vocês são co-autores deste trabalho!

SUMÁRIO

		Página
	LISTA DE SIGLAS	i
	LISTA DE FIGURAS	ii
	LISTA DE TABELAS	iii
	RESUMO	v
1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3	OBJETIVOS	15
4	MATERIAIS E MÉTODOS	16
	4.1 PRIMEIRO SUBPROJETO	17
	4.2 SEGUNDO SUBPROJETO	22
5	RESULTADOS	27
	5.1 EPIDEMIOLOGIA DAS INFEÇÕES HEMATOGÊNICAS POR <i>CANDIDA</i> spp. E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE À DROGAS ANTIFÚNGICAS	27
	5.2 FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR <i>CANDIDA</i> spp.	35
6	DISCUSSÃO	60
7	CONCLUSÃO	66
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
9	ANEXOS	79
	9.1 ARTIGO 3. J. A. Ferreira, J. H. Carr, E. Perez, C. E. F. Starling, M. A. de Resende, and R. M. Donlan. Biofilm formation and the effect of caspofungin on the biofilm structure of <i>Candida</i> spp. bloodstream Isolates.	80
	9.2 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	110
	9.3 RELATÓRIO FINAL CO-ORIENTADOR, EUA	111
	9.4 APROVAÇÃO DO PROJETO PELO CNPQ	112
	9.5 ATIVIDADES EXTRAS REALIZADAS DURANTE TREINAMENTO NOS EUA	114

LISTA DE SIGLAS

MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propano-sulfônico
APACHE	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II
SDA	Ágar sabouraud dextrosado
TSA	Ágar Trypticase soja
AMB	Anfotericina B
TSB	Caldo Trypticase soja
CVC	Cateter venoso central
CAS	Caspofungina
CDC	Centers for Disease Control and Prevencion
cm ²	Centímetro quadrado
CIM	Concentração inibitória minima
PG	Crescimento paradoxal
DMSO	Dimetilsulfóxido
mDFR	Drip flow reactor modificado
EPS	Extracellular polymeric substances
GNC and GPC	Gram negative card e Gram positive card
°C	Grau centigrade
h	Hora
IRDMI	Infecções relacionadas a dispositivos médicos invasivos
IATA	International Air Transport Association
MEV (SEM)	Microscopia eletrônica de Varredura
ml	Mililitro
mm	Milimetro
M	Molar
Nm	Nanômetro
NNISS	National Nosocomial Infection Surveillance Study
PBS	Phosphate buffered saline
% (p/v)	Porcentagem peso por volume
Rpm	Rotações por minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SCIH	Serviço de controle de Infecções Hospitalares
CLSI	The Clinical and Laboratory Standards Institute
UTI	Unidadede Terapia Intensiva

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Biofilme formado por <i>C. parapsilosis</i> em disco silicone após 48 horas de crescimento.	11
Figura 2. Fases da formação do biofilme de <i>Candida albicans</i>	11
Figura 3. Biofilme polimicrobiano de <i>C. albicans</i> e <i>S. epidermidis</i> formado na superfície de um cateter venoso central após 72 horas de crescimento.	12
Figura 4. Sistema Drip flow reactor modificado mostrando as câmaras contendo os segmentos de cateteres	23
Figura 5. Formação de biofilmes de <i>S. epidermidis</i> em placa de microtitulação	35
Figura 6. Formação de biofilmes por <i>Candida parapsilosis</i> ou <i>Staphylococcus epidermidis</i> na presença de biofilmes pré-formados na superfície de CVC.	38
Figura 7. Formação de biofilmes por <i>Candida albicans</i> ou <i>Staphylococcus epidermidis</i> na presença de biofilmes pré-formados na superfície de CVC.	39
Figura 8. Formação de biofilmes por <i>Candida tropicalis</i> ou <i>Staphylococcus epidermidis</i> na presença de biofilmes pré-formados na superfície de CVC.	40
Figura 9. Formação de biofilmes por <i>Candida parapsilosis</i> ou <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na presença de biofilmes pré-formados na superfície de CVC.	41
Figura 10. Formação de biofilmes por <i>Candida albicans</i> ou <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na presença de biofilmes pré-formados na superfície de CVC.	42
Figura 11. Formação de biofilmes por <i>Candida tropicalis</i> ou <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na presença de biofilmes pré-formados na superfície de CVC.	43
Figura 12. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biofilmes formados por <i>C. albicans</i> , em CVCs, na presença ou ausência de biofilmes formados por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ou <i>Staphylococcus epidermidis</i>	46
Figura 13. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biofilmes formados por <i>C. tropicalis</i> , em CVCs, na presença ou ausência de biofilmes formados por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ou <i>Staphylococcus epidermidis</i>	47
Figura 14. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biofilmes formados por <i>C. parapsilosis</i> , em CVCs, na presença ou ausência de biofilmes formados por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ou <i>Staphylococcus epidermidis</i>	48
Figura 15. Imagens das lâminas de vidro contendo os agregados formados entre bactéria e leveduras	49
Figura 16. Efeito inibitório do sobrenadante de biofilmes bacterianos sobre a formação dos biofilmes de <i>Candida</i> spp.	51

Figura 17. Atividade metabólica dos biofilmes formados por <i>Candida</i> spp. após exposição a diferentes concentrações de caspofungina (CAS) e anfotericina B (AMB).	54
Figura 18. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biofilmes formados por <i>Candida tropicalis</i> , em discos de silicone, após exposição a diferentes concentrações de CAS. Biofilmes foram formados por 48 h em meio RPMI 1640.	57
Figura 19. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biofilmes formados por <i>Candida albicans</i> , em discos de silicone, após exposição a diferentes concentrações de CAS. Biofilmes foram formados por 48 h em meio RPMI 1640.	58
Figura 20. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biofilmes formados por <i>Candida parapsilosis</i> , em discos de silicone, após exposição a diferentes concentrações de CAS. Biofilmes foram formados por 48 h em meio RPMI 1640.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais microrganismos isolados a partir de 4824 episódios de infecções de corrente sanguínea em quatro hospitais de Belo Horizonte, MG, Brasil	28
Tabela 2. Distribuição das espécies de <i>Candida</i> causadoras de 168 episódios de candidemia em quatro hospitais de Belo Horizonte, MG, Brasil	29
Tabela 3. Características demográficas, doenças de base e presença de fatores de risco em pacientes com diagnóstico de candidemia em quatro hospitais de Belo Horizonte, MG, Brasil	30
Tabela 4. Associação entre <i>Candida</i> spp. e fatores predisponentes para candidemia em pacientes de quatro hospitais de Belo Horizonte, MG, Brasil	31
Tabela 5. Análise univariada dos fatores prognósticos associados com a mortalidade entre os pacientes com candidemia em quatro hospitais de Belo Horizonte, MG, Brasil.	32
Tabela 6. Análise da mortalidade global e as diferentes espécies de <i>Candida</i> entre pacientes com candidemia em quatro hospitais de Belo Horizonte, MG, Brasil	32
Tabela 7. Padrões de susceptibilidade de 168 isolados recuperados de pacientes portadores de candidemia frente ao antifúngico.	34
Tabela 8. Avaliação da coagregação entre isolados de <i>Candida</i> e bactéria.	49
Tabela 9. Autoaglutinação dos isolados de <i>Candida</i> e bactéria	50
Tabela 10. Resultados dos testes de susceptibilidade de biofilmes e de células planctônicas de <i>Candida</i> spp. frente aos antifúngicos caspofungina e anfotericina B, utilizando os métodos CLSI e XTT	52
Tabela 11. Média da contagem de células viáveis recuperadas a partir dos biofilmes formados por <i>Candida</i> spp. em discos de silicone (CFU/cm ²).	53

Ferreira, José Antônio Guimarães. **Epidemiologia de candidemia em quatro hospitais gerais de Belo Horizonte, MG, Brasil, e avaliação da formação de biofilmes por espécies de *Candida***. Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Aparecida de Resende; Co-orientador: Dr. Rodney M. Donlan, Belo Horizonte: UFMG/ Instituto de Ciências Biológicas, 2009. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas- Microbiologia). 131 f.

O presente estudo investigou a epidemiologia e os perfis de susceptibilidade a drogas antifúngicas de isolados de *Candida* spp. em quatro hospitais terciários de Belo Horizonte, Brasil. Adicionalmente, também foram estudados o processo de formação dos biofilmes por espécies de *Candida* na presença de biofilmes bacterianos pré- formados e de drogas antifúngicas. Em cinco anos de estudo, um total de 4824 episódios de infecções de corrente sanguínea foram identificados, sendo que as espécies de *Candida* estiveram associadas a 168 casos (3,5%). *Candida albicans* foi o agente mais frequentemente isolado nos hospitais estudados, entretanto, as espécies não- *albicans* foram responsáveis por 55% dos isolados, com um predomínio de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Resistência ao fluconazol foi restrita a 8,9% dos isolados. Os casos de candidemia ocorreram em sua maioria nas Unidades de Terapia Intensiva. A mortalidade global foi de 50%, sendo que doenças hematológicas, neutropenia, falência renal aguda, APACHE II >20 e uso de cateteres venosos centrais (CVC) estiveram associados com um risco aumentado de evolução ao óbito. Para a investigação das interações entre espécies de *Candida* e bactérias nos biofilmes, um modelo Drip flow Reactor modificado foi utilizado. A contagem de células viáveis nos biofilmes polimicrobianos foram determinadas e convertidas em Unidade Formadoras de Colônia. Análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram realizadas para se caracterizar a estrutura celular e morfologia dos

biofilmes polimicrobianos. A contagem de células viáveis por cm² de CVC de *C. albicans* e *C. tropicalis* apresentou uma redução na presença de biofilmes formados por *P. aeruginosa* ($p < 0.05$). Biofilmes de *C. albicans* foram inibidos pelos biofilmes pré-formados de *S. epidermidis*. Biofilmes de *C. parapsilosis* não apresentaram interações competitivas com os biofilmes bacterianos. Finalmente, foi avaliada a atividade da caspofungina e da anfotericina B contra biofilmes de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Os resultados evidenciaram o Crescimento Paradoxal na presença de altas concentrações de CAS. Com excessão dos biofilmes formados por *C. parapsilosis*, *C. albicans* e *C. tropicalis* apresentaram PG. Imagens de MEV apresentaram que o PG estava associado com alterações na morfologia celular dos biofilmes, com a presença de células aumentadas, de formato cônico e com morfologias atípicas.

Ferreira, José Antônio Guimarães. **Epidemiologia de candidemia em quatro hospitais gerais de Belo Horizonte, MG, Brasil, e avaliação da formação de biofilmes por espécies de *Candida***. Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Aparecida de Resende; Co-orientador: Dr. Rodney M. Donlan, Belo Horizonte: UFMG/ Instituto de Ciências Biológicas, 2009. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas- Microbiologia). 131 f.

The present study investigated the epidemiology of candidemia and the antifungal drug susceptibility pattern of *Candida* spp. isolates at four tertiary hospitals in Belo Horizonte, Brazil. Additionally, the biofilm formation process of *Candida* spp. bloodstream isolates in the presence of preformed bacteria biofilm and antifungal drugs were also evaluated. Over five years, a total of 4824 episodes of bloodstream infection were identified, and *Candida* species accounted for 168 cases (3.5%). *Candida albicans* was the most frequently isolated *Candida* species in all hospitals, but *Candida* species other than *C. albicans* accounted for 55% of isolates, including predominantly *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*. Azole resistance was restricted to only 8.9% of all *Candida* isolates. Candidemia was mostly documented in Intensive Care Unit Patients. The crude mortality rate was 50%, and hematological malignancy, neutropenia, acute renal failure, high Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II score and use of central venous catheter (CVC) were conditions associated with risk of death. In order to investigate interactions between *Candida* species and bacteria in biofilm grown a modified drip Flow Reactor model was used. Counts of viable microorganisms in the mixed biofilm were determined and converted to colony forming unit. Scanning Electron Microscopy (SEM) analysis was used to characterize the structure and morphology of polymicrobial biofilms. Viable counts of *C. albicans* and *C. tropicalis* per cm² of CVC decreased in the presence of *P. aeruginosa* ($p < 0.05$). *C. albicans* was inhibited by preformed biofilm of *S. epidermidis* isolates. *C. parapsilosis* did not show competitive interactions with bacteria biofilm. Finally, the activity of Caspofungina (CAS) and amphotericin B (AMB) against *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* biofilms were assessed. Paradoxical growth (PG) in the presence of high CAS concentrations was observed. With the exception of *C. parapsilosis*, *C. albicans* and *C. tropicalis*, biofilms displayed PG. Microscopic changes in cell morphology were observed for biofilm cells with PG. Specifically, the accumulation of enlarged, conical and atypical cells were associated with PG.

1. INTRODUÇÃO

As leveduras do gênero *Candida* são patógenos oportunistas responsáveis pela maior parte das infecções fúngicas invasivas nos seres humanos. Essas infecções são reconhecidas na atualidade como uma importante causa de morbidade e mortalidade, em especial na população de pacientes gravemente enfermos e/ou imunocomprometidos.

As leveduras do gênero *Candida* têm sido consideradas entre os principais agentes causadores de infecção de corrente sanguínea de origem hospitalar. Muitos estudos têm apontado estas leveduras como sendo o quarto ou quinto microrganismo mais frequentemente isolado em hemoculturas em diferentes centros médicos do mundo. Estas infecções apresentam uma taxa de mortalidade geral em torno de 50% a 60%, e contribuem diretamente com o aumento do tempo de internação e dos custos assistenciais.

Os fatores predisponentes descritos para o desenvolvimento das candidemias incluem o uso de antibióticos de largo espectro, longo tempo de internação, tratamentos quimioterápicos de duração prolongada, imunossupressão, procedimentos cirúrgicos de grande porte, tratamentos hospitalares intensivos, colonização prévia por *Candida* spp., uso de esteróides, hemodiálise e diálise peritoneal em doentes imunocomprometidos e uso de dispositivos médicos invasivos. Adicionalmente, as infecções da corrente sanguínea causadas por *Candida* spp. podem ser adquiridas por via exógena, através do contato das mãos de profissionais de saúde, implante de próteses contaminadas, bem como pela administração parenteral de soluções contaminadas. Entretanto, destaca-se que estes fatores podem variar de acordo com as características das instituições de saúde e das populações avaliadas.

As principais espécies de *Candida* de interesse clínico são: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii* e *Candida lusitanae*. Porém, número progressivo de casos de doenças invasivas relacionadas e espécies emergentes de *Candida* têm sido descrito, envolvendo isolamentos de *Candida dubliniensis*, *Candida kefyr*, *Candida rugosa*, *Candida famata*, *Candida utilis*, *Candida lipolytica*, *Candida norvegensis*, *Candida inconspicua* entre outras. Estudos indicam uma variação geográfica na distribuição das espécies causadoras dos quadros de candidemias.

Além dos fatores predisponentes relacionados ao hospedeiro, os fatores de virulência ligados ao microrganismo também devem ser considerados como fundamentais no processo de desenvolvimento da candidemia. Dentro deste contexto, a capacidade de adesão e formação de biofilmes, destaca-se como um fator determinante para na patogênese destes quadros. A adesão

destes fungos a células, tecidos ou outro tipo de superfícies expostas à circulação de fluidos, é um pré-requisito para a colonização de um determinado habitat e subsequente infecção. As infecções associadas à utilização de dispositivos médicos invasivos estão diretamente relacionadas com a formação de biofilmes por espécies de *Candida*. Estes biofilmes formados representam o tipo de crescimento microbiano predominante na natureza e são cruciais no desenvolvimento de infecções, uma vez que servem de nicho aos agentes patogênicos e estão associados a altos níveis de resistência a agentes antimicrobianos.

O tratamento antifúngico é necessário em todos os casos de candidemia relacionados ao acesso vascular, devido ao risco de complicações. Entretanto, poucas drogas apresentam uma boa atividade contra os biofilmes formados por *Candida* spp. As equinocandinas e as formulações lipídicas de anfotericina B estão sendo reconhecidas como possíveis alternativas no manejo do processo de formação de biofilmes fúngicos.

Nos últimos anos vêm ocorrendo um aumento significativo no isolamento de leveduras do gênero *Candida*, como agentes das infecções de corrente sanguínea, em centros médicos de todo o Brasil. Este fato, aliado a escassez de dados que revelem detalhes acerca da epidemiologia, aspectos microbiológicos e susceptibilidade às drogas antifúngicas nos episódios de candidemia, na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, somados ao reconhecimento do processo de formação dos biofilmes como etapa fundamental na patogenia das infecções relacionadas aos dispositivos médicos invasivos, estimularam a execução deste estudo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Relevância das infecções de corrente sanguínea causadas por *Candida* spp.

O grande progresso da Medicina nas últimas décadas, tanto no campo clínico quanto no cirúrgico, aumentou a sobrevivência de pacientes antes sem possibilidade terapêutica, crescendo o número de pacientes gravemente enfermos nos hospitais. Estes pacientes tornam-se susceptíveis às infecções por diversos microrganismos, dentre os quais se incluem os fungos. Nas últimas duas décadas a prevalência de infecções fúngicas invasivas aumentou consideravelmente. As leveduras são os principais agentes etiológicos de micoses invasivas e *Candida* é o gênero mais frequentemente envolvido neste tipo de infecção (SINGH, 2001; EGGIMENN *et al.*, 2003; BILLE *et al.*, 2005).

A relevância das infecções por *Candida* no ambiente hospitalar vem sendo abordada por diversos autores. BECK-SAGUÉ & JARVIS (1993) avaliando dados do Center for Diseases Control and Prevention (CDC-Atlanta, Estados Unidos da América) sobre infecções hospitalares em 115 instituições dos Estados Unidos, referentes ao período de 1980 a 1990, relataram um aumento de 2% para 3,8% nas taxas anuais de infecções fúngicas por 1000 altas hospitalares. Ainda segundo esses autores, 78,3% das infecções fúngicas hospitalares naquele período, foram causadas por leveduras do gênero *Candida*.

A ocorrência de casos de infecções da corrente sanguínea provocadas por espécies de *Candida*, infecções estas também chamadas de candidemia, aumentou substancialmente nas últimas décadas em diferentes partes do mundo (SANDVEN, 2000; MORGAN, 2005; PFALLER & DIEKEMA, 2007). As taxas de fungemias em pacientes internados em hospitais universitários nos Estados Unidos sofreram acréscimo da ordem de 400% durante a década de 80 (BANERJEE *et al.*, 1991). Nos anos 90, há informações de estudos epidemiológicos realizados em diversos países do hemisfério norte mostrando que *Candida* spp. é um agente freqüente entre aqueles causadores de infecções de corrente sanguínea. Pfaller *et al.* (1998), avaliaram 4.725 infecções de corrente sanguínea documentadas em 50 centros médicos nos EUA, mostrando que 8% das infecções foram causadas por espécies de *Candida*. Este dado posicionou o gênero *Candida* como o quarto patógeno mais freqüentemente isolado em hemoculturas nos Estados Unidos da América (PFALLER *et al.*, 1998). É importante realçar que além do significativo aumento verificado na incidência de fungemias, a letalidade atribuída a esta complicação infecciosa é da ordem de 40% (WEY *et al.*, 1988).

No Brasil, as melhores casuísticas sobre a relevância de candidemia nosocomial foram publicadas recentemente por Colombo e colaboradores (2006). Estes pesquisadores investigaram prospectivamente os casos de candidemia ocorridos em 11 hospitais de referência localizados em diferentes regiões do Brasil. Os resultados demonstraram uma taxa de 2,4 casos por 1.000 admissões hospitalares, enquanto estudos em hospitais terciários dos EUA e da Europa observaram taxas muito mais baixas, em geral menores que um episódio de candidemia por 1.000 admissões hospitalares. Ainda no estudo publicado por Colombo e colaboradores (2007), as infecções de corrente sanguínea provocadas por leveduras do gênero *Candida* estavam associadas com uma taxa de mortalidade de 50% sendo que grande parte dos casos ocorreram em Unidades de Terapia Intensiva (UTI).

Outros estudos envolvendo um número menor de centros médicos brasileiros vêm sendo publicados e têm contribuído de maneira fundamental para um melhor conhecimento da epidemiologia deste quadro infeccioso no Brasil. Destaca-se, porém, que não foram encontrados relatos publicados na literatura sobre a epidemiologia da candidemia no estado de Minas Gerais, Brasil (NUCCI *et al.*, 1998; COLOMBO *et al.*, 1999; ANTUNES *et al.*, 2004; BARBERINO *et al.*, 2006; COLOMBO *et al.*, 2006; BRITO *et al.*, 2006; PASQUALOTTO *et al.*, 2007; PASSOS *et al.*, 2007).

Em pacientes criticamente enfermos é reconhecido que a gravidade da doença de base, múltiplas transfusões, nutrição parenteral, cirurgias de grande porte, hemodiálise, uso de cateter venoso central, pancreatite, além do tempo de hospitalização e uso de esteróides e de antibióticos de amplo espectro são condições associadas para o desenvolvimento de candidemia (BILLE *et al.*, 2005; PFALLER & DIEKEMA, 2007). Ainda neste cenário, as infecções de corrente sanguínea provocadas por espécies de *Candida* podem ser adquiridas através da via endógena, no qual há a translocação de *Candida* sp. do trato gastrointestinal até os capilares mesentéricos (NUCCI & ANAÏSSIE, 2001) ou exógena, diretamente relacionada ao contato das mãos de profissionais de saúde com pacientes portadores de cateteres venosos central, implante de próteses contaminadas, bem como pela administração parenteral de soluções contaminadas (SINGH, 2001; KRCMERY & BARNES, 2002; EGGIMANN, 2003).

A relevância das espécies não-*albicans* e a formação de biofilmes

Espécies do gênero *Candida* vem sendo descritas como patógenos nosocomiais de importância reconhecida, tanto em pacientes imunocomprometidos, incluindo aqueles em tratamento intensivo e pós-cirúrgico, quanto em pacientes imunocompetentes seriamente enfermos (SANDVEN, 2000; MORGAN, 2005; COLOMBO *et al.*, 2008). Dados sobre os

agentes etiológicos das infecções de corrente sanguínea em UTIs nos EUA indicam que os quatro principais patógenos associados a esses quadros infecciosos são em ordem decrescente de importância: *Staphylococcus* coagulase negativa, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp. e *Candida albicans* (FRIDKIN & GAYNES, 1999).

O aumento no registro de infecções fúngicas por espécies não-*albicans* ocorreu em diversos serviços de saúde do mundo todo. Diferentes casuísticas de hospitais da Europa e Estados Unidos da América ilustram essa tendência no aumento de espécies não-*albicans*. Alguns autores argumentam que este aumento em países do Hemisfério Norte estaria relacionado à pressão seletiva do uso de fluconazol, visto que algumas espécies não-*albicans* podem apresentar um perfil de susceptibilidade variável a esse triazólico (PFALLER & DIEKEMA, 2007; COLOMBO *et al.*, 2008).

A espécie de maior importância médica é a *C. albicans*, sendo esta a espécie isolada com maior frequência a partir de espécimes clínicos, seguida pela *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* que aparecem em cerca de 80% dos isolamentos em candidíases (DIGNANI *et al.*, 2003).. Outras espécies bem documentadas são *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. kefyr* e *C. lusitanae*, tendo sido progressivamente relatadas como causadoras de infecção sistêmica, de modo que, atualmente, em alguns centros hospitalares, a frequência de candidíases invasivas provocadas por espécies não-*albicans* chega a ser maior que aquelas causadas por *C. albicans* (SANDVER, 2000; PFALLER *et al.*, 2001; PFALLER *et al.*, 2004).

No Brasil, as principais espécies causadoras de candidemia são *Candida albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Diferente dos Estados Unidos da América, onde a emergência de espécies não-*albicans* parece estar associada à pressão seletiva do uso de fluconazol, sendo que no Brasil as espécies não-*albicans* mais prevalentes são sensíveis a este fármaco (PFALLER *et al.*, 2000; COLOMBO *et al.*, 2007; COLOMBO *et al.*, 2008).

Hoje se sabe que um dos principais fatores que contribuem para a virulência das diferentes espécies de *Candida* está relacionado com a versatilidade destes microrganismos em adaptar-se a uma grande variedade de habitats formando uma comunidade fúngica comumente aderida a diferentes superfícies (KOJIC & DAROUICHE, 2004). A capacidade dos microrganismos de aderirem a células, tecidos ou outro tipo de superfícies expostas à circulação de fluidos, é um pré-requisito para a colonização de um determinado habitat e subsequente infecção. Por exemplo, a adesão de *Candida* a superfícies dentárias constitui um passo essencial no desenvolvimento de estomatites dentárias (SENEVIRATNE *et al.*, 2008). A candidíase é

normalmente associada à utilização de dispositivos médicos, que acabam por servir de suporte e substrato para o crescimento dos microrganismos.

Em função do caráter endógeno oportunista e da habilidade de colonização, as doenças provocadas pelas leveduras do gênero *Candida* são muito frequentes e representam um dilema para o manejo das infecções relacionadas a dispositivos médicos invasivos (IRDMI) (RAMAGE *et al.*, 2001; KUMAMOTO, 2001; SENEVIRATNE *et al.*, 2008).

Biofilmes e as infecções provocadas por *Candida* spp.

Na microbiologia clássica, praticamente todos os conceitos e conhecimentos adquiridos nos estudos da fisiologia microbiana foram originados a partir de observações das características de crescimento dos microrganismos em meios de cultura ricos em nutrientes e em sua forma livre “planctônica”. Porém, somente há alguns anos, começou-se a entender que, na realidade, a maioria destes seres se encontra no ambiente vivendo em comunidades, de maior ou menor estruturação (DONLAN, 2001). Estas comunidades, também chamadas de biofilmes, são a forma mais comum de crescimento microbiano na natureza. Este processo é comumente caracterizado pela aderência irreversível de microrganismos a superfícies bióticas ou abióticas seguido da formação de microcolônias e produção de uma matriz extracelular de natureza orgânica (extracellular polymeric substances - EPS) (O'TOOLE *et al.*, 2000; DONLAN, 2001; DONLAN & COSTERTON, 2002).

O modo de desenvolvimento em biofilme proporciona, aos microrganismos que o constituem, importantes benefícios, tais como:

- aumento da concentração de nutrientes nas interfaces líquido-biofilme, uma vez que a matriz polimérica favorece a adsorção de moléculas de nutrientes;
- proteção contra factores ambientais agressivos, como alterações de pH, concentrações de sais, desidratação, forças de tensão de corte, substâncias químicas agressivas, bactericidas, antibióticos, predadores, bactérias líticas e metais pesados;
- possibilidade de troca de material genético devido aos longos tempos de retenção dos microrganismos;
- facilidade de desenvolvimento de microconsórcios que permitem o estabelecimento de relações de simbiose bem como a utilização de substratos de difícil degradação;
- capacidade de estabelecer e colonizar nichos ecológicos (O'TOOLE *et al.*, 2000; DONLAN & COSTERTON, 2002).

Na perspectiva clínica, o reconhecimento por parte da classe médica do processo de formação dos biofilmes como uma etapa fundamental da colonização e patogenia nas IRDMI, fez com que este conceito microbiológico, cada vez mais, tivesse lugar garantido nas discussões clínicas em diversos centros médicos do mundo.

De uma forma geral, as características dos biofilmes que podem estar diretamente relacionadas com o desencadeamento de processos infecciosos são: i) o desligamento de microrganismos ou agregados de biofilme que podem resultar em infecção da corrente sanguínea, infecção urinária ou a produção de êmbolo; ii) os microrganismos podem trocar material genético dentro dos biofilmes; iii) os microrganismos que constituem os biofilmes podem apresentar uma redução dramática da susceptibilidade aos agentes antimicrobianos; iv) os microrganismos associados aos biofilmes podem produzir endo ou exotoxinas; e v) os biofilmes são resistentes à ação do sistema imunológico (DONLAN & COSTERTON, 2002).

Dados internacionais sugerem que os biofilmes microbianos são responsáveis de maneira direta por cerca de dois milhões de infecções anuais, resultando em aproximadamente US\$ 11 bilhões em gastos adicionais nos custos assistenciais. Em concordância com esta casuística, um amplo estudo multicêntrico, conduzido em hospitais nos EUA, descreveu que nas UTIs cirúrgicas os quadros infecciosos mais comumente diagnosticados foram às infecções da corrente sanguínea, seguidos pelas infecções urinárias e infecções do trato respiratório, sendo que os autores correlacionaram esta relevante casuística ao extensivo uso de dispositivos médicos invasivos nesta população (RICHARDS *et al.*, 2000; MERMEL *et al.*, 2001; RAAD & HANNA, 2002).

Dentre os dispositivos invasivos, os cateteres intravasculares, principalmente os venosos, são muito utilizados na UTI para a administração de medicamentos, soluções hidroeletrólíticas, sangue e, também, para monitoração de parâmetros fisiológicos. A presença desses cateteres, no sistema venoso profundo representa uma fonte potencial de complicações infecciosas (RAAD & HANNA, 2002). São considerados, como relacionados ao cateter venoso, tanto os episódios de infecção local evidenciados pela colonização do cateter quanto os episódios de infecção sistêmica que ocorrem como resultado direto da colonização e formação de biofilmes sobre este dispositivo (RAAD & BODEY, 1992; O'GRADY *et al.*, 2002).

As infecções relacionadas ao uso de cateteres venosos centrais (CVC) são uma das maiores causas de mortalidade e morbidade entre os pacientes hospitalizados e os biofilmes formados na superfície dos cateteres são associados com 90% destes quadros. Em estudo conduzido em diferentes UTIs gerais americanas, foram detectadas cerca de 80,000 casos de

infecções de corrente sanguínea relacionadas a cateteres. Estas infecções foram responsáveis diretas por um total de 20.000 mortes (MERMEL *et al.* 2001). Estes dados estão de acordo com aqueles publicados pelo programa NNIS (National Nosocomial Infection Surveillance Study), referentes às infecções de corrente sanguínea, demonstrando que 87% destas patologias ocorrem em pacientes que fazem uso de CVC (O'GRADY *et al.*, 2002).

Os organismos mais comumente isolados em biofilmes formados em CVC são os *Staphylococcus* coagulase negativo, *S. aureus*, *Enterococcus*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e *Candida* spp. (MERMEL *et al.* 2001; DONLAN & COSTERTON, 2002). Dentre estes, *C. albicans* é reconhecida como uma das causas mais importante de morbidade e mortalidade em infecções de corrente sanguínea, além de ser considerada a espécie fúngica mais frequentemente associada com as IRDMI. Destaca-se, porém, que as espécies não-*albicans*, especialmente *C. parapsilosis*, vêm sendo relacionadas cada vez mais com a formação de biofilmes e consequentemente com a patogênese das IRDMI (RAMAGE *et al.* 2001; DOUGLAS, 2002; KOJIC & DAROUICHE, 2004; SEREVIRATNE *et al.*, 2008).

Diversos estudos descrevem que as leveduras do gênero *Candida* podem formar biofilmes em uma ampla variedade de superfícies, incluindo tecidos vivos e diferentes biomateriais (KUMAMOTO, 2002; DOUGLAS, 2002; RAMAGE *et al.*, 2006). Além disso, os biofilmes formados espécies de *Candida* veem sendo detectados em quadros infecciosos envolvendo diferentes dispositivos médicos invasivos, tais como CVC, próteses ortopédicas, acessos venosos para diálise, dispositivos cardiovasculares, equipes, cateteres urinários, implantes penianos, próteses vocal, dispositivos intra-uterinos, próteses odontológicas e implantes oculares (KOJIC & DAROUICHE, 2004). Adicionalmente, a maneira versátil de colonização das leveduras do gênero *Candida* nesses dispositivos biomédicos implantáveis faz com que as intervenções baseadas na remoção destes sejam a melhor opção para se obter o real clareamento do processo (KOJIC & DAROUICHE, 2004).

Formação de biofilmes por *Candida* spp.

Geralmente, a dinâmica da formação de biofilme por espécies de *Candida* ocorre em etapas distintas e são dependentes de diversos fatores, como propriedades físico-químicas, característica do meio líquido, pH, disponibilidade de nutrientes, temperatura, cargas iônicas e características da superfície de adesão (KUMAMOTO, 2002; SEREVIRATNE *et al.*, 2008).

Os grandes avanços no conhecimento da estrutura dos biofilmes fúngicos vieram através de estudos de microscopia eletrônica (Figura.1) e de microscopia de fluorescência dos biofilmes

formados por *C. albicans* em diferentes substratos (SEREVIRATNE *et al.*, 2008). Para esta levedura, o processo de formação do biofilme inicia-se com a adesão microbiana seguida da qual se dá o processo de maturação do biofilme (Figura 2) e pode ser dividido em três fases distintas (RAMAGE *et al.*, 2001; KUMAMOTO, 2002; KUHN *et al.*, 2002; SEREVIRATNE *et al.*, 2008) sendo elas as seguintes:

Primeira fase: conhecida como fase de adesão, esta fase ocorre de 0 à 11h após o início do processo de colonização, sendo fundamentalmente caracterizada pela aproximação dos microrganismos à superfície de adesão. Uma vez atingida a distância crítica (<1nm), ocorre a formação de ligações não específicas como, forças eletrostáticas e hidrofóbicas, entre célula fúngica e substrato, dando início ao processo de formação de microcolônias. Geralmente, este substrato contém proteínas ou outros compostos orgânicos que irão influenciar este processo;

Fase intermediária: ocorre de 12 à 30h após o processo inicial de adesão e caracteriza-se pela formação de uma estrutura de bicamadas composta por leveduras (camada basal) e uma estrutura complexa de hifas (camada superior). Destaca-se, ainda, que nesta fase inicia-se a produção do EPS, porém, este ainda se encontra frouxamente ligado às estruturas celulares fúngicas;

Fase de maturação: ocorre de 38 à 72h e caracteriza-se pela presença de uma camada espessa de EPS fortemente aderida às estruturas celulares fúngicas. Nesta fase, as células formam uma complexa rede de leveduras, tubos germinativos, pseudo-hifas e hifas.

Adicionalmente, durante o processo de formação dos biofilmes por *C. albicans*, observa-se a presença de canais de água espalhados por a toda estrutura do biofilme fúngico. Esta estrutura, já bem caracterizada nos biofilmes bacterianos, funciona como um facilitador da difusão de nutrientes e fluxo de água do ambiente para o interior do biofilme, possibilitando desta forma a nutrição das células sésseis presentes na camada basal (SEREVIRATNE *et al.*, 2008).

Biofilmes polimicrobianos

Os biofilmes possuem uma enorme diversidade de espécies microbianas, em que os microrganismos frequentemente encontrados são microalgas, fungos, protozoários, bactérias e vírus (DONLAN, 2001), sendo, no entanto, devido à sua maior versatilidade e resistência, as bactérias e os fungos os microrganismos predominantes. Os fungos do gênero *Candida* devido às suas características como tamanho, elevadas taxas de reprodução, grande capacidade de

adaptação e de produção de substâncias e estruturas extracelulares que as protegem do meio circundante, são consideradas como excelentes produtoras de biofilme (KUMAMOTO, 2002).

Biofilmes heterogêneos formados por diferentes espécies de *Candida* e também aqueles formados pelo conjunto de células sésseis bacterianas e fúngicas (Figura. 3) apresentam um problema médico diferenciado especialmente nos casos em que alguma das espécies envolvidas neste ecossistema expressa um perfil especial de resistência às drogas antimicrobianas. Esta área de estudo, apesar de ainda pouco explorada, tem objetivado elucidar os possíveis fatores microbianos associados à modulação do processo de adesão, colonização e formação dos biofilmes (WARGO & HOGAN, 2006).

Estudos relatam que o desenvolvimento de biofilmes fúngicos compostos de mais de uma espécie de *Candida* estão relacionados com uma complexa relação de simbiose ou competição interespecífica (EL- AZIZI *et al.*, 2004). Esta relação entre espécies diferentes também é evidenciada na presença de biofilmes mistos entre bactérias e fungos. KERR e colaboradores (1999) descreveram o efeito inibitório de substâncias produzidas por *P. aeruginosa* sobre o crescimento de *C. albicans*.

Estes pesquisadores identificaram duas substâncias, a piocianina e a 1-hidroxi- fenazina, como sendo relacionadas a um significativo efeito inibitório sobre fungos. Nesta mesma perspectiva, Hogan & Kolter (2002), em um detalhado estudo *in vitro*, descreveram o marcante efeito inibitório de *P. aeruginosa* sobre a formação de hifas no biofilme de *C. albicans*. Através de técnicas de microscopia estes autores confirmaram a aderência e conseqüente inibição das células bacterianas sobre as estruturas de hifas fúngicas. Interessantemente, este efeito não foi observado para as formas leveduriformes sob as mesmas condições de estudo.

Adam e colaboradores (2002), investigando o processo de formação de biofilmes polimicrobianos entre *C. albicans* e *S. Epidermidis*, indentificaram características diferenciadas de crescimento nos biofilmes mistos. Segundo eles, biofilmes fúngicos e bacterianos cresceram “harmoniosamente”, destacando-se que, quando um mutante bacteriano possuidor de uma fraca capacidade de formar biofilmes foi incluído no experimento, a adesão e formação de biofilme pelo isolado bacteriano foi aumentada na presença de células fúngicas sésseis.

Apesar de avanços obtidos nos últimos anos, impotantes questões relativas ao processo de formação de biofilmes entre *Candida* e diferentes bacterias permenecem ainda sem resposta (WARGO & HOGAN, 2006).

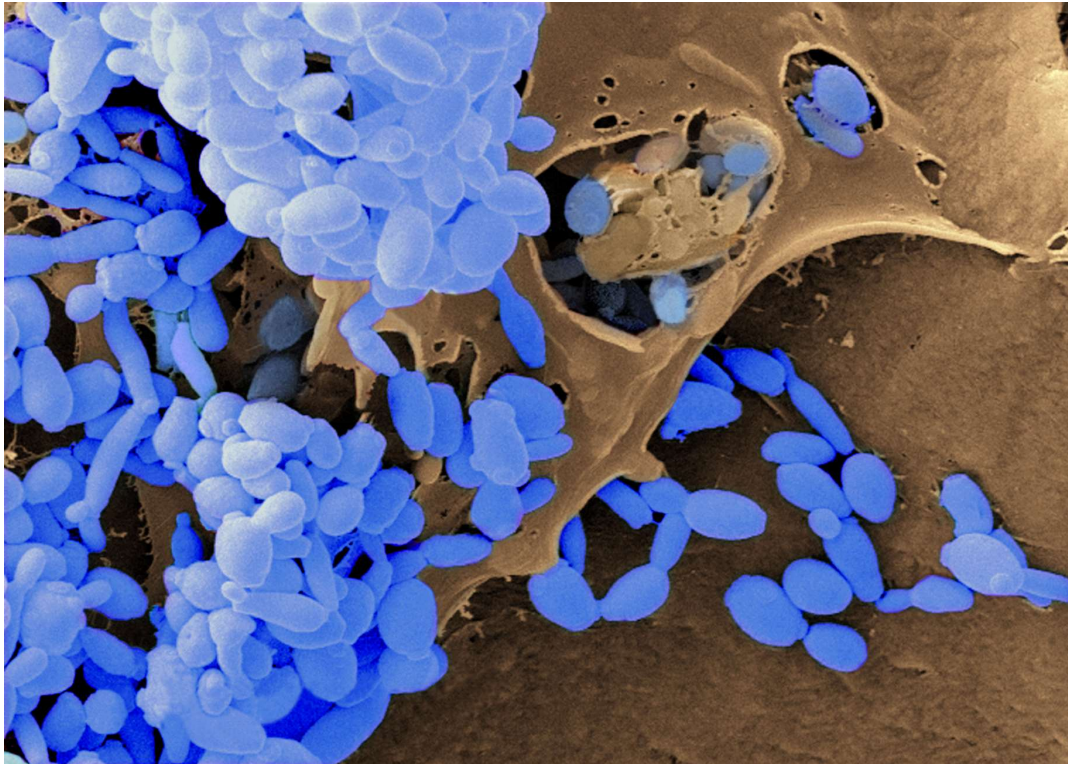


Figura 1: Biofilme formado por *C. parapsilosis* em disco de silicone após 48 horas de crescimento.

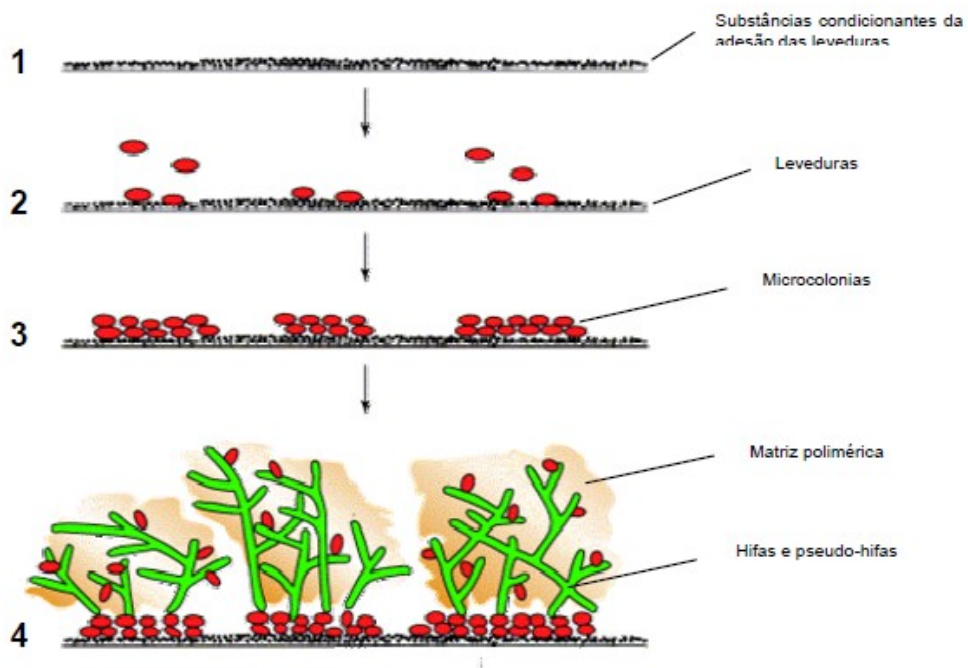


Figura 2. Fases da formação do biofilme de *Candida albicans*. **1** – Superfície com uma camada de substâncias condicionantes; **2** – Fase de adesão: ligação primária das leveduras ao substrato e início de formação das microcolônias. **3** – Fase intermediária: Formação das camadas basais das microcolônias de leveduras aderidas à superfície e início da produção da matriz polimérica extracelular (EPS). **4** – Fase de maturação: Formação das microcolônias por adição da formação de hifas, pseudo-hifas e EPS extracelular que envolve as células. Adaptado de KUMAMOTO, 2002.

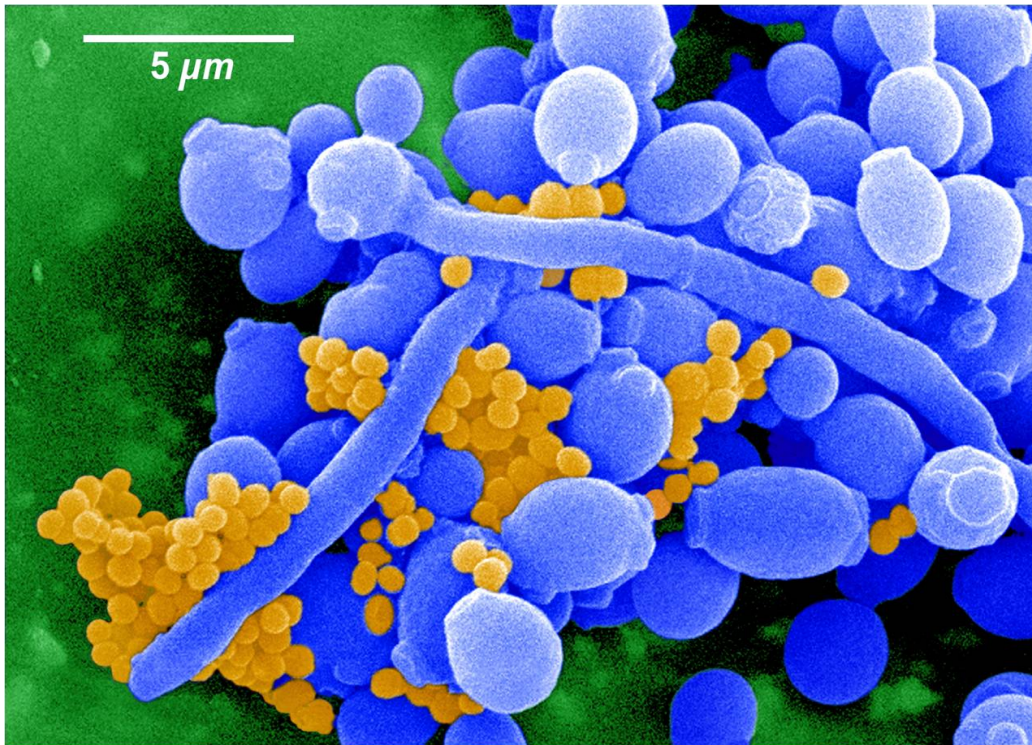


Figura 3. Biofilme polimicrobiano de *C. albicans* e *S. epidermidis* formado na superfície de um cateter venoso central após 72 horas de crescimento.

Resistência às drogas antifúngicas em biofilmes e o papel da caspofungina

O aumento da resistência das espécies de *Candida* quando em crescimento sob a forma de células sésseis já se encontra bem descrito na literatura. Hawser & Douglas (1995) observaram uma resistência *in vitro* de 30 a 200 vezes maior em células associadas aos biofilmes quando estas foram expostas a diferentes agentes antifúngicos, incluindo a anfotericina B, fluconazol, itraconazol e cetoconazol. Pesquisas subsequentes confirmaram estas observações (MUKHERJEE & CHANDRA, 2004). Em especial, a resistência ao fluconazol, que é uma das drogas mais prescritas para o manejo das infecções fúngicas, tem despertado um especial interesse do meio científico. Especificamente para esta droga, a resistência *in vitro* do biofilme formado por *C. albicans* pode aumentar de 250 a 400 vezes quando comparada com os resultados obtidos para células planctônicas. Estudos *in vivo* confirmam este perfil diferenciado de resistência apresentado pelos biofilmes formados por *Candida* spp. (KUMAMOTO, 2002; KUHN & GHANNOUM, 2004).

O perfil diferenciado de resistência aos antifúngicos evidenciados nos biofilmes formados por espécies de *Candida* tem implicações clínicas sérias que resultam diretamente no aumento da morbidade, mortalidade e custos para o sistema de saúde. Porém, novas perspectivas para o manejo das infecções associadas com a formação de biofilmes estão surgindo decorrentes do

desenvolvimento de novas drogas antifúngicas e inclusão destas no arsenal terapêutico. Neste cenário, as equinocandinas e as formulações lipídicas de anfotericina B vêm apresentando um grande avanço na perspectiva do controle de biofilmes formados por espécies de *Candida*. Dados científicos sugerem que estas novas moléculas apresentam uma particular atividade *in vitro* contra biofilmes quando utilizadas em concentrações terapêuticas (RAMAGE *et al.*, 2001; KUHN & GHANNOUM, 2004).

As equinocandinas são hexâmeros cíclicos de aminoácidos que inibem a síntese da parede celular fúngica através de uma ligação não competitiva na enzima β - (1,3) glucanasintase prevenindo a formação da β - (1,3) glucana, um componente essencial da parede celular dos fungos. Adicionalmente, esta classe de antifúngico possui características muito interessantes em relação ao perfil de toxicidade, espectro de ação e à boa atividade e penetração em biofilmes fúngicos (GEORGOPAPADAKOU, 2001; KUHN & GHANNOUM, 2004; KAUFFMAN & CARVER, 2008).

Do ponto de vista quantitativo, as β - (1,3)-glucanas são um dos principais constituintes da parede celular de *C. albicans*, respondendo por aproximadamente 60% do seu peso seco. Como parte importante da superfície externa da célula fúngica, este componente desempenha um papel crítico nas interações com o ambiente e, conseqüentemente, com os diferentes e complexos processos de reconhecimento e adesão aos diversos substratos. Desta forma, a parede celular fúngica, e em especial a β -(1,3)-glucanas, caracterizam-se como um alvo atrativo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, tendo em vista o controle das infecções relacionadas com biofilmes fúngicos (RAMAGE *et al.*, 2001; SEREVITNE *et al.* 2008).

Neet e colaboradores (2007) avaliaram a produção da β -(1,3)-glucanas em modelos *in vivo* e *in vitro* de biofilmes em cateteres venosos centrais e células planctônicas. Através de experimentos utilizando técnicas de microscopia eletrônica e também um teste específico para detecção deste componente (Fungitell®), determinou-se o perfil de secreção de glucanas na parede celular fúngica. Os resultados indicaram que em condições associadas aos biofilmes, as espécies de *Candida* produzem 4 a 10 vezes mais quantidade de β -(1,3)-glucanas quando comparadas às células livres ($P < 0.001$). Estes resultados sugerem que em condições de microcolônias as células leveduriformes expressam de maneira efetiva uma maior quantidade de glucanas na parede celular, indicando que estas estruturas podem estar diretamente relacionadas ao processo de reconhecimento e colonização de biomateriais e superfícies.

A caspofungina (CAS) é um dos representantes desta classe terapêutica, sendo a primeira equinocandina liberada para uso clínico no Brasil. Esta droga apresenta uma boa atividade terapêutica nas infecções invasivas causadas por espécies de *Candida*, além de apresentar um

excelente perfil de toxicidade. No que diz respeito à atividade da CAS sobre biofilmes, Cocuaud e colaboradores. (2005), observaram que em diferentes concentrações terapêuticas a droga foi capaz de reduzir significativamente a atividade metabólica dos biofilmes formados por *C. albicans* e *C. parapsilosis*, independente do estágio de maturação. Esta potente atividade da CAS sobre biofilmes de *C. albicans* foi observada independente da presença ou ausência de resistência ao fluconazol. Outros relatos na literatura confirmam o potente efeito da CAS na inibição da formação de biofilmes de *C. albicans* (KUHN *et al.*, 2002; KUHN & GHANNOUM, 2004; MUKHERJEE & CHANDRA, 2004).

Estudos recentemente publicados (BACHMANN *et al.*, 2002; MELO *et al.* 2007, KATRAGKOU *et al.*, 2008) confirmaram a eficácia de concentrações terapêuticas de CAS sobre os biofilmes formados por diferentes espécies de *Candida*. Porém, quando estes mesmos biofilmes foram expostos a altas concentrações da droga observou-se um crescimento paradoxal das células sésseis (“Eagle effect”) evidenciado pelo aumento reflexo da atividade metabólica e alterações na morfologia celular dos biofilmes. Interessantemente, este efeito paradoxal havia sido previamente descrito em células planctônicas por STEVEN e colaboradores (2004, 2006). Porém, as bases teóricas para este efeito nos biofilmes, bem como a sua relevância clínica ainda permanecem incertas.

Objetivo geral

Caracterizar os aspectos clínicos e epidemiológicos das infecções da corrente sanguínea causadas por *Candida* spp. em quatro hospitais gerais de Belo Horizonte, Brasil, no período de fevereiro de 2003 a Novembro de 2007, determinar o perfil de susceptibilidade frente a drogas antifúngicas e determinar as características estruturais e morfológicas relacionadas ao processo de desenvolvimento de biofilmes.

Objetivos específicos

- 3.1 Descrever os dados demográficos, as doenças de base, os fatores associados e a mortalidade global relacionada aos episódios de candidemia ocorridos em quatro hospitais gerais de Belo Horizonte, Brasil, entre o período de Fevereiro de 2003 a Novembro de 2007;
- 3.2 Confirmar os fatores de predisponentes relacionados ao desenvolvimento dos quadros de candidemia na população estudada;
- 3.3 Identificar as espécies e os perfis de susceptibilidade dos isolados de *Candida* envolvidos nos episódios de candidemia;
- 3.4 Estudar, através da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), o processo de formação dos biofilmes formados por *Candida* spp.;
- 3.5 Determinar o efeito *in vitro* dos biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus epidermidis* sobre a estrutura celular e processo de colonização e formação dos biofilmes de *Candida* spp. em CVCs;
- 3.6 Avaliar a susceptibilidade *in vitro* dos biofilmes formados por *Candida* spp. frente à Caspofungina (CAS) e Anfotericina B (AMB);
- 3.7 Estudar, através da MEV, os efeitos da CAS sobre a estrutura e morfologia dos biofilmes formados por espécies de *Candida*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente projeto de pesquisa foi dividido em dois subprojetos.

O primeiro subprojeto avaliou as características epidemiológicas e microbiológicas dos casos de candidemia ocorridos em quatro hospitais terciários de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, entre os períodos de Fevereiro de 2003 a Novembro de 2007.

No segundo subprojeto, em colaboração com o Laboratório de Biofilmes do CDC, EUA, experimentos foram realizados buscando responder duas questões centrais:

a) Qual o efeito *in vitro* dos biofilmes bacterianos pré-formados sobre a morfologia e o processo de formação dos biofilmes de *Candida* spp. em cateteres venosos centrais?

b) Qual efeito *in vitro* da CAS e da AMB sobre os biofilmes formados por espécies de *Candida* ?

Fase pré- experimental

Em um primeiro momento, foi realizada uma revisão crítica e objetiva da literatura referente à epidemiologia das candidemias no Brasil e em diferentes centros médicos do mundo. Este trabalho visou definir, de forma clara, os fatores de risco a serem avaliados neste estudo, incluindo critérios de inclusão de pacientes, entendimento dos possíveis fatores microbiológicos e, finalmente, a determinação dos métodos de vigilância a serem utilizados. Em um segundo momento, diferentes estudos envolvendo a formação de biofilmes por espécies de *Candida*, a resistência a drogas antifúngicas e relevância médica dos biofilmes nas infecções relacionadas aos dispositivos médicos invasivos foram revisados e utilizados para delineamento dos experimentos laboratoriais realizados no CDC, EUA. Estas fases mostraram-se fundamentais para consolidar os motivos que justificaram a execução deste trabalho.

4.1 PRIMEIRO SUBPROJETO

Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. e perfil de susceptibilidade à drogas antifúngicas

Desenho do estudo

Trata-se de um estudo de coorte prospectivo, observacional e descritivo.

Inicialmente foram estudados os aspectos epidemiológicos e microbiológicos relacionados aos casos de infecções de corrente sanguínea causadas por leveduras do gênero *Candida* em pacientes admitidos em quatro hospitais terciários de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Paralelamente, o perfil de susceptibilidade frente a cinco drogas antifúngicas foi determinado pelo teste de microdiluição em caldo proposto pelo Clinical and Laboratory Standards Institute- CLSI (NCCLS, 2002).

População do estudo

A população de estudo incluiu todos os casos consecutivos de candidemia diagnosticado nos Hospitais Lifecenter, Vera Cruz, São Francisco de Assis e Baleia no período de Fevereiro de 2003 a Novembro de 2007.

Critérios de inclusão

Para inclusão no estudo, foi requerido o diagnóstico de sepse temporalmente relacionado à data da coleta da hemocultura positiva para *Candida*. Foram incluídos todos os pacientes que apresentaram pelo menos uma hemocultura positiva para *Candida* spp. durante o período de estudo com coleta de sangue realizada por punção de veia periférica. Candidemia foi definida como a primeira hemocultura positiva para *Candida*. Considerou-se como um mesmo episódio todos os isolados positivos em um período de 30 dias após a data da coleta da primeira hemocultura positiva.

Para o diagnóstico de sepse, foi necessário haver resposta inflamatória sistêmica à infecção, clinicamente reconhecida por duas ou mais das seguintes manifestações:

- Temperatura corpórea $> 38^{\circ}\text{C}$ ou $< 36^{\circ}\text{C}$;
- Frequência cardíaca > 90 batimentos por minuto;
- Frequência respiratória > 20 movimentos por minuto ou PaCO_2 (pressão arterial de dióxido de carbono) menor do que 32 mm Hg;

- Leucocitose (contagem de leucócitos > 12.000 células/ mm^3), leucopenia (contagem de leucócitos < 4.000 células/ mm^3) ou presença de formas granulocíticas imaturas ($> 10\%$) no sangue periférico.

Critérios de exclusão

Pacientes com hemoculturas positivas para *Candida* spp. com ausência de sinais e sintomas clínicos de infecção foram excluídos assim como também aqueles cuja única hemocultura positiva para *Candida* spp. foi colhida através de cateter.

Definição das variáveis estudadas

Algumas definições foram adaptadas do projeto Candidemia Brasil (COLOMBO *et al.*, 2006).

Episódio de candidemia: quando pelo menos uma hemocultura apresentou positividade para *Candida* spp. em presença de sinais e sintomas de infecção dentro de um período de 30 dias. Se outra hemocultura positiva para *Candida* spp. ocorresse durante esses 30 dias causada pela mesma espécie ou por uma espécie diferente, esta(s) era (eram) registrada(s) como pertencentes ao mesmo episódio. Se o paciente apresentava outra hemocultura positiva para *Candida* spp. em período maior que 30 dias em relação à hemocultura inicial, este era considerado um novo episódio. Candidemia inicial ou incidente: considerado como tal o primeiro episódio de candidemia.

Condições clínicas de base: a doença que motivou a internação, as intercorrências, e as condições clínicas preexistentes que estavam ativas nos três meses antes da candidemia inicial.

Fatores de risco: a colonização foi considerada fator de risco quando ocorreu nos 14 dias precedentes à candidemia inicial. Ventilação mecânica, nutrição parenteral total e presença de cateter venoso central foram consideradas como fatores de risco se estavam presentes, pelo menos nas 24 horas prévias à candidemia inicial.

A neutropenia e a diálise: foram consideradas quando estavam presentes pelo menos 72 horas antes da candidemia inicial. Em relação às medicações, estas foram consideradas como fatores de risco se estavam sendo utilizadas nos 14 dias precedentes à candidemia inicial.

Drogas imunossupressoras: foram consideradas Metotrexate, Hidroxicloroquina, Ciclofosfamida, Micofenolato, Mofetil, Etanercept e Infliximab.

Neutropenia: foi definida para número de neutrófilos menores que $500/\text{mm}^3$; neutropenia severa quando o número de neutrófilos era menor que $100/\text{mm}^3$, e neutropenia prolongada quando a sua duração era maior que 10 dias.

Febre: definida quando a temperatura axilar era igual ou maior que 37,8 °C

Hipotensão: pressão arterial sistólica menor que 90 mmHg.

Tratamento: se algum tratamento antifúngico foi instituído até 30 dias da candidemia inicial.

Evolução: se o paciente recebeu alta após a recuperação da infecção ou evoluiu para óbito.

Identificação das amostras e avaliação do perfil de Susceptibilidade frente a drogas antifúngicas

O isolamento das amostras foi realizado utilizando-se o meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose (Difco) acrescido de cloranfenicol (Carlo Erba), e o meio CHOMagar® Candida foi utilizado para a triagem dos isolados. Os espécimens clínicos foram semeados em placas de Petri contendo os meios citados e incubadas a 37°C por 48 horas. Todas as leveduras do gênero *Candida* isoladas a partir de hemocultivos realizados em todos os laboratórios de microbiologia das instituições foram enviados ao Laboratório de Micologia do Depto. de Microbiologia do ICB/UFMG para identificação da espécie e realização dos testes de susceptibilidade frente as drogas antifúngicas. A identificação das amostras foi realizada através de provas morfológicas, fisiológicas e bioquímicas de acordo com técnica previamente descrita (VANDER WALT & YARROW, 1984; WARREN & HAZEN, 1999).

A susceptibilidade frente aos antifúngicos foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, conforme documento M27-A do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) anteriormente denominado National Committee for Clinical and Laboratory Standards (NCCLS, 2002). Cento e sessenta e oito amostras de *Candida* identificadas foram testadas frente a cinco drogas antifúngicas: anfotericina B (Sigma; A – 4888; Lote: 11K4004), flucitosina (Sigma; F – 7129; Lote: 110K4012), fluconazol (Pfizer Inc., Nova York, N.Y.), itraconazol (Janssen Pharmaceutica, N.Y.; Lote nº: ZR051211PVA) e voriconazol (Pfizer; V Fend® IV; Lote: 304 – KIT 006).

Além dos isolados utilizados neste estudo, foram incluídas amostras controles de *C. parapsilosis* (ATCC, 22019) e *C. albicans* (ATCC, 14053) das quais eram conhecidas as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para itraconazol, fluconazol, 5-flucitocina e anfotericina B (CLSI, 2002).

As solução-estoques de fluconazol e flucitosina foram obtidas em água destilada. Itraconazol foi dissolvido em DMSO (dimetilsulfóxido) e posteriormente aquecido para completa dissolução; anfotericina B e voriconazol também foram dissolvidas em DMSO. A solução-estoque de flucitosina apresentava concentração de 1000µg/mL enquanto a dos demais

antifúngicos, 250 μ g/mL. As soluções-estoque eram preparadas imediatamente antes do uso e foram mantidas sob refrigeração até o momento da manipulação.

Foi utilizado o meio líquido RPMI-1640 com L-glutamina, 20g/L de glicose (2%), sem bicarbonato de sódio e tamponado com MOPS a pH 7,0 (American Biorganic, Niagara Falls, N.Y.). Durante todo o experimento, um único lote de RPMI-1640 foi utilizado. Em cada novo ensaio, alíquotas de 2 mL do meio líquido foram incubadas nas mesmas condições do teste, para controle de esterilidade.

As amostras foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e incubadas à 35°C por 24-48 horas. A suspensão inicial do inóculo foi preparada em 5 mL de salina a 0,85% esterilizada. Após homogeneização da suspensão no agitador de tubos, a concentração do inóculo foi verificada através da aferição da turbidez, empregando o cartão de Wickerham até atingir 3⁺ (quando ocorre o desaparecimento das linhas), que corresponde à escala 0,5 de McFarland (CLSI, 2002). A suspensão foi diluída a 1:50 em caldo RPMI (0,1 mL da suspensão para 4,9 mL de RPMI) para obtenção de $10^6 \times 1/50 = 2 \times 10^4$ células/mL. Nos poços da placa de microdiluição, a diluição foi de 1:2, sendo que ao final do experimento, a diluição final atingiu $2 \times 10^4 \times 1/2 = 1 \times 10^4$ células/mL.

A partir da solução-estoque de cada droga, foram preparadas soluções com dez vezes a concentração final desejada, a saber: fluconazol, itraconazol, anfotericina B e voriconazol, 0,06 - 128 μ g/mL e flucitosina de 0,250 a 512 μ g/mL.

A microdiluição foi feita em placas plásticas com fundo chato (FALCON; USA), esterilizadas, contendo oito séries identificadas de A a H, cada qual com 12 poços (total - 96 poços). As drogas foram diluídas a 1:5 em RPMI-1640. Alíquotas de 100 μ L de cada concentração foram dispensadas em seqüência nas placas de microtitulação, com auxílio de pipeta multicanal, de forma a permitir que os poços identificados de um a dez contivessem as diferentes concentrações. A solução inicial de inóculo foi preparada conforme procedimento descrito anteriormente. A preparação original de cada microrganismo foi diluída a 1:50 em RPMI-1640. Esta preparação de solução-inóculo (amostras a serem testadas) foi realizada para obtenção do dobro da concentração final desejada, visto que esta foi posteriormente adicionada a igual volume de solução RPMI contendo droga antifúngica. A seguir, volumes de 100 μ L da solução de inóculo RPMI-1640 foram dispensados nos orifícios da placa de microdiluição contendo 100 μ L de duas vezes as concentrações finais dos antifúngicos testados.

Os poços pertencentes à coluna identificada com o número 11 em cada placa de microdiluição foram utilizados como controle positivo, neles sendo dispensados apenas solução-inóculo. O poço número 12 foi o controle negativo, contendo apenas o meio RPMI-1640.

As placas foram mantidas em estufa a 35°C até 48 horas. No momento da leitura, o crescimento de microrganismos no poço-controle positivo (poço de número 11) foi comparado visualmente ao crescimento verificado nos poços referentes a diferentes concentrações testadas (poços de número 1 a 10). Para a leitura do teste, as placas eram colocadas em suporte contendo espelho, permitindo a observação clara do reverso das mesmas. Em ensaios com os azólicos, a menor concentração capaz de induzir inibição proeminente (em torno de 80%) do crescimento verificado do microrganismo testado, em relação ao poço-controle, foi identificada como a concentração inibitória mínima (CIM) da droga para este microrganismo (CLSI, 2002). Para anfotericina B e flucitosina a CIM foi considerada a menor concentração capaz de inibir qualquer crescimento visivelmente detectável. As leituras foram realizadas em 24 e 48 horas.

Análise estatística

Os dados foram analisados inicialmente através de técnicas de estatística descritiva com síntese numérica, tabular e gráfica das informações coletadas. Na comparação das variáveis dicotômicas, foram usados os testes de chi-quadrado ou exato de Fisher. Para as variáveis contínuas, foi empregado o teste de *t-student* ou teste não paramétrico de Wilcoxon, no caso de falha em relação às suposições inerentes ao teste t de *student*. Em todos os testes de hipóteses, o nível de significância considerado foi de 5% ($\alpha = 0,05$). Os dados foram analisados pelo programa EpiInfo 6.04 e Excel for Windows.

4.2 SEGUNDO SUBPROJETO

Estudo dos biofilmes formados por espécies de *Candida*

Desenho do estudo

Numa segunda fase, estudos sobre a formação de biofilmes foram realizados em colaboração com o Laboratório de Biofilmes do CDC, EUA.

Seis isolados de *Candida* spp. previamente obtidos na primeira fase deste projeto, dois (2) isolados de *C. albicans*, dois (2) de *C. tropicalis* e dois (2) de *C. parapsilosis*, foram subcultivados em ágar sabouraud dextrosado (SDA) a fim de se garantir as condições ótimas de crescimento. Os isolados foram posteriormente transferidos para uma suspensão salina adicionada de 25% (p/v) de glicerol e armazenados em um banco de microrganismos sob temperatura de -70° C.

Isolados já estudados e bem caracterizados de *S. epidermidis* ou *Pseudomonas aeruginosa* foram obtidos junto ao banco de microrganismos do CDC, sendo estes utilizados nos experimentos que objetivaram a avaliação do efeito de biofilmes bacterianos pré-formados sobre a colonização de espécies de *Candida* spp. em CVCs (1° subprojeto). A identificação das bactérias foi confirmada pelo sistema Vitek GPI card e GNC card (biomerieux, Durham, NC). Com o objetivo de selecionar entre 18 isolados de *S. epidermidis*, aqueles possuidores de uma alta e baixa capacidade de formação de biofilmes, o teste com cristal violeta descrito por O'Toole & Kolter (1998) foi utilizado neste estudo. A fim de se obter as culturas bacterianas e fúngicas na fase exponencial de crescimento, os microrganismos foram colocados sob crescimento aeróbico, em ágar Caldo Trypticase Soja (TSB) à temperatura de 35°C, por um período de 18- 24 horas sob agitação. Ao final deste período, a densidade óptica foi monitorada em 600 nm (Spectronic 21D spectrophotometer Spectronic Instruments Inc. Rochester, NY) sendo as suspensões prontamente utilizadas nos experimentos de co-colonização e formação de biofilmes.

Sistema Drip Flow Reactor modificado

O sistema Drip Flow Reactor modificado (mDFR; Biosurface Technologies Corp., Bozeman, MT) foi utilizado no estudo de cocolonização em CVCs (Fig. 4). Este sistema, composto de quatro câmaras separadas e isoladas entre si, foi modificado para permitir a conexão de segmentos de CVCs aos pontos de entrada e saída do meio líquido no dispositivo. Como substrato para a formação de biofilmes foram utilizados neste estudo os CVCs feitos de poliuretano (Arrow International Inc., Reading, PA). Antes de cada experimento, o sistema

mDFR, contendo os cateteres, foi esterilizado utilizando-se gás de óxido de etileno. Antes da etapa de crescimento dos biofilmes microbianos os cateteres foram expostos ao soro humano, por duas horas, na tentativa de se reproduzir *in vitro* as condições fisiológicas evidenciadas *in vivo*. Todo o sistema mDFR foi removido para uma incubadora com temperatura controlada em 35°C.

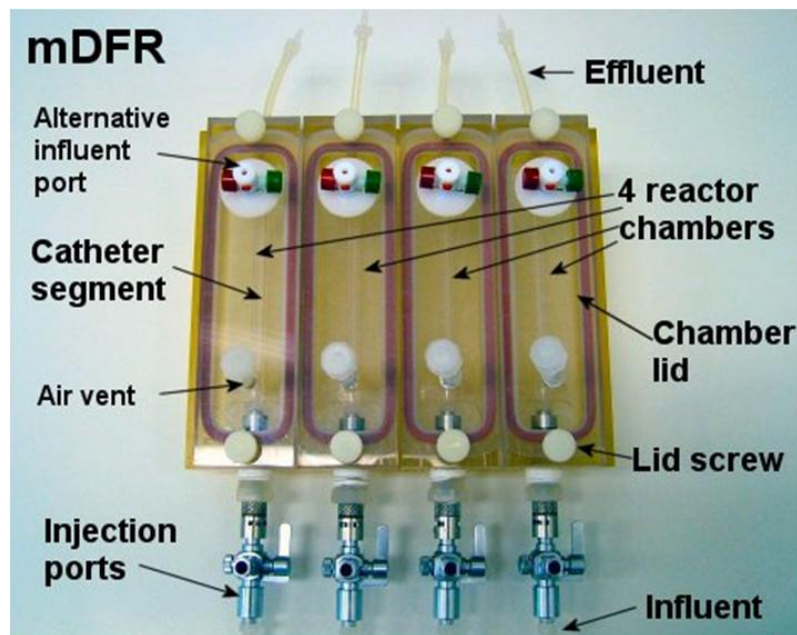


Figura 4. Sistema Drip flow reactor modificado mostrando as câmaras contendo os segmentos dos cateteres.

Inicialmente, o sistema foi acoplado a um frasco com meio de cultura líquido contendo culturas (18-24h sob agitação) das bactérias selecionadas para este estudo. Este meio foi bombeado através dos CVCs por 2 horas a uma velocidade de fluxo de 1.0 ml/ min, seguido de 22 horas de bombeamento de um meio estéril contendo 10% de TSB (velocidade de fluxo: 0.5 ml/min). Após o processo de colonização e formação dos biofilmes bacterianos, o sistema foi acoplado a um novo frasco contendo a cultura de *Candida* spp., crescidas por 18-24h sob agitação em meio TSB. Este meio de cultura foi então bombeado através dos CVCs por um total de 24 horas (fase inicial de formação do biofilme fúngico) a uma velocidade de 1.0 ml/ min. Adicionalmente, após o término deste período, um novo frasco com meio estéril contendo 10% de TSB foi acoplado ao sistema e o meio bombeado a uma velocidade de fluxo de 0.5 ml/min.

Durante o período de estudo (total de 96 horas), segmentos de cateteres foram removidos assepticamente do sistema em tempos previamente selecionados para este estudo. Os tempos pré-definidos para este estudo foram 24h (cateter contendo somente biofilme bacteriano), 48, 72 e

96h (cateter contendo biofilme bacteriano e fúngico). Os segmentos dos cateteres foram seccionados em três pequenos fragmentos de dois centímetros cada e em seguida novamente seccionados verticalmente em duas metades adicionais. Cada uma destas metades cortadas verticalmente foi imersa cuidadosamente em cinco (5) mL de salina tamponada (PBS) (7,2 pH) afim de se remover as células planctônica não aderidas à superfície. As porções dos CVCs foram então agitadas e processadas através de ciclos consecutivos de sonicação (Branson 2510; Branson, Danbury, CT) e vortex. Finalmente, a suspensão contendo as células sésseis recuperadas a partir dos biofilmes nos CVCs passaram por diluição seriada (razão de 1/10) e contagem de células viáveis em meios de cultura seletivos. Experimentos controles, avaliando somente a formação dos biofilmes no sistema mDFR pelos isolados bacterianos ou os isolados de *Candida*, foram também realizados. Um segmento adicional, relativo a cada tempo de coleta, foi obtido e preparado para análise de MEV.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

A MEV foi empregada para avaliação dos efeitos morfológicos e estruturais dos biofilmes bacterianos sobre o processo de formação de biofilmes de *Candida* spp. As amostras coletadas de cada cateter foram enxaguadas em PBS e fixadas em solução de glutaraldeído 5% em tampão cacodilato (0.67M, pH 6.2) durante a noite à temperatura ambiente.

Após o processo de fixação, as amostras foram submetidas à desidratação através da imersão em diferentes concentrações de etanol. Em seguida, foram imersas em hexametildisilazana (Polysciences Inc., Warrington, PA), durante a noite, à temperatura ambiente. No dia seguinte as amostras foram cuidadosamente montadas em stubs metálicos e recobertas com ouro, utilizando-se o aparelho metalizador (Polaron SC7640 sputter coater; Thermo VG Scientific, United Kingdom) a fim de serem avaliadas no microcópio eletrônico de varredura FEI XL30 ESEM (FEI Co., Hillsboro, Oreg.). Diversos campos foram examinados a fim de se obter imagens representativas das amostras.

Efeito do sobrenadante obtidos de biofilmes bacterianos sobre biofilmes de *Candida* spp.

Experimentos adicionais foram realizados com o objetivo de avaliar o possível efeito inibitório de substâncias produzidas por células sésseis bacterianas sobre a formação de biofilmes formados por *Candida* spp. Os biofilmes bacterianos foram crescidos em frascos de cultura de células (Corning Incorporated, Corning, NY) por um tempo total de 24 e 48 h a 35°C sob agitação. Todo o conteúdo dos frascos (meio de cultura TSB) foi coletado e centrifugado a 8000 rpm por 15 minutos para obtenção do sobrenadante. Este sobrenadante foi adicionado em

conjunto a um meio de cultura contendo as diferentes espécies de *Candida* em placas de 96 poços. Esta etapa visou avaliar a formação de biofilmes fúngicos na presença do sobrenadante de biofilmes bacterianos. As placas de microtitulação foram incubadas por 24 h a 35° C sob agitação. Em seguida, a formação dos biofilmes foi mensurada pelo método de redução do sal XTT-tetrazolium e a leitura da atividade metabólica foi lida em um leitor automático de placa com um comprimento de onda de 490 nm (Biotek Synergy 2, Biotek Instruments Inc, Winooski, VT).

Coagregação

A fim de investigar a capacidade de coagregação e autoaglutinação entre os isolados bacterianos e fúngicos, experimentos foram realizados utilizando-se uma metodologia previamente publicada por HSU *et al.* (1990). Alíquotas de 0.3 ml de diferentes suspensões preparadas em PBS a partir dos isolados de *Candida* spp. e das bactérias, foram misturadas e incubadas por 12h a temperatura ambiente sob agitação. Após este período, uma gota de cada suspensão resultante entre as diferentes combinações foi transferida para uma lâmina de vidro e imediatamente observada em microscópio invertido (Fischer Scientific) com aumento de 200x. Buscou-se identificar a presença de coagregados entre os microrganismos. Como controle, utilizou-se os mesmos microrganismos, porém, preparados em suspensões individuais. Este procedimento objetivou detectar a capacidade de autoaglutinação dos isolados.

Teste de susceptibilidade à caspofungina

Foi avaliado o perfil de susceptibilidade *in vitro* dos biofilmes formados por espécies de *Candida* aos antifúngicos CAS e AMB (2º subprojeto).

O padrão de CAS foi obtido diretamente com o fabricante (Merck Sharp and Dohme) e o padrão de anfotericina B, junto à Sigma-Aldrich. As soluções estoques de CAS foram preparadas em água e conservadas sob refrigeração até o momento do uso. As soluções de AMB foram dissolvidas em Dimetilsulfóxido (DMSO) e mantidas sob refrigeração até o momento do uso. As diluições foram feitas em meio de Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640 (com L-glutamina e sem bicarbonato) (Gibco) e tamponado com ácido 3-(N-morfolino propano sulfônico (MOPS) (Sigma). Os inóculos de leveduras foram preparados a partir de cultivos de 24-48h em SDA, suspendendo-se as células fúngicas em água destilada estéril, cujas turvações eram ajustadas e padronizadas espectrofotometricamente conforme preconiza o documento M27-A2 do CLSI. Finalmente, as suspensões foram diluídas no mesmo meio onde foram testadas (RPMI 1640).

Oos biofilmes foram formados em discos de silicone, previamente esterilizados, por um período de 24h a 35°C sob agitação. Após este período, os biofilmes foram expostos às concentrações diferentes das drogas em estudo por um período total de 48h. O efeito inibitório das drogas sobre os biofilmes foi mensurado pelo método de redução do sal XTT-tetrazolium utilizando-se um espectrofotômetro Hach com um comprimento de onda de 490 nm (Hach Company; Loveland, CO, USA).

Finalmente, discos de silicones representativos dos biofilmes expostos a diferentes concentrações de CAS foram processados e avaliados quanto ao número de células viáveis e para análise de MEV.

Análise estatística

Todos os resultados obtidos nos experimentos descritos foram analisados utilizando o teste t-pareado de Student e o programa Excel 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, WA). Valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos.

5.1 EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES HEMATOGENICAS POR *CANDIDA* SPP. E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ÀS DROGAS ANTIFÚNGICAS

No primeiro subprojeto, um total de 168 episódios de candidemia foram identificados no período de Fevereiro de 2003 a Novembro de 2007. *Candida* foi o sexto agente mais isolado nas hemoculturas realizadas nos hospitais estudados nesse período. Os principais agentes isoaldos em 4,824 hemoculturas positivas estão apresentados na tabela 1.

Com relação ao gênero, dos 168 pacientes com diagnóstico de candidemia, 88 (52,4%) eram homens e 80 (47,6%) eram mulheres. A idade dos pacientes variou de zero a 91 anos, com uma média de 36,5 anos. Dos 168 pacientes avaliados nesse estudo 94 (56%) pacientes eram adultos e 74 (44%) eram crianças. A maior frequência de isolamento das amostras analisadas do gênero *Candida* ocorreu no Hospital da baleia (45,2%), seguido do Hospital Vera Cruz (31%) e Hospital LifeCenter (16,7%). O Hospital São Francisco de Assis participou com 7,1%, apresentando a menor taxa percentual de isolamento do fungo em hemoculturas. Quanto ao local de internação dos 168 casos de candidemia, 52 (30,9%) estavam internados em enfermarias, sendo desses 24 (19%) em enfermarias médicas de adultos e 15 (11,9%) em unidades de pediatria. Um total de 116 (69%) dos casos estavam internados na unidade de terapia intensiva nomemonto do diagnóstico da candidemia. Nesta população, 57 (34,1%) estavam na UTI geral (médica e cirúrgica), 39 (23%) na UTI pediátrica e 20 (11,9%) na UTI neonatal (tabela 3).

Distribuição dos episódios de candidemias segundo as espécies de *Candida*

Com relação às espécies de *Candida* isoladas durante o estudo (Tabela 2), houve um predomínio das espécies de *Candida* não- *albicans*, sendo que *C. parapsilosis* foi o agente etiológico encontrado em 36 casos de candidemia (21,4%), *C. tropicalis* em 28 casos (16,7%),

16 isolados de *C. glabrata* (9,5%), 8 isolados de *C. guillermoundii* (4,8%) e 4 isolados de *C. krusei* (2,4%). *Candida albicans* foi responsável por 76 dos 168 episódios de candidemia estudados (45,2%).

Tabela 1. Principais microrganismos isolados a partir de 4824 episódios de infecções de corrente sanguínea em quatro hospitais de Belo Horizonte, MG, Brasil

Microrganismos	No. de isolados (%)
<i>Staphylococcus</i> Coagulase- negativo	1216 (25,2)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.071 (22,2)
Outros	145 (3,0)
<i>Staphylococcus aureus</i>	712 (14,7)
Bacilos Gram- negativos fermentadores	1381 (28,6)
<i>Escherichia coli</i>	544 (11,2)
<i>Klebsiella pneumonia</i>	520 (10,7)
<i>Enterobacter</i> spp.	148 (3,1)
<i>Proteus</i> spp.	55 (1,1)
<i>Serratia</i> spp.	43 (0,9)
<i>Citrobacter</i> spp.	22 (0,5)
Outros	49 (1,0)
Bacilos Gram- negativos não fermentadores	883 (18,3)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	576 (12,0)
<i>Acinetobacter</i> spp.	163 (3,3)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	61 (1,3)
<i>Alcaligenes</i> spp.	24 (0,5)
<i>Burkholderia cepacia</i>	11 (0,2)
Outros	48 (1,0)
Fungos	201 (4,2)
<i>Candida</i> spp.	168 (3,5)
<i>Rhodotorula</i> spp.	13 (0,3)
<i>Hansenula</i> spp.	11 (0,2)
<i>Fusarium</i> spp.	9 (0,1)
<i>Enterococcus</i>	151 (3,1)
<i>Streptococcus</i>	170 (3,5)
<i>Streptococcus pneumonia</i>	110 (2,3)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	23 (0,5)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	7 (0,1)
Outros	30 (0,6)
Anaeróbios	110 (2,2)

Tabela 2. Distribuição das espécies de *Candida* causadoras de 168 episódios de candidemia em quatro hospitais de Belo Horizonte, MG, Brasil

Espécies	No de isolados (%)
<i>Candida albicans</i>	76 (45,2)
<i>Candida parapsilosis</i>	36 (21,4)
<i>Candida tropicalis</i>	28 (16,7)
<i>Candida glabrata</i>	16 (9,5)
<i>Candida guilliermondii</i>	8 (4,8)
<i>Candida krusei</i>	4 (2,4)

Fatores predisponentes e doenças de base relacionadas aos casos de candidemia

Os fatores de predisponentes observados em nosso estudo estão descritos na Tabela 4.

Nos 168 pacientes com diagnóstico de candidemia avaliados nesse estudo, o uso de antibióticos esteve presente em 164 (98%) pacientes; presença de cateter venoso central, em 152 (90,4%); bloqueador H2, em 92 (55%); nutrição parenteral total, em 68 (40%); e internamento em unidade de terapia intensiva, em 116 (69%). Outros fatores predisponentes identificados no estudo foram: utilização de corticosteróides, em 96 (57%) pacientes; cirurgia do aparelho digestivo, em 44 (26%); colonização prévia por *Candida* spp., em 72 (43%); ventilação mecânica, em 100 (60%); quimioterapia, em 34 (20,2%); transfusão sanguínea, em 71 (43,4%); uso prévio de antifúngico, em 36 (21,4%); neutropenia, em 51 (30%); diálise, em 16 (9%) e imunossupressor em 96 (57%) pacientes. É importante destacar que a maioria dos pacientes apresentou associação de vários fatores de risco, com uma média de 5,6 fatores de risco por paciente, com um mínimo de 3 e um máximo de 10 fatores de risco. Dos 168 pacientes, 24% tiveram 6 fatores de risco; 22%, 4 fatores; 18%, 7 fatores; 16%, tiveram 5 fatores; 9%, 8 fatores; 5%, 3 fatores; 3%, 2 fatores; 2%, 9 fatores; e 1%, 10 fatores de risco.

Com relação às patologias de base, as doenças pulmonares foram as mais frequentes, respondendo por 104 (61,9%) casos. A segunda doença mais frequente foram as doenças do sistema cardiovascular, com 72 (42,9%) As doenças neurológicas reponderam por 60 (12%) casos. Seguidas de Diabetes mellitus, 40 (24%); Neoplasias, 32 (19%); doenças hematológicas, 28 (16,6%); falência renal aguda, 4 (4%); prematuridade, 20 (12%); doença hepática, 8 (4,8%); e doença reumatológica (2,3%) (tabela 3).

Analisando a distribuição de fatores de risco entre a *Candida albicans* e as espécies não-*albicans*, no que se refere às principais patologias de base, constatamos que entre os 168 episódios incluídos nesse estudo, as doenças hematológicas, neutropenia, nutrição parenteral e

transfusão sanguínea foram significativamente mais prevalentes nas candidemias causadas por espécies não- *albicans* (valor $p=0,002$, $p= 0,026$, $p= 0,048$ e $p=0,002$, respectivamente). Por outro lado, APACHE II score ≥ 20 , doença cardíaca e colonização prévia foram fatores associados com o desenvolvimento das infecções por *C. albicans* (valor $p= 0,049$, $p=< 0,001$ e $p= 0,030$, respectivamente) (Tabela 4).

Tabela 3. Características demográficas, doenças de base e presença de fatores de risco em pacientes com diagnóstico de candidemia em quatro hospitais de Belo Horizonte, MG, Brasil

Variável	No. (%)
Característica demográfica	
Homem/ mulher	88 (52,4)/ 80 (47,6)
Idade ^a	36,5 anos
Localização/UTI adulto ^b	57 (34,1)
Localização / UTI pediátrica	39 (23,0)
Localização / UTI neonatologia	20 (11,9)
Localização/ Enfermaria	52 (30,9)
Tempo médio de internação até a data da candidemia (variação)	19 (0- 115)
APACHE II score ≥ 20 ^c	42 (25)
Doenças de base^d	
Neoplasias (tumor sólido)	32 (19)
Doenças hematológicas	28 (16,6)
Quimioterapia	34 (20,2)
Diabetes mellitus	40 (24)
Doença pulmonar	104 (61,9)
Doença cardíaca	72 (42,9)
Falência renal aguda	28 (16,7)
Prematuridade	20 (12)
Doença neurológica	60 (35,7)
Doença hepática	8 (4,8)
Doença reumatóide, doença auto-imune	4 (2,3)
Pacientes expostos à fatores de risco^e	
Cirurgia abdominal ^f	44 (26)
Uso prévio de antibiotic de largo espectro	164 (98)
Uso prévio de fluconazol	8 (4,8)
Cateter venoso central	152 (90,4)
Neutropenia	51 (30)
Nutrição parenteral	68 (40)
Transfusão de sangue	73 (43,4)
Diálise	16 (9)
Ventilação mecânica	100 (60)
Uso de corticóides	96 (57)
Bloqueadores H ₂	92 (55)
Colonização prévia por <i>Candida</i>	72 (43)

^a Variação: <1 - 91 years

^b Abreviação: UTI= Unidade de terapia intensiva

^c Variação: 2- 29

^d Paciente pode apresentar mais de uma doença de base

^e Paciente pode apresentar mais de uma condição clínica

^f Cirurgia com até três meses do diagnóstico micológico.

Tabela 4. Associação entre *Candida* spp. e fatores predisponentes para candidemia em pacientes de quatro hospitais de Belo Horizonte, MG, Brasil

Variável	No. de episódios			Valor <i>P</i>
	Total	<i>C. albicans</i> (n=76)	Espécies não- <i>albicans</i> (n=92)	
Neoplasia	32	15	17	0,992
Doenças hematológicas	28	5	23	0,002
Quimioterapia	36	12	24	0,154
APACHE II score \geq 20	42	25	17	0,049
Diabetes mellitus	40	20	20	0,609
Doença pulmonar	104	51	53	0,272
Doença cardíaca	72	48	24	<0,001
Falência renal aguda	28	8	20	0,084
Doenças neurológicas	60	32	28	0,160
Cirurgia abdominal	44	24	20	0,206
Uso prévio de antibiotico de largo espectro	164	72	92	0,159
Uso prévio de antifúngico	36	15	21	0,766
Cateter venoso central	152	65	87	0,086
Neutropenia	51	16	35	0,026
Nutrição parenteral	68	24	44	0,048
Ventilação mecânica	100	41	59	0,239
Transfusão sanguínea	73	23	50	0,002
Uso de corticóides	96	44	52	0,982
H ₂ blocker	92	41	51	0,970
Colonização prévia por <i>Candida</i>	72	40	32	0,030

Evolução

O prazo médio entre a internação e a candidemia inicial foi de 33 dias. Dos 168 pacientes, 84 (50%) evoluíram para o óbito e 84 (50%) sobreviventes. Entre os 84 óbitos, foram fatores relacionados com um mal prognóstico, em análise univariada, a presença de doença hematológica ($p=0,006$), APACHE II score > 20 ($p=0,050$), uso de cateter venoso central ($p=<0,001$), neutropenia ($p= 0,022$) e falência renal aguda ($p=<0,001$) (tabela 5). Dentre as espécies do gênero *Candida* causadoras de infecções da corrente sanguínea, *C. albicans* foi a única espécie estatisticamente associada com um risco aumentado de evolução ao óbito ($p=0,019$) (Tabela 6).

Tabela 5. Análise univariada dos fatores prognósticos associados com a mortalidade entre os pacientes com candidemia em quatro hospitais de Belo Horizonte, MG, Brasil.

Variável	Pacientes que sobreviveram	Paciente que evoluíram para o óbito	Valor P
APACHE II score >20	15	27	0,050
Neoplasia	13	19	0,327
Doenças hematológicas	7	21	0,006
Cirurgia abdominal	20	24	0,598
Cateter venoso central	69	83	<0,001
Ventilação mecânica	48	52	0,637
Neutropenia	8	20	0,022
Nutrição parenteral	32	36	0,637
Quimioterapia	17	19	0,850
Diabetes mellitus	19	21	0,856
Falência renal aguda	0	28	<0,001
Doença cardíaca	33	39	0,436
Díalise	4	12	0,066
Uso prévio de antibiotico de largo espectro	84	80	0,231
Colonização prévia/ <i>Candida</i>	32	40	0,276

Tabela 6. Análise da mortalidade global e as diferentes espécies de *Candida* entre pacientes com candidemia em quatro hospitais de Belo Horizonte, MG, Brasil

Espécie de <i>Candida</i>	No. de isolados		Valor P ^a
	Pacientes que sobreviveram	Pacientes que morreram	
<i>C. albicans</i>	30	46	0.019
<i>C. parapsilosis</i>	19	17	0.850
<i>C.tropicalis</i>	12	16	0.535
<i>C. glabrata</i>	13	3	0.017
<i>C. guilliermondii</i>	7	1	0.071
<i>C. krusei</i>	3	1	0.613

^a Comparação entre as taxas de mortalidade relacionadas à *C. albicans* e cada uma das espécies de *Candida*.

Avaliação do perfil de suscetibilidade a agentes antifúngicos das amostras isoladas

Entre os 168 isolados de *Candida* spp. obtidos dos hemocultivos, todos foram testados quanto à suscetibilidade frente ao fluconazol, itraconazol, voriconazol, anfotericina B e flucitosina. Os resultados de CIM₅₀ e CIM₉₀ estão descritos tabela 7. Os critérios de interpretação para a suscetibilidade as drogas antifúngicas foram aqueles publicados pelo CLSI (CLSI, 2002).

No presente estudo somente 8,9% dos isolados apresentaram resistência ao fluconazol (dois isolados de *C. albicans*, quatro isolados de *C. krusei* e nove isolados de *C. glabrata*). A

variação dos valores de CIM para *C. glabrata* foi de 0,25 a 64 µg/ml, porém, somente três isolados (18,7%) apresentaram um valor de CIM > 4 µg/ml. Cinco isolados de *C. glabrata* resistentes ao fluconazol também apresentaram um valor elevado de CIM para o itraconazol. O itraconazol mostrou bom desempenho contra as amostras de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* (CIM₉₀ de 0,5, 0,25, 0,25 e 0,125 µg/ml, respectivamente). O voriconazol mostrou-se altamente eficaz contra os isolados testados, apresentando um valor máximo da CIM₉₀ de 1,0 µg/ml. Resistência à anfotericina B foi observada em 3,5% dos isolados (três isolados de *C. albicans*, dois de *C. parapsilosis* e um de *C. krusei*).

Finalmente, em relação à flucitosina, uma potente atividade *in vitro* dessa droga foi observada em relação aos isolados de *Candida* estudados. Para essa droga, somente cinco isolados foram considerados resistentes (três isolados de *C. tropicalis*, um de *C. parapsilosis* e um de *C. albicans*).

Tabela 7. Padrões de suscetibilidade de 168 isolados de *Candida* frente a cinco drogas antifúngicas.

<i>Candida</i> spp./Drogas	MIC(μ g/ml)			
	Variação	CIM ₅₀	CIM ₉₀	% resistentes
<i>C. albicans</i> (n = 76)				
Anfotericina B	0,125 – 1,0	0,5	1,0	3,9
Fluconazol	0,125 – 16,0	0,5	4,0	2,2
Itraconazol	0,03 – 0,5	0,06	0,5	1,3
Voriconazol	0,06- 0,5	0,06	0,5	0
Flucitosina	0,125 – 2,0	0,125	0,5	1
<i>C. parapsilosis</i> (n = 36)				
Anfotericina B	0,125 – 1,0	0,5	1,0	5,5
Fluconazol	0,25 – 2,0	0,5	2,0	0
Itraconazol	0,06 – 0,25	0,06	0,25	2,7
Voriconazol	0,06 – 2,0	0,06	0,25	0
Flucitosina	0,125– 64	0,12	32	2,7
<i>C. tropicalis</i> (n = 28)				
Anfotericina B	0,25 – 1,0	0,5	1,0	0
Fluconazol	0,125 – 8,0	0,5	1,0	0
Itraconazol	0, 25 – 2,0	0,06	0,25	3,5
Voriconazol	0,06 – 1,0	0,06	0,125	0
Flucitosina	0,125 – 16	0,125	8	10,7
<i>C. glabrata</i> (n = 16)				
Anfotericina B	0,125 – 1,0	0,25	1,0	0
Fluconazol	0,25 – 8,0	4	8	56,2
Itraconazol	0,03 – 0,25	0,06	0,125	31,2
Voriconazol	0,125 – 1,0	0,125	1,0	0
Flucitosina	0,125 – 0,25	0,125	0,25	0
<i>C. guilliermondii</i> (n = 8)				
Anfotericina B	0,5 – 1,0	1,0	1,0	0
Fluconazol	2,0 – 8,0	2,0	2,0	0
Itraconazol	0, 25 – 1,0	0,25	1,0	0
Voriconazol	0,125 – 1,0	0,06	0,125	0
Flucitosina	0,125 – 0,25	0,25	0,25	0
<i>C. krusei</i> (n = 4)				
Anfotericina B	0,06- 0,125	0,5	1,0	0
Fluconazol	64	64	64	100
Itraconazol	8,0 – 16,0	1,0	8,0	50
Voriconazol	0,5 – 1,0	0,5	1,0	0
Flucitosina	0,125 – 0,25	0,125	0,5	0

5.2 FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR *CANDIDA* spp.

Seleção do isolados de *S. epidermidis* pelo método de Cristal Violeta

Com o objetivo de avaliar a capacidade de diferentes isolados de *S. epidermidis* de aderir e formar biofilmes, o teste do Cristal Violeta em placa de microtitulação foi utilizado (Fig. 5). Nossos resultados, indicaram que o isolado *S. epidermidis* 1 (SE1) foi a bactéria que apresentou o melhor perfil de adesão e formação de biofilme nas placas de microtitulação, sendo considerado como um bom formador de biofilmes. O isolado *S. epidermidis* 5 (SE5) foi considerado a bactéria que apresentou o pior perfil de adesão e formação de biofilme através desta metodologia. Após análise dos resultados, esses dois isolados foram selecionados para uso nos experimentos de co-colonização em CVCs.

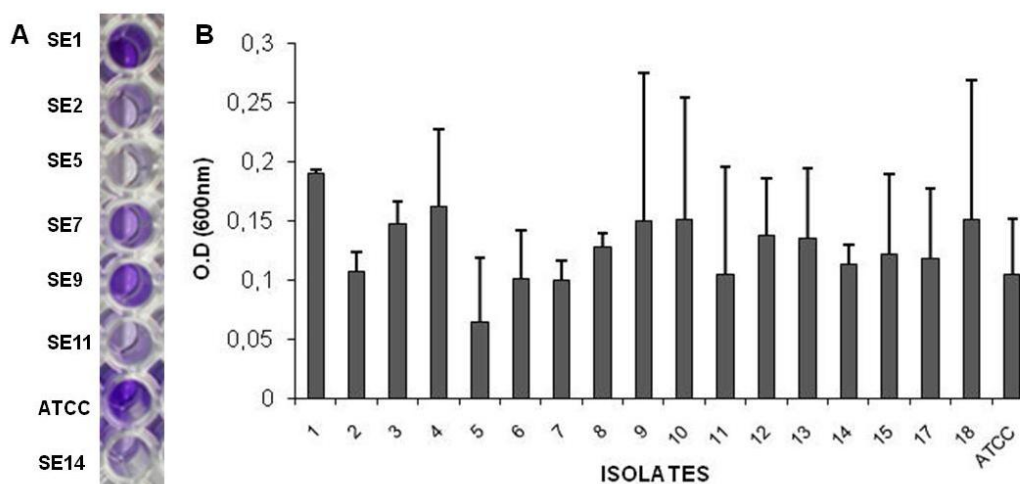


Figura 5. Formação de biofilmes de *S. epidermidis* em placa de microtitulação. Biofilmes foram formados por 10h em TSB. As placas foram fotografadas após enxágue com H₂O e adição do Cristal Violeta (A). Os biofilmes formados em cada poço foram quantificados através de um leitor automático de placa em 600 nm (B). As barras representam o desvio padrão (n=3).

Análise quantitativa dos biofilmes formados em cateteres venosos centrais no sistema mDFR

Experimentos iniciais foram realizados com o objetivo de estabelecer as melhores condições *in vitro* para o desenvolvimento dos biofilmes formados pelos diferentes microrganismos na superfície dos CVCs. As Figuras 6-11 apresentam os resultados obtidos nos experimentos que avaliaram o efeito dos biofilmes pré-formados por bactérias sobre o processo de adesão e formação de biofilmes por espécies de *Candida*. O desenvolvimento dos biofilmes

foi monitorado através da contagem de células viáveis em cm^2 de superfície de CVC (Log CFU/ cm^2).

Os resultados desse estudo demonstraram que biofilmes os formados por *C. albicans* e *C. tropicalis* apresentaram um crescimento máximo na superfície dos CVCs após 72h do início do processo de adesão ($5,93 \pm 0,057$ Log CFU/ cm^2 e $5,75 \pm 0,420$ Log CFU/ cm^2 , respectivamente). Os biofilmes formados por *C. parapsilosis* atingiram o valor máximo de células viáveis recuperadas a partir do lúmen dos CVCs após 48h de crescimento ($5,13 \pm 0,351$ Log CFU/ cm^2). Os resultados obtidos para a contagem das células viáveis foram considerados reprodutíveis e comparáveis entre os diferentes isolados de *Candida* avaliados neste estudo. Os isolados de *S. epidermidis* SE1 (isolado com alta capacidade de formação de biofilme) e *P. aeruginosa* foram às bactérias que formaram um biofilme mais extenso na superfície dos CVCs.

Nas análises do biofilmes polimicrobianos formados entre *C. albicans* e os isolados de *S. epidermidis* (Fig. 7. A), após 48 e 72 h de crescimento na superfície dos CVCs observou-se que o biofilme formado pela levedura foi significativamente inibido pela presença dos biofilmes bacterianos ($p < 0.05$). O mesmo padrão de inibição foi observado quando esta mesma espécie de *Candida* foi adicionada ao biofilme pré- formado de *P. aeruginosa* (Fig. 10. A). Nesta situação, observou-se uma diminuição significativa do número de células viáveis recuperadas a partir do biofilme fúngico nos tempos de 48 e 72 h ($p = 0.030$ e $p < 0.001$, respectivamente).

Em relação aos biofilmes formados por *C. tropicalis* e *S. epidermidis*, o processo de adesão desta levedura só foi significantemente reduzido após 48 e 72 h de formação do biofilme na presença do biofilme pré-formado pelo isolados de *S. epidermidis* SE5 (bactéria com menor capacidade de formar biofilmes) (Fig. 8.A). O mesmo efeito inibitório sobre o biofilme formado por essa espécie de *Candida* não foi observado na presença de células sésseis de *S. epidermidis* SE1. Adicionalmente, quando *C. tropicalis* foi adicionada aos CVCs contendo biofilmes pré-formados de *P. aeruginosa*, uma inibição significativa do crescimento dos biofilmes fúngicos foi observada nos tempos 24, 48 e 72 h ($p = 0.003$, $p < 0.001$, $p = 0.003$, respectivamente), quando comparados com o controle (Fig. 11. A).

Em relação aos biofilmes polimicrobianos formados entre bactérias e *C. parapsilosis*, os resultados indicaram que esta levedura não apresentou alterações significantes do ponto de vista da capacidade de formar biofilmes nos CVCs.

Quando analisamos o efeito dos biofilmes formados pelas diferentes espécies de *Candida* sobre o processo de desenvolvimento dos biofilmes bacterianos, percebemos que houve uma variação significativa no processo de formação dos biofilmes de *S. epidermidis* SE1 na presença de *C. albicans*, tempo de 24h (aumento do número de células viáveis) e em 72 e 96h (redução do

número de células viáveis). A presença dos biofilmes formados por *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* não influenciaram significativamente o processo de formação dos biofilmes por ambos os isolados de *S. epidermidis* (SE1 e SE5).

Para *P. aeruginosa*, nossos resultados indicaram que a formação de biofilmes por esta bactéria apresentou uma tendência maior de sofrer a influência pela presença dos biofilmes fúngicos (Figuras 9. B, 10. B e 11. B). A contagem de células viáveis dos biofilmes formados por *P. aeruginosa* nos CVCs foram significativamente reduzida na presença de biofilmes de *C. parapsilosis* (tempo de 72 horas, $p= 0.050$), *C. albicans* (tempo de 96 horas, $p= 0.022$) e *C. tropicalis* (tempo de 72 horas, $p= 0.050$).

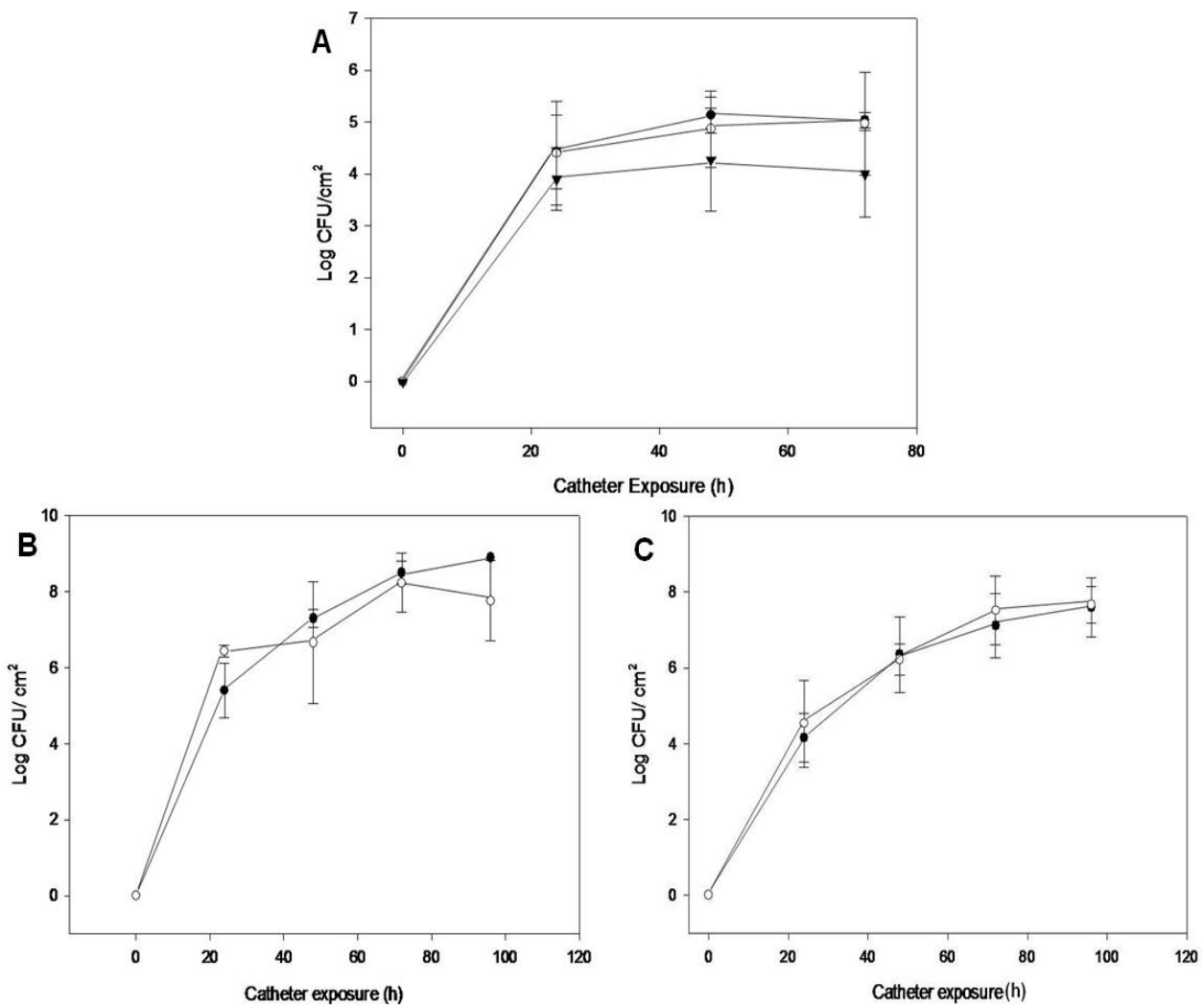


Figura 6. Formação de biofilmes por *Candida parapsilosis* ou *Staphylococcus epidermidis* na presença de biofilmes pré-formados na superfície de CVC. (A) Efeito do biofilme pré-formado de *S. epidermidis* sobre o biofilme de *C. parapsilosis* (Log CFU/cm²). ●, Biofilme de *C. parapsilosis* sem a colonização prévia de *S. epidermidis*; ○, Biofilme de *C. parapsilosis* com 24h de colonização prévia por *S. epidermidis* (SE1); ▼, Biofilme de *C. parapsilosis* após 24h de colonização prévia de *S. epidermidis* (SE5). (B) Efeito da colonização de *C. parapsilosis* sobre a formação de biofilme de *S. epidermidis* (SE1) (Log CFU/cm²). ●, *S. epidermidis* (SE1) sem a colonização de *C. parapsilosis*; ○, *S. epidermidis* (SE1) com a colonização de *C. parapsilosis*. (C) Efeito da colonização de *C. parapsilosis* sobre a formação de biofilme de *S. epidermidis* (SE5) (Log CFU/cm²). ●, *S. epidermidis* (SE5) sem a colonização de *C. parapsilosis*; ○, *S. epidermidis* (SE5) com a colonização de *C. parapsilosis*. Desvio padrão (n=3).

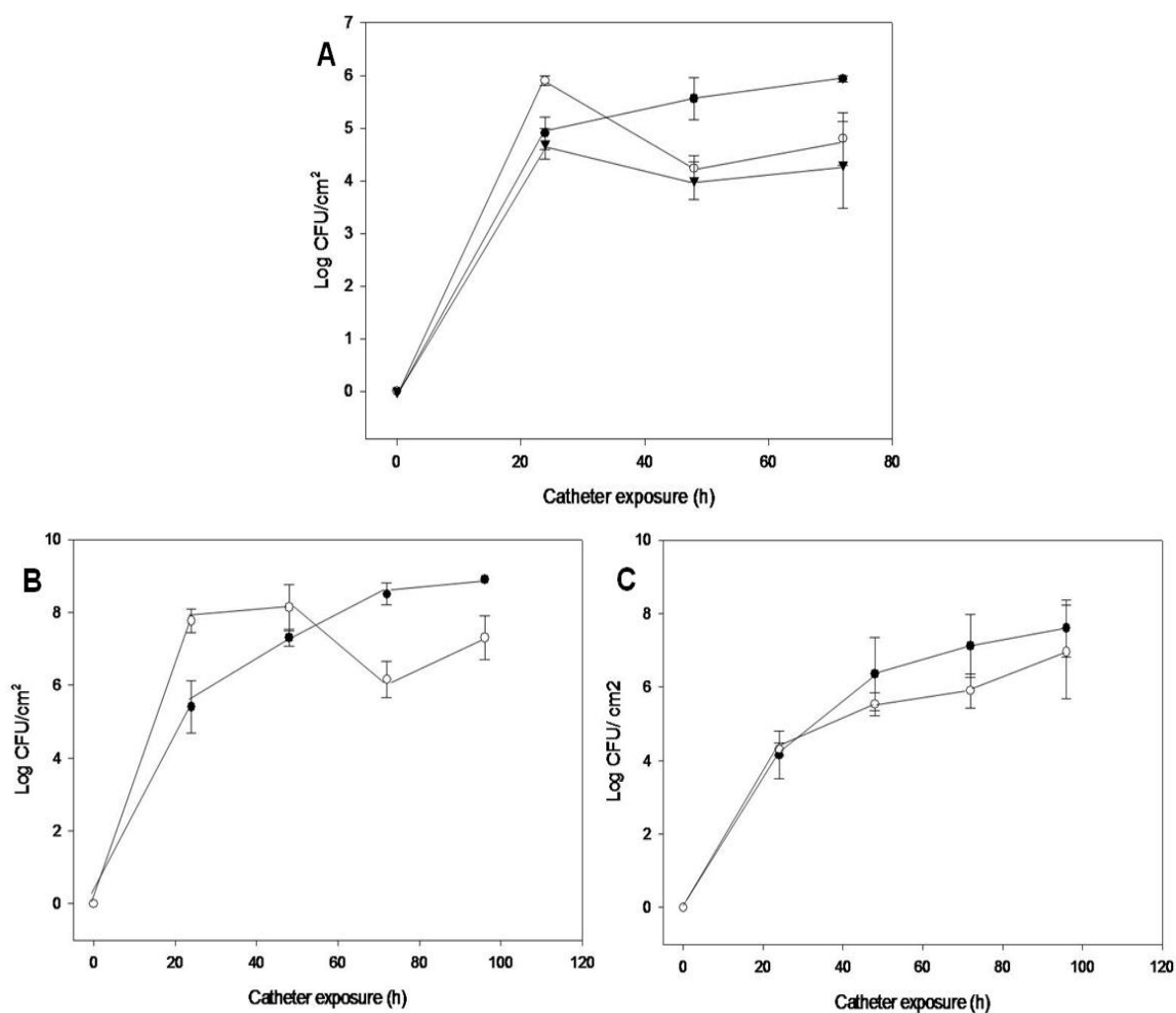


Figura 7. Formação de biofilmes por *Candida albicans* ou *Staphylococcus epidermidis* na presença de biofilmes pré-formados na superfície de CVC. (A) Efeito do biofilme pré-formado de *S. epidermidis* sobre o biofilme de *C. albicans* (Log CFU/cm²). ●, Biofilme de *C. albicans* sem a colonização prévia de *S. epidermidis*; ○, Biofilme de *C. albicans* com 24h de colonização prévia por *S. epidermidis* (SE1); ▼, Biofilme de *C. albicans* após 24h de colonização prévia de *S. epidermidis* (SE5). (B) Efeito da colonização de *C. albicans* sobre a formação de biofilme de *S. epidermidis* (SE1) (Log CFU/cm²). ●, *S. epidermidis* (SE1) sem a colonização de *C. albicans*; ○, *S. epidermidis* (SE1) com a colonização de *C. albicans*. (C) Efeito da colonização de *C. albicans* sobre a formação de biofilme de *S. epidermidis* (SE5) (Log CFU/cm²). ●, *S. epidermidis* (SE5) sem a colonização de *C. albicans*; ○, *S. epidermidis* (SE5) com a colonização de *C. albicans*. Desvio padrão (n=3).

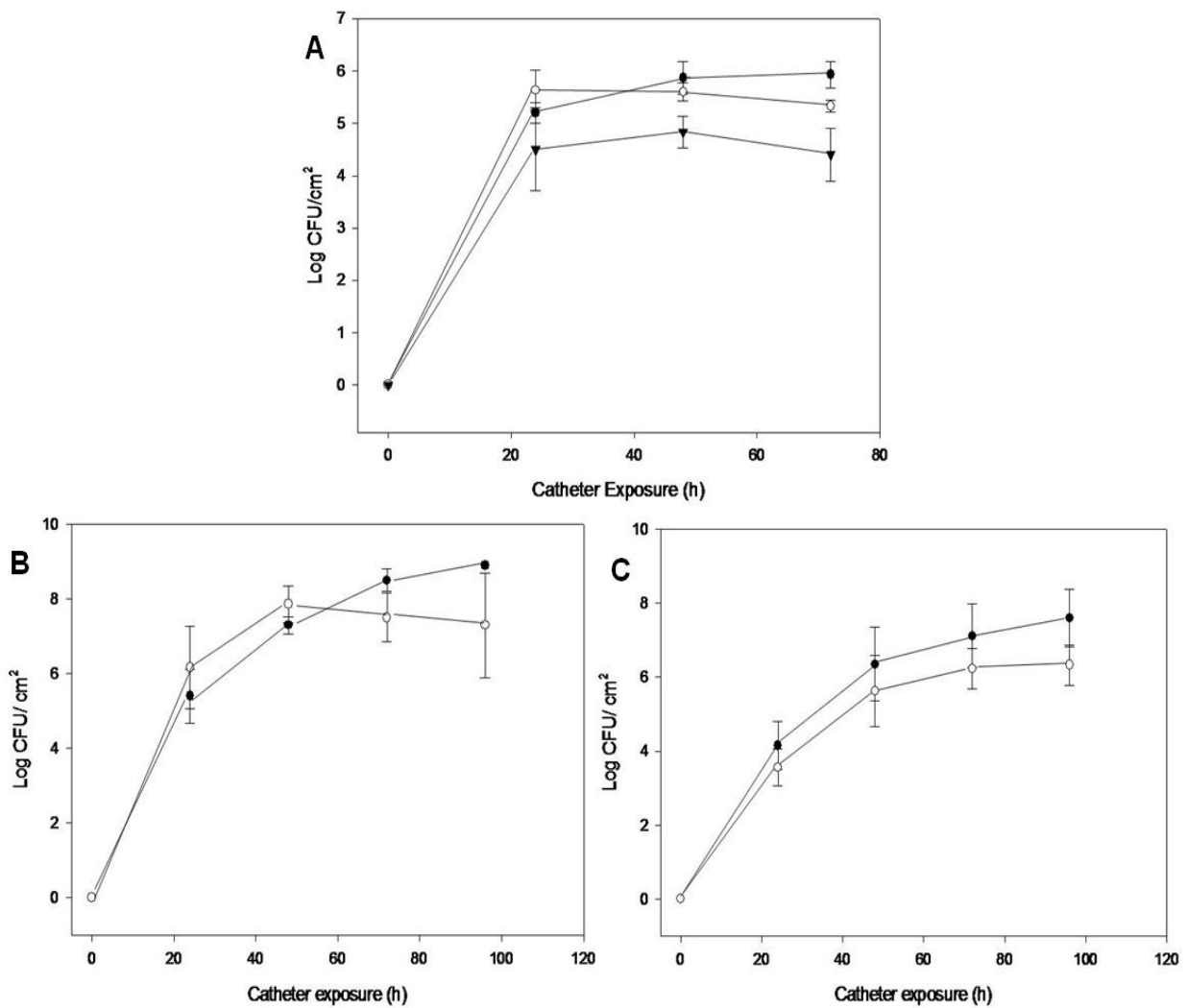


Figura 8. Formação de biofilmes por *Candida tropicalis* ou *Staphylococcus epidermidis* na presença de biofilmes pré-formados na superfície de CVC. (A) Efeito do biofilme pré-formado de *S. epidermidis* sobre o biofilme de *C. tropicalis* (Log CFU/cm²). ●, Biofilme de *C. tropicalis* sem a colonização prévia de *S. epidermidis*; ○, Biofilme de *C. tropicalis* com 24h de colonização prévia de *S. epidermidis* (SE1); ▼, Biofilme de *C. tropicalis* após 24h de colonização prévia de *S. epidermidis* (SE5). (B) Efeito da colonização de *C. tropicalis* sobre a formação de biofilme de *S. epidermidis* (SE1) (Log CFU/cm²). ●, *S. epidermidis* (SE1) sem a colonização de *C. tropicalis*; ○, *S. epidermidis* (SE1) com a colonização de *C. tropicalis*. (C) Efeito da colonização de *C. tropicalis* sobre a formação de biofilme de *S. epidermidis* (SE5) (Log CFU/cm²). ●, *S. epidermidis* (SE5) sem a colonização de *C. tropicalis*; ○, *S. epidermidis* (SE5) com a colonização de *C. tropicalis*. Desvio padrão (n=3).

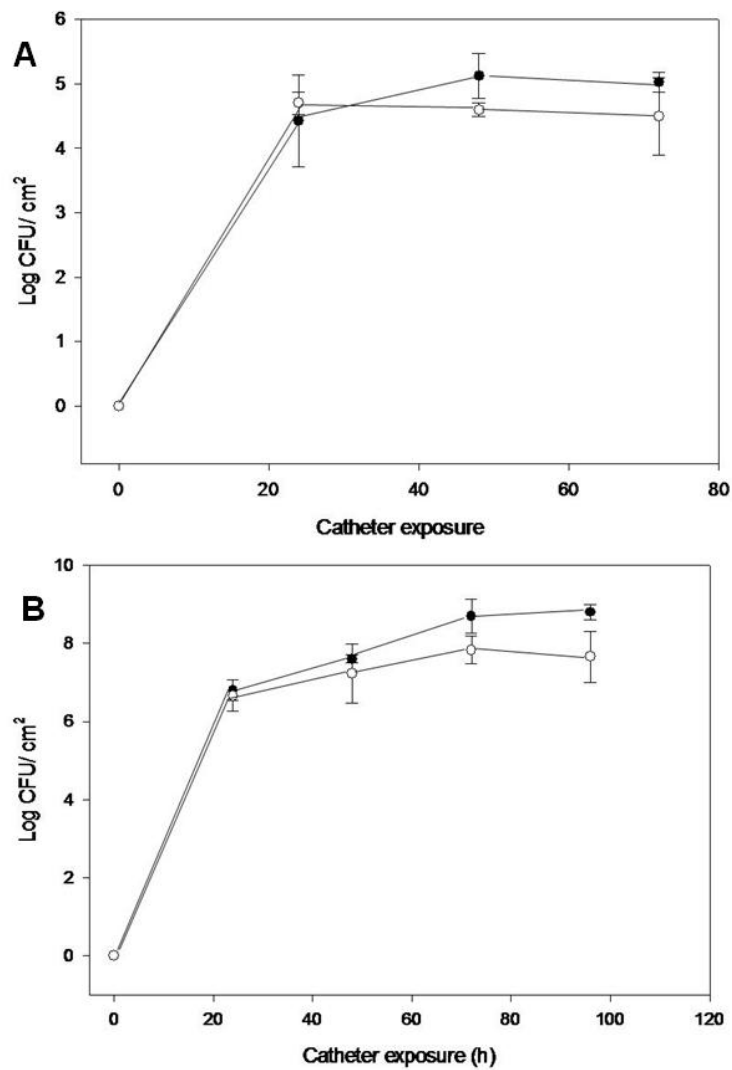


Figura 9. Formação de biofilmes por *Candida parapsilosis* ou *Pseudomonas aeruginosa* na presença de biofilmes pré-formados na superfície de CVC. (A) Efeito do biofilme pré-formado de *P.aeruginosa* sobre o biofilme de *C. parapsilosis* (Log CFU/cm²). ●, Biofilme de *C. parapsilosis* sem a colonização prévia de *P. aeruginosa*; ○, Biofilme de *C. parapsilosis* após 24h de colonização prévia de *P. aeruginosa*. (B) Efeito da colonização de *C. parapsilosis* sobre a formação de biofilme de *P. aeruginosa* (Log CFU/cm²). ●, Biofilme de *P. aeruginosa* sem a colonização de *C. parapsilosis*; ○, Biofilme de *P. aeruginosa* com a colonização de *C. parapsilosis*. Desvio padrão (n=3).

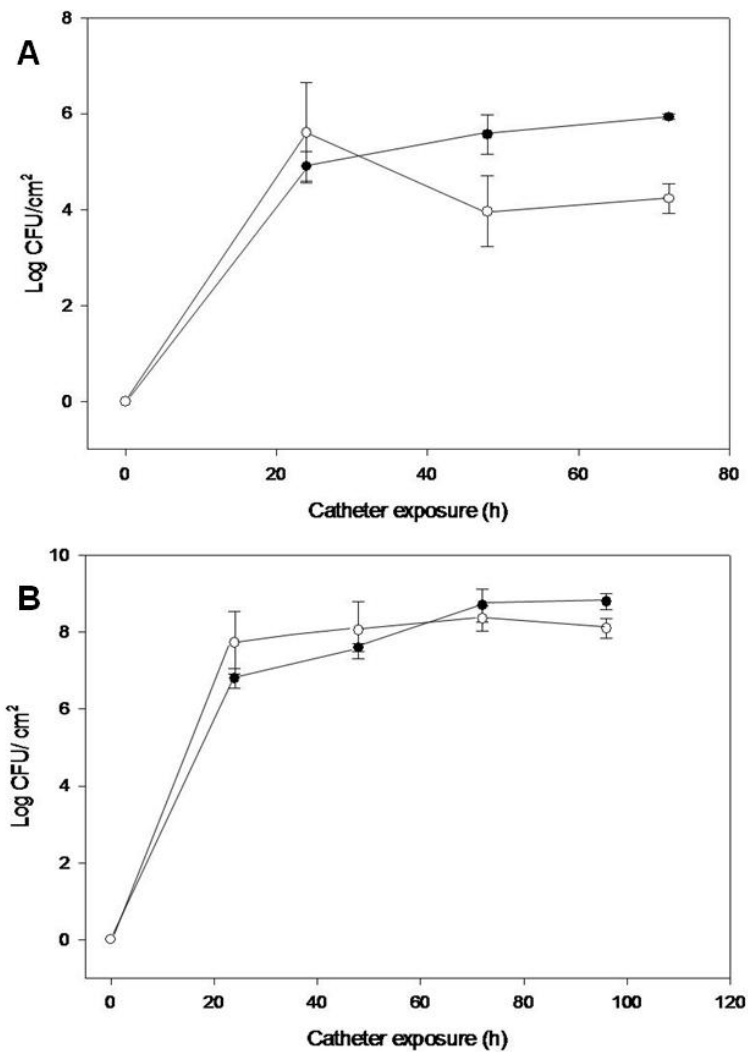


Figura 10. Formação de biofilmes por *Candida albicans* ou *Pseudomonas aeruginosa* na presença de biofilmes pré-formados na superfície de CVC. (A) Efeito do biofilme pré-formado de *P.aeruginosa* sobre o biofilme de *C. albicans* (Log CFU/cm²). ●, Biofilme de *C. albicans* sem a colonização prévia de *P. aeruginosa*; ○, Biofilme de *C. albicans* após 24h de colonização prévia de *P. aeruginosa*. (B) Efeito da colonização de *C. albicans* sobre a formação de biofilme de *P. aeruginosa* (Log CFU/cm²). ●, Biofilme de *P. aeruginosa* sem a colonização de *C. albicans*; ○, Biofilme de *P. aeruginosa* com a colonização de *C. albicans*. Desvio padrão (n=3).

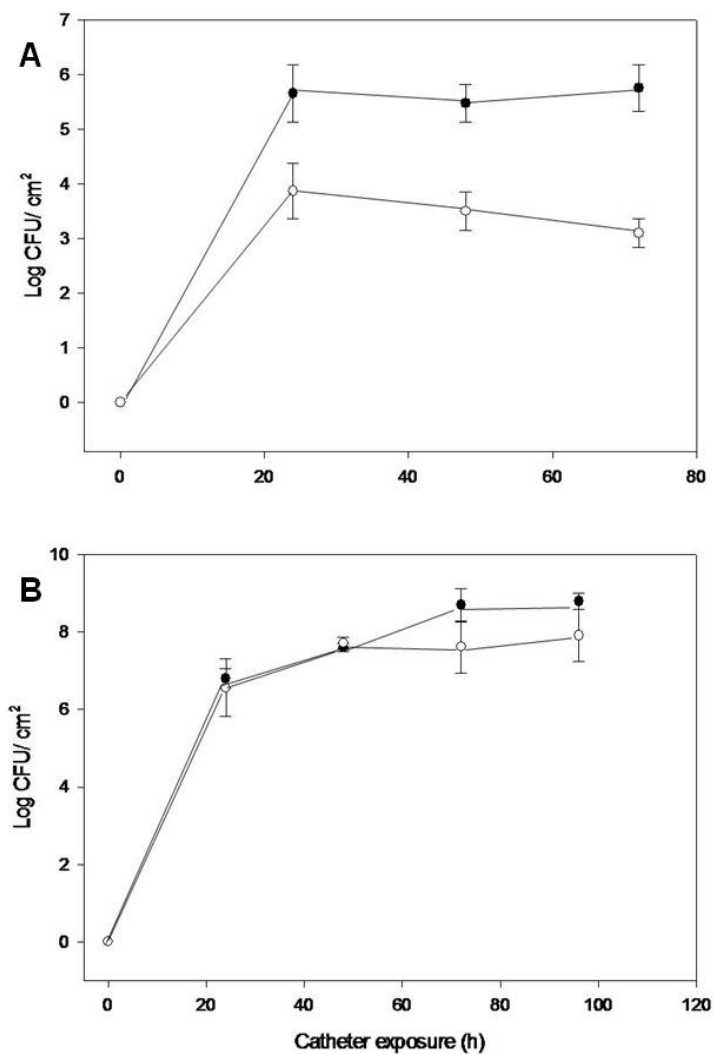


Figura 11. Formação de biofilmes por *Candida tropicalis* ou *Pseudomonas aeruginosa* na presença de biofilmes pré-formados na superfície de CVC. (A) Efeito do biofilme pré-formado de *P.aeruginosa* sobre o biofilme de *C. tropicalis* (Log CFU/cm²). ●, Biofilme de *C. tropicalis* sem a colonização prévia de *P. aeruginosa*; ○, Biofilme de *C. tropicalis* após 24h de colonização prévia de *P. aeruginosa*. (B) Efeito da colonização de *C. tropicalis* sobre a formação de biofilme de *P. aeruginosa* (Log CFU/cm²). ●, Biofilme de *P. aeruginosa* sem a colonização de *C. tropicalis*; ○, Biofilme de *P. aeruginosa* com a colonização de *C. tropicalis*. Desvio padrão (n=3).

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A presença dos biofilmes na superfície dos CVCs foi confirmada através de MEV (Fig. 13-14). Os resultados de MEV indicaram que os biofilmes formados por *C. albicans* eram estruturalmente formados por uma densa rede de hifas, blastosporos, tubos germinativos e pseudo-hifas. Entretanto, uma quantidade relativamente pequena de EPS pode ser observada no biofilme formado por essa espécie de *Candida*. Para *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (Figuras 13 e 14, respectivamente), uma observação estrutural detalhada indicou que os biofilmes formados na superfície dos CVCs eram compostos, durante a fase de maturação, por uma típica estrutura de microcolônias (camada basal formada por blastosporos não confluentes), canais de água e presença de algumas pseudo-hifas e estruturas filamentosas. Adicionalmente, as análises de MEV dos biofilmes formados por *C. tropicalis* indicaram a produção de uma extensa camada de EPS recobrando as células sésseis (Figura 13. A).

Na presença do biofilme pré- formado de *P. aeruginosa*, as análises de MEV dos biofilmes de *C. albicans* e *C. tropicalis* indicaram uma diminuição da extensão e número de estruturas fúngicas visualizadas nos biofilmes, em relação ao controle (Fig. 12. B e 13. B, respectivamente). Especificamente, para os biofilmes de *C. albicans* e *P. aeruginosa* os resultados indicaram uma diminuição importante no número de hifas e pseudo-hifas visualizadas quando comparados com o controle (sem presença do biofilme fúngico sem presença de bactéria). Ainda, para o biofilme formado por *C. albicans* e *P. aeruginosa*, observou-se que a maioria dos blastosporos visualizados estavam parcial ou completamente cobertos pelo biofilme bacteriano. Adicionalmente, *P. aeruginosa* produziu uma grande quantidade de EPS sobre a estrutura do biofilme fúngico.

Para *C. parapsilosis*, uma estrutura mista de leveduras e formas filamentosas foram observadas na presença do biofilme pré-formados de *P. aeruginosa*. Entretanto, este resultado não foi correlacionado com uma diminuição do número de células viáveis (Figura 9). Através da MEV observou-se que o biofilme formado por *C. parapsilosis* na presença de *P. aeruginosa* foi constituído da típica estrutura de microcolônias e pseudo-hifas (Fig. 14. A).

Os isolados de *S. epidermidis* (SE1 e SE5) apresentaram uma extensa interação com os biofilmes formados por *C. albicans* (Fig 12. C e D). Nestes biofilmes, as bactérias cresceram claramente aderidas à estrutura do biofilme fúngico. Adicionalmente, na presença dos isolados de *S. epidermidis* (SE1 e SE5), os biofilmes formados por *C. albicans* apresentaram uma complexa estrutura constituída de numerosos blastosporos, hifas e pseudo-hifas intimamente aderida ao denso agregado de células sésseis bacterianas.

Para os biofilmes formados por *C. tropicalis*, o efeito antagônico parcial dos biofilmes formados pelos isolados de *S. epidermidis* pode ser evidenciado pelos achados obtidos através da técnica de MEV (Fig. 13. C e D). De uma maneira geral, os biofilmes polimicrobianos formados por *S. epidermidis* (SE1 e SE5) e *C. tropicalis* foram relacionados com uma ampla produção de EPS, sendo que muitas vezes, as células sésseis bacterianas cobriram parcialmente o biofilme fúngico. Estruturalmente o biofilme formado por *C. tropicalis* na presença das células sésseis de *S. epidermidis* foi caracterizado pela presença de numerosos blastosporos e raras pseudo- hifas.

Em contraste com os achados para *C. tropicalis* e *C. albicans*, os biofilmes polimicrobianos de *C. parapsilosis* e *S. epidermidis* apresentaram uma estrutura básica de microcolônia fúngica formada basicamente por blastosporos e formas filamentosas em associação com um denso biofilme bacteriano (Fig. 14. C e D).

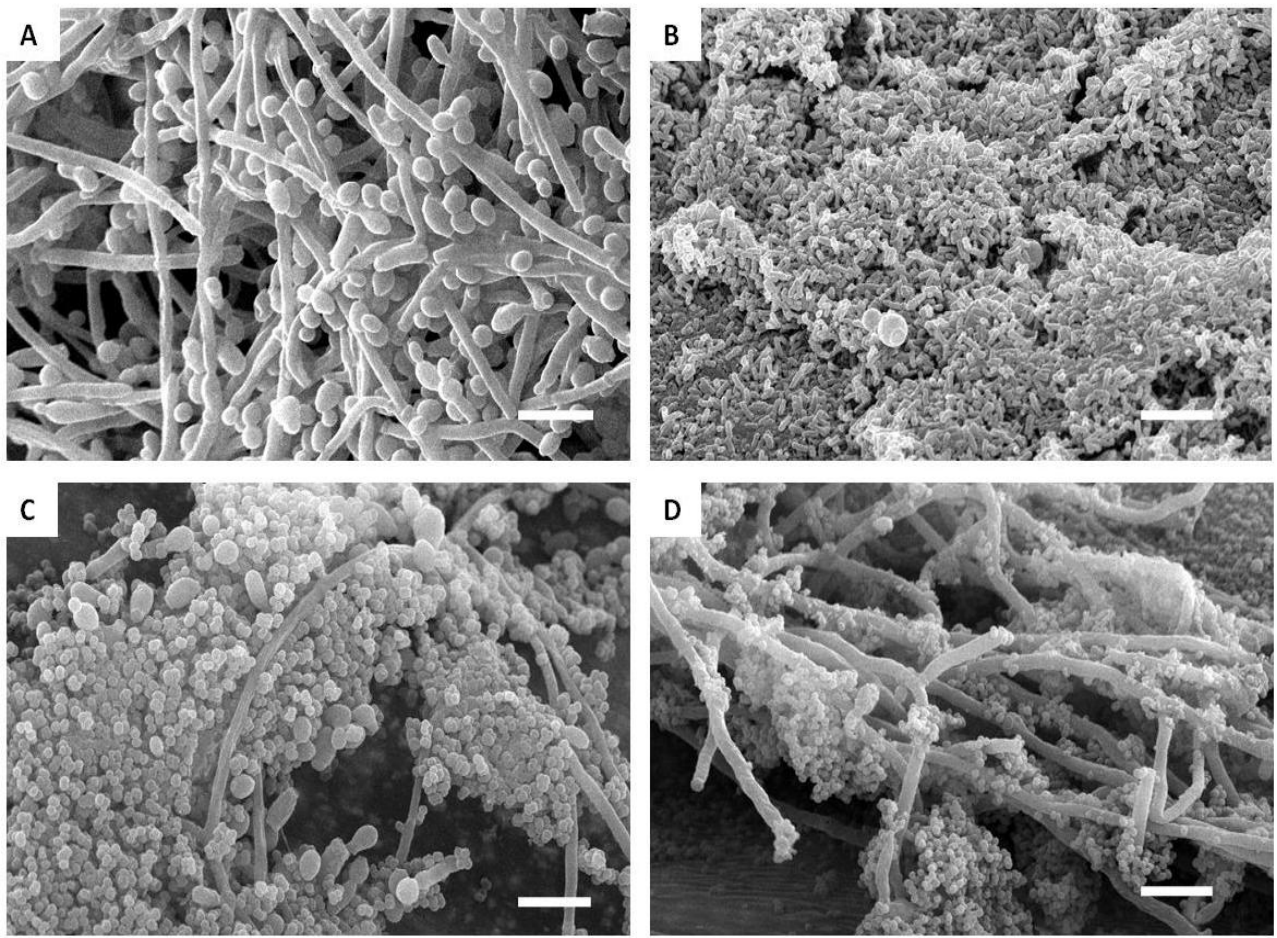


Figura 12. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biofilmes formados por *C. albicans*, em CVCs, na presença ou ausência de biofilmes formados por *Pseudomonas aeruginosa* ou *Staphylococcus epidermidis*: (A) Biofilme de *C. albicans* sem presença de biofilme bacteriano; (B) Biofilme polimicrobiano formado por *C. albicans* e *P. aeruginosa*; (C) Biofilme polimicrobiano formado por *C. albicans* e *S. epidermidis* (SE1); (D) Biofilme polimicrobiano formado por *C. albicans* and *S. epidermidis* (SE5). As imagens são representativas dos campos visualizados. Barras, 10 μm .

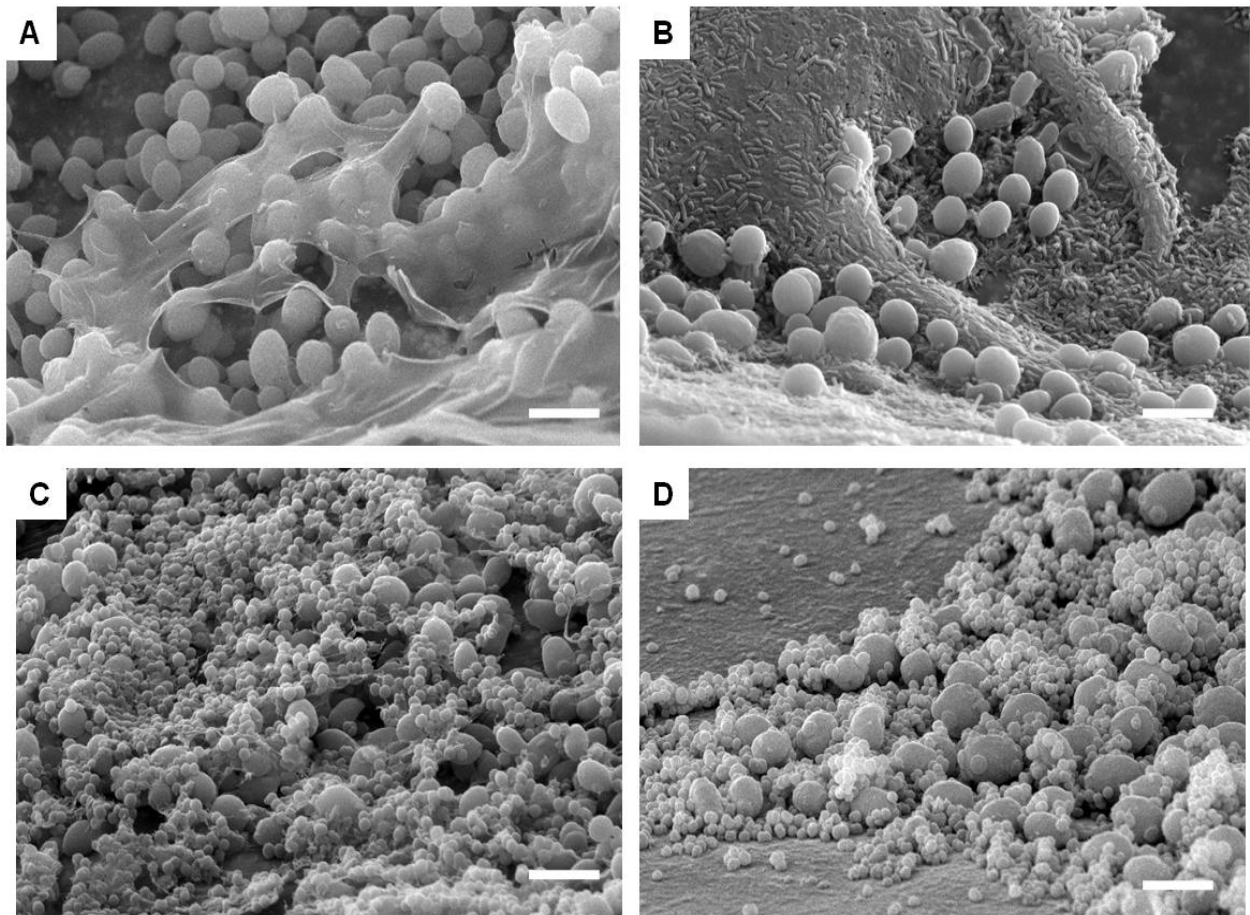


Figura13. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biofilmes formados por *C. tropicalis*, em CVCs, na presença ou ausência de biofilmes formados por *Pseudomonas aeruginosa* ou *Staphylococcus epidermidis*: (A) Biofilme de *C. tropicalis* sem presença de biofilme bacteriano; (B) Biofilme polimicrobiano formado por *C. tropicalis* e *P. aeruginosa*; (C) Biofilme polimicrobiano formado por *C. tropicalis* e *S. epidermidis* (SE1); (D) Biofilme polimicrobiano formado por *C. tropicalis* and *S. epidermidis* (SE5). As imagens são representativas dos campos visualizados. Barras, 10 μm .

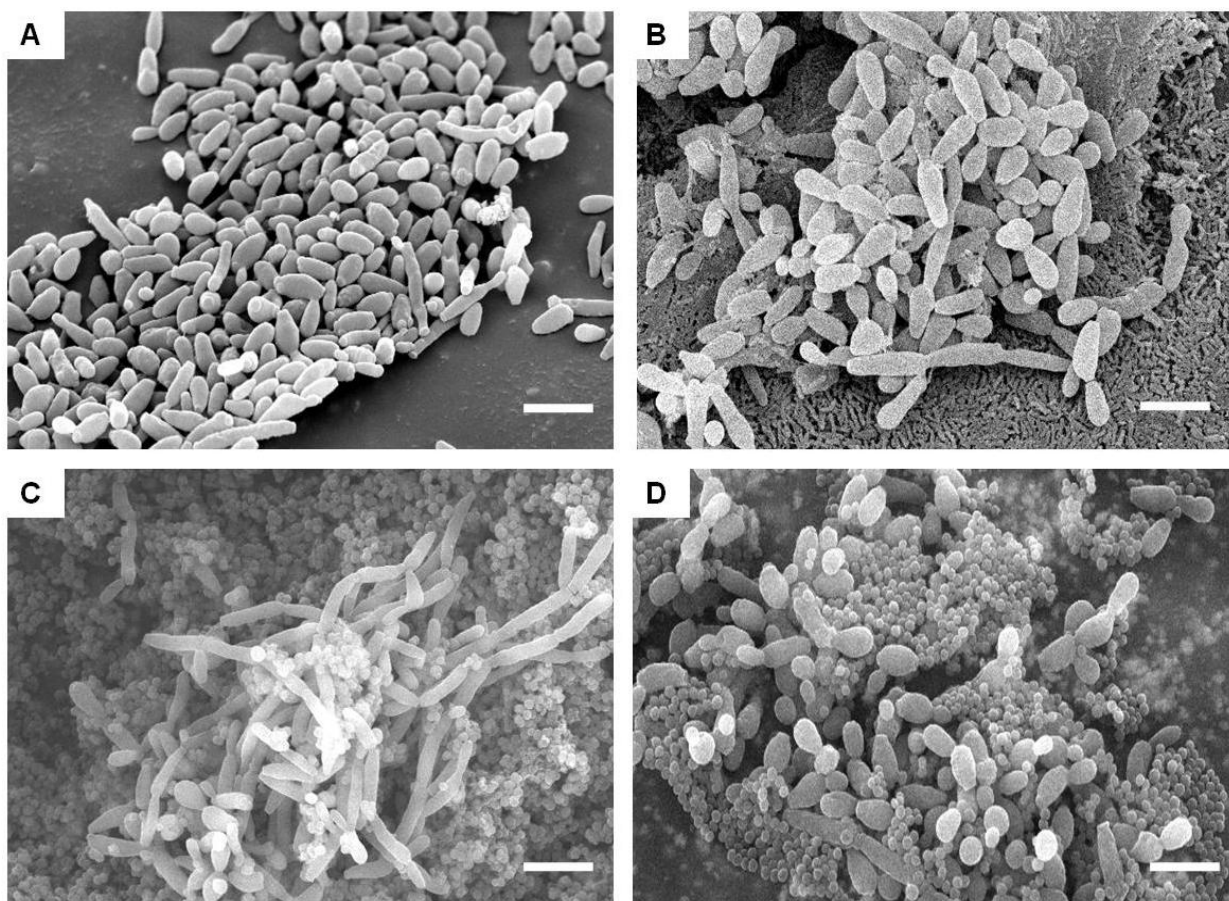


Figura 14. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biofilmes formados por *C. parapsilosis*, em CVCs, na presença ou ausência de biofilmes formados por *Pseudomonas aeruginosa* ou *Staphylococcus epidermidis*: (A) Biofilme de *C. parapsilosis* sem presença de biofilme bacteriano; (B) Biofilme polimicrobiano formado por *C. parapsilosis* e *P. aeruginosa*; (C) Biofilme polimicrobiano formado por *C. parapsilosis* e *S. epidermidis* (SE1); (D) Biofilme polimicrobiano formado por *C. parapsilosis* and *S. epidermidis* (SE5). As imagens são representativas dos campos visualizados. Barras, 10 μm .

Estudo de coagregação

Os resultados obtidos nos experimentos de coagregação e autoaglutinação estão apresentados na Figura 15 e nas Tabelas 8 e 9.

Os isolados de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *S. epidermidis* (SE1 e SE5) não apresentaram autoaglutinação (Tab. 9). Por outro lado, *C. albicans* e *P. aeruginosa* apresentaram capacidade de autoaglutinar após 12h de incubação. O isolado de *C. albicans* apresentou um perfil de coagregação na presença de todos os isolados bacterianos. As outras espécies de *Candida* apresentaram um perfil variável de coagregação, como apresentado na Tabela 8.

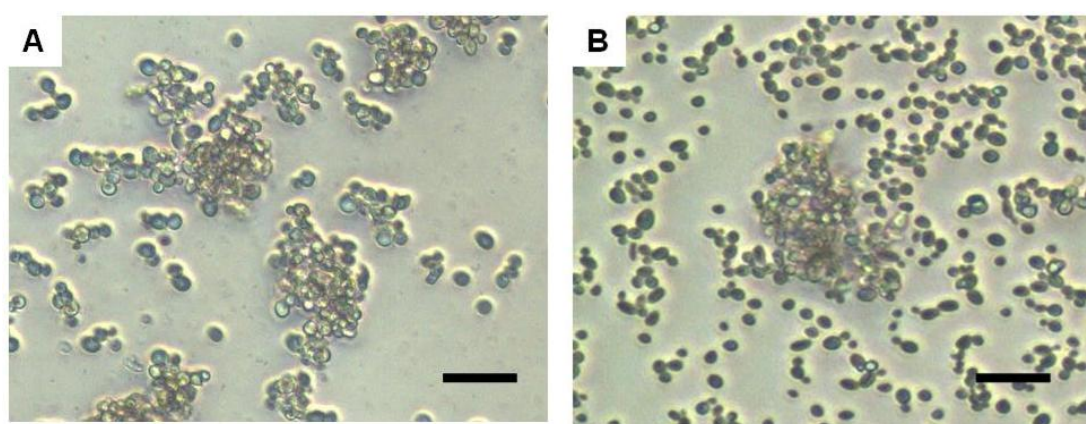


Figura 15. Imagens das lamínas de vidro contendo os agregados formados entre bactéria e leveduras: (A) *C. albicans* e *P. aeruginosa*; (B) *C. tropicalis* e *S. epidermidis* (SE1). Aumento, x200.

Tabela 8. Avaliação do perfil de coagregação entre isolados de *Candida* e bactéria.

Isolados bacterianos	Coagregação com isolados de <i>Candida</i> :		
	<i>C. albicans</i> (CA4)	<i>C. tropicalis</i> (CT8)	<i>C. parapsilosis</i> (CP1)
<i>S. epidermidis</i> (SE1)	+	±	-
<i>S. epidermidis</i> (SE5)	+	-	±
<i>P. aeruginosa</i>	+	-	-

+, coagregação; ±, coagregação parcial; -, sem coagregação

Tabela 9. Perfil de autoaglutinação apresentados pelos isolados de *Candida* e bactéria.

Organismo	Autoaglutinação
<i>C. albicans</i>	+
<i>C. tropicalis</i>	-
<i>C. parapsilosis</i>	-
<i>S. epidermidis</i> (SE1)	-
<i>S. epidermidis</i> (SE5)	-
<i>P. aeruginosa</i>	+

+, autoaglutinação; -, sem autoaglutinação

Avaliação do efeito inibitório do sobrenadante produzidos em biofilmes bacterianos sobre a formação de biofilmes de *Candida* spp.

Os resultados dos experimentos que avaliaram o efeito de sobrenadante de biofilmes bacterianos sobre células sésseis fúngicas estão apresentados na Figura 16. Os resultados estão expressos de acordo com a atividade metabólica produzida pelos biofilmes fúngicos na presença do sobrenadante de biofilmes bacterianos.

O processo de formação de biofilmes por *C. albicans* foi inibido de forma importante pelos sobrenadantes obtidos a partir dos biofilmes formados, após 48 h, pelos isolados bacterianos (Fig. 16. C e D). Para o sobrenadante obtido a partir dos biofilmes formados por *S. epidermidis* SE1, os resultados apontaram um efeito inibitório sobre o processo de formação do biofilme por *C. albicans* especificamente para o tempo de 48h.

Para *C. tropicalis*, a presença dos sobrenadantes obtidos a partir dos biofilmes de *P. aeruginosa*, 24 e 48h, foi relacionada com uma inibição da atividade metabólica do biofilme fúngico (Fig. 16 E e F). Ainda para esta levedura, a presença do sobrenadante dos biofilmes formados pelos isolados de *S. epidermidis* (SE1 e SE5) apresentaram uma relativa inibição do crescimento do biofilme fúngico no tempo de 48h quando comparados com os resultados obtidos para os sobrenadantes de biofilmes bacterianos produzidos nas primeiras 24 horas.

Para *C. parapsilosis*, os resultados indicaram que esta espécie de *Candida* foi menos influenciada pela presença do sobrenadante produzido pelos diferentes biofilmes bacterianos (fig. 16 A e B).

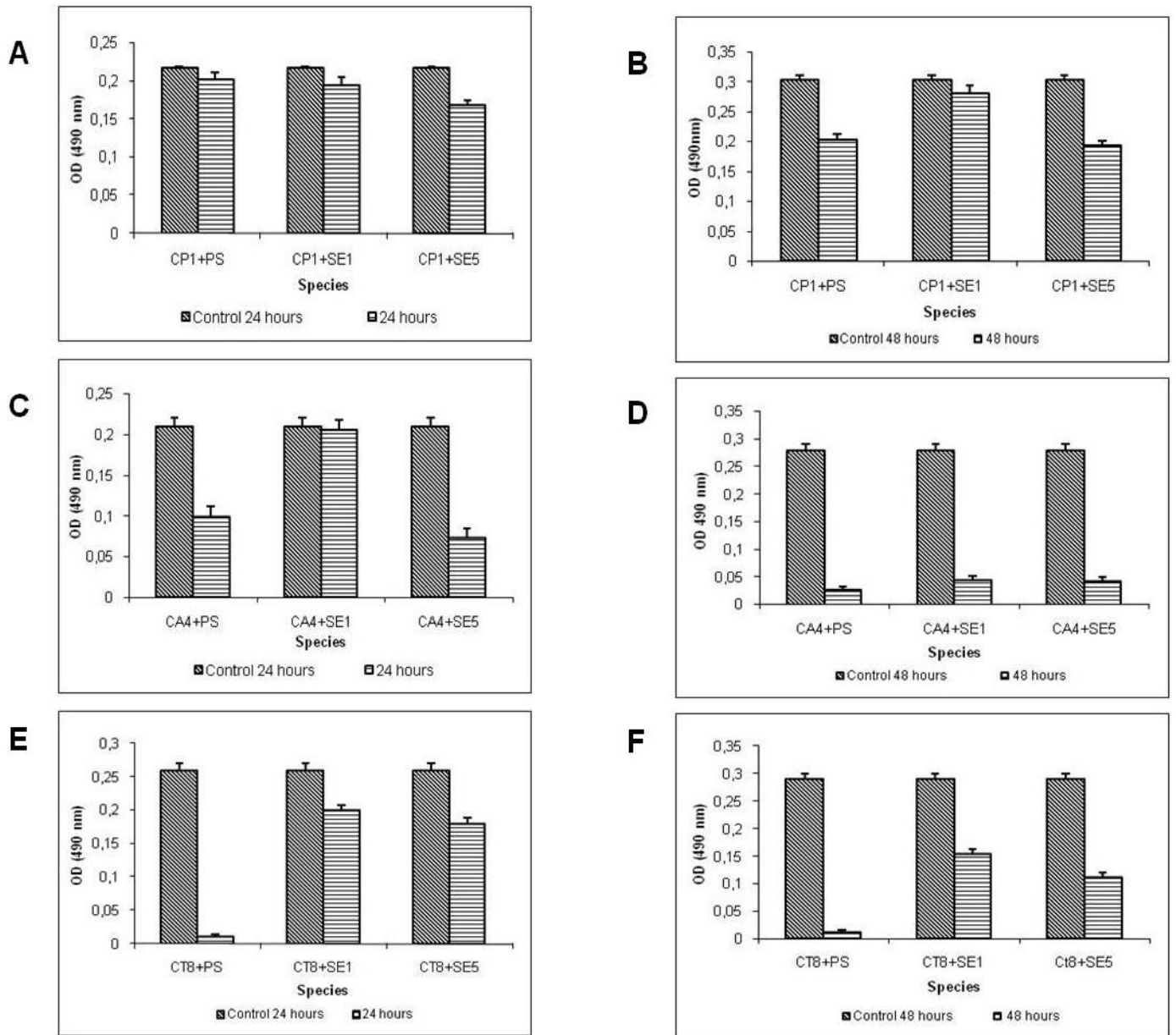


Figura 16. Efeito inibitório do sobrenadante de biofilmes bacterianos sobre a formação dos biofilmes de *Candida* spp.

Atividade *in vitro* da caspofungina e da anfotericina B sobre os biofilmes formados por *Candida* spp.

Os resultados obtidos nos testes de suscetibilidade das células planctônicas e células sésseis de *Candida* spp frente a caspofungina (CAS) e anfotericina B (AMB) estão apresentados na Tabela 10.

As células planctônicas utilizadas nesse estudo apresentaram um ótimo perfil de susceptibilidade frente aos antifúngicos testados pelo método proposto pelo CLSI (2002). Porém, para o isolado de *C. parapsilosis* uma tendência de CIM aumentados para CAS e AMB foi observada em comparação com os resultados obtidos para *C. albicans* e *C. tropicalis*.

Os resultados obtidos nos testes de suscetibilidade de células sésseis estão representados na figura 17. Como apresentado na tabela 10 e figura 17 (A, B e C), todos biofilmes formados pelas diferentes espécies de *Candida* demonstraram uma redução da atividade metabólica (SCIM 50) para a AMB na concentração de 1 µg/ml. Este resultado foi comparável (concordância de ± 1 diluição) aos valores obtidos para a CIM no teste de susceptibilidade de células planctônicas. Por outro lado, os resultados obtidos para nos biofilmes formados por isolados de *Candida* spp na presença da CAS (fig. 17. D-F) foram superiores aos resultados obtidos nos testes com células planctônicas. Os valores de SCIM 50 para *C. tropicalis* e *C. albicans* foram estimados em 0,25 e 0,5 µg/ml, respectivamente, e foram mais de duas diluições superiores aos valores obtidos para as células planctônicas. O valor de SCIM 50 para *C. parapsilosis* (4 µg/ml) foi 16 vezes maior do que o valor de CIM obtido para células planctônicas.

Tabela 10. Perfil de susceptibilidade de biofilmes e de células planctônicas de *Candida* spp. frente aos antifúngicos caspofungina e anfotericina B, utilizando os métodos CLSI e XTT^a.

Isolados testados	CIM (µg/ml) :			
	Anfotericina B		Caspofungina	
	Células planctônicas ^b	Biofilme após 48h (SCIM 50) ^c	Células planctônicas ^b	Biofilme após 48h (SCIM 50) ^c
<i>C. albicans</i> (CA4)	0.5	1	0.0625	0.5
<i>C. parapsilosis</i> (CP1)	1	1	0.25	4
<i>C. tropicalis</i> (CT8)	0.5	1	0.0625	0.25

^a Resultados representativos de três experimentos.

^b Resultados de CIM baseados na determinação visual da menor concentração da droga capaz de produzir uma proeminente redução no crescimento, quando comparado com o controle (sem exposição à droga).

^c Resultados de SCIM 50 baseados na determinação da atividade metabólica (redução de 50% da densidade ótica) quando comparado com o controle (sem exposição à droga), através do teste colorimétrico de redução do XTT-formazan.

Avaliação do efeito paradoxal (PG) dos biofilmes formados por *Candida* spp. na presença de altas concentrações de CAS

Os valores da atividade metabólica obtidos para os biofilmes formados por *C. albicans* e *C. tropicalis*, na presença da CAS, apresentaram uma variação importante quando da exposição destes biofilmes a concentrações superiores do que 4 µg/ml (Fig. 17 D e E). Essa variação foi representada pelo aumento dos valores de densidade ótica, resultando em um padrão semelhante ao observado nos discos contendo biofilmes que não foram expostos a CAS (Controle). Para estas espécies, o PG foi observado e caracterizado pelo aumento da atividade metabólica dos biofilmes nas concentrações de CAS entre 4- 16 µg/ml. Adicionalmente, após a concentração de 32 µg/ml, observou-se uma queda importante da atividade metabólica, com os resultados atingindo valores inferiores aos obtidos inicialmente para SCIM 50. Nos biofilmes formados por *C. parapsilosis* e expostos a CAS, e para todos os biofilmes fúngicos expostos à AMB este PG não foi observado.

A fim de confirmar os resultados obtidos pelo método de avaliação da atividade metabólica dos biofilmes na presença de diferentes concentrações de CAS, discos de silicone contendo biofilmes fúngicos foram expostos as mesmas concentrações deste antifúngico e processados para determinação do número de células sésseis viáveis (Log CFU/ cm² de superfície) (Tab. 11). Os resultados obtidos para *C. albicans* e *C. tropicalis* confirmaram uma queda do número de células sésseis viáveis após exposição a concentrações mais baixas de CAS. Quando estes mesmos biofilmes foram expostos a concentrações entre 4 e 32 µg/ml os valores de células sésseis recuperadas foram muito próximos aos obtidos para os controles. Nos biofilmes formados por *C. parapsilosis* uma redução do número de células sésseis viáveis esteve relacionada com o aumento da concentração da CAS.

Tabela 11. Contagem de células viáveis recuperadas a partir dos biofilmes formados por *Candida* spp. em discos de silicone expostos a caspofungina

Caspofungin µg/ml	<i>C. albicans</i> Log CFU/cm²	<i>C. tropicalis</i> Log CFU/cm²	<i>C. parapsilosis</i> Log CFU/cm²
Sem droga	6,4	4,6	6,5
0,25	4,4	0	6,4
0,5	3,4	0	6,2
1	3,3	0	5,7
2	4,7	0	5,9
4	5,3	5,1	5,7
8	5,6	5,2	5,7
16	6,2	4,5	5,7
32	5,6	4,2	5,4
64	4,6	3,6	5,0
128	3,5	2,7	3,3

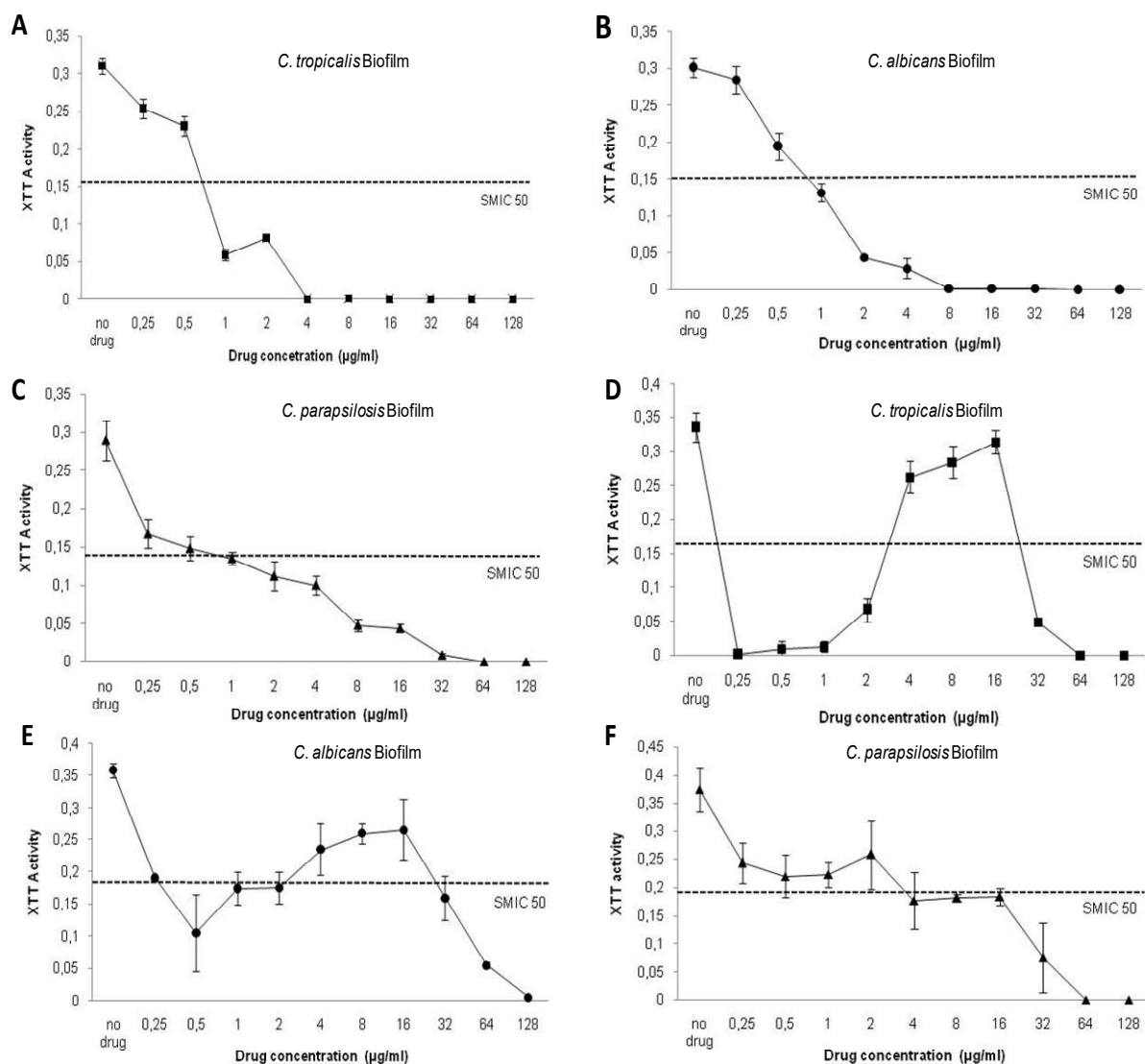


Figura 17. Atividade metabólica dos biofilmes formados por *Candida* spp. após exposição à diferentes concentrações de caspofungina (CAS) e anfotericina B (AMB). Os valores são expressos como a média dos resultados de densidade ótica (OD) obtidos para os discos de silicone contendo os biofilmes expostos ou não (controle) as drogas em estudo. (A) Biofilme de *C. tropicalis* exposto à AMB; (B) Biofilme de *C. albicans* exposto à AMB; (C) Biofilme de *C. parapsilosis* exposto à AMB; (D) Biofilme de *C. tropicalis* exposto à CAS; (E) Biofilme de *C. albicans* exposto à CAS; (F) Biofilme de *C. parapsilosis* exposto à CAS. Desvio padrão (n=3).

Avaliação do PG através de MEV

Na tentativa de correlacionar o PG com possíveis alterações na estrutura celular dos biofilmes formados por *Candida* spp., a técnica de MEV foi utilizada para avaliar o efeito de três diferentes concentrações de CAS (1, 16 e 128 µg/ml) sobre a estrutura e morfologia dos biofilmes (Fig 18- 20). A MEV forneceu informações importantes sobre as diferenças morfológicas apresentadas pelos diferentes biofilmes fúngicos. Os experimentos foram realizados em triplicata e em dias alternados, sendo as imagens captadas consideradas representativas da estrutura fúngica observadas nos biofilmes.

Os biofilmes formados por *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (Fig. 18 A e 20 A, respectivamente) produziram uma estrutura morfológica de menor complexidade do que a observada para *C. albicans* (Fig. 19 A). Os biofilmes controles, formados por *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, apresentaram uma estrutura fundamental formada por microcolônias, blastosporos, raras formas filamentosas (hifas e pseudo-hifas) e canais de água (Fig. 18.A e 20.A). Nos biofilmes formados por *C. albicans* (sem exposição à CAS) a arquitetura do biofilme foi bastante heterogênea e composta de uma camada densa de leveduras, pseudo-hifas e hifas (Fig. 19.A).

Após exposição à CAS, na concentração de 1 µg/ml, os biofilmes formados por *C. albicans* apresentaram uma diminuição do número de hifas e um aumento do número de células atípicas (CA). Essas CA foram caracterizadas por um tamanho aumentado, morfologia anormal e estrutura colabadas (fig. 19 B). Na concentração de 16 µg/ml observou-se a presença de hifas e também das mesmas células com estrutura colabada, porém, em menor proporção. Ainda nesta concentração da droga, células em formato cônico foram visualizadas nos biofilmes (Fig. 19 C). Na concentração de 128 µg/ml, observou-se um reaparecimento de blastosporos, de morfologia normal e algumas vezes de tamanho reduzido, e a presença de numerosas hifas (Fig. 19 D). Nesta alta concentração de CAS, a estrutura geral do biofilme formado por *C. albicans* foi considerada semelhante à observada no controle.

Para os biofilmes formados por *C. tropicalis*, as células sésseis visualizadas através da MEV apresentaram alterações na morfologia celular, sugestivas do PG, na presença de 16 e 128 µg/ml de CAS (Fig. 18 B, C e D). Entretanto, na presença de 1 µg/ml de CAS, todas as células visualizadas nos campos exibiram uma forma colabada, além da presença de restos celulares (Fig. 18 B). Na concentração de 16 µg/ml de CAS, células com uma estrutura cônica, tamanho atípico e algumas vezes colabadas foram observadas (Fig. 18 C). Os biofilmes expostos à 128 µg/ml de CAS mostraram-se muito similares, do ponto de vista estrutural, aos biofilmes que não foram expostos à droga.

Finalmente, para os biofilmes formados por *C. parapsilosis*, a estrutura básica de microcolônias, evidenciadas no biofilme sem exposição da droga, foi mantida nas diferentes concentrações do antifúngico (Fig. 20). Na concentração de 1 µg/ml não foi observado um efeito importante sobre a estrutura do biofilme fúngico (Fig. 20 B). Na concentração de 16 µg/ml de CAS observou-se um efeito da droga sobre a morfologia das células sésseis associado com a visualização de diversos blastosporos de estrutura colabada e de tamanho reduzido (Fig. 20 C). Na concentração de 128 µg/ml o biofilme formado por *C. parapsilosis* apresentou uma camada superficial de blastosporos (estruturadamente normais) posicionados acima de uma camada de células fúngicas atípicas (Fig. 20 D).

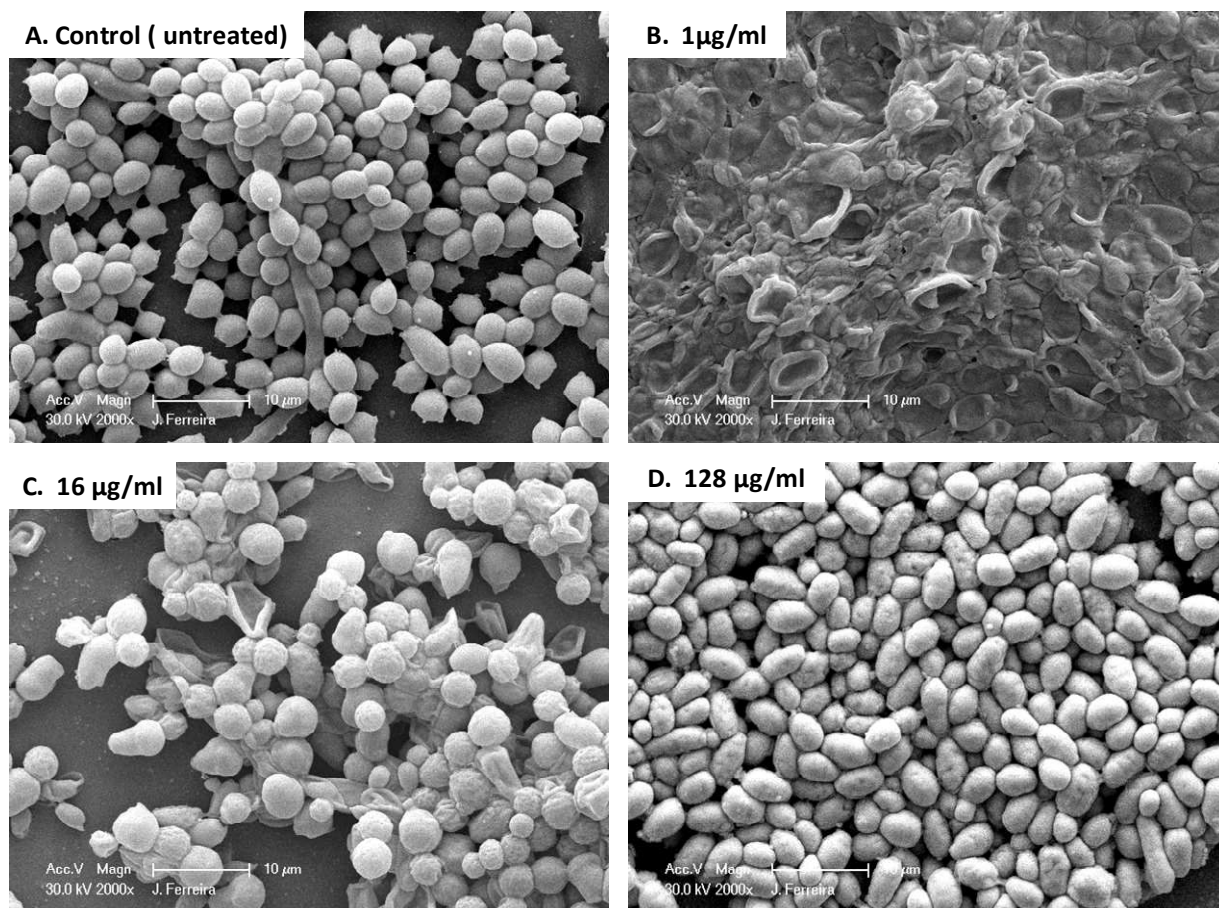


Figura 18. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biofilmes formados por *Candida tropicalis*, em discos de silicone, após exposição a diferentes concentrações de CAS. Biofilmes foram formados por 48 h em meio RPMI 1640. (A) Biofilme de *C. tropicalis* sem exposição à droga (controle). (B) Biofilme de *C. tropicalis* após exposição de 1 µg/ ml. (C) Biofilme de *C. tropicalis* após exposição de 16 µg/ ml. (D) Biofilme de *C. tropicalis* após exposição de 128 µg/ ml. As imagens são representativas dos campos visualizados. Barras, 10 µm.

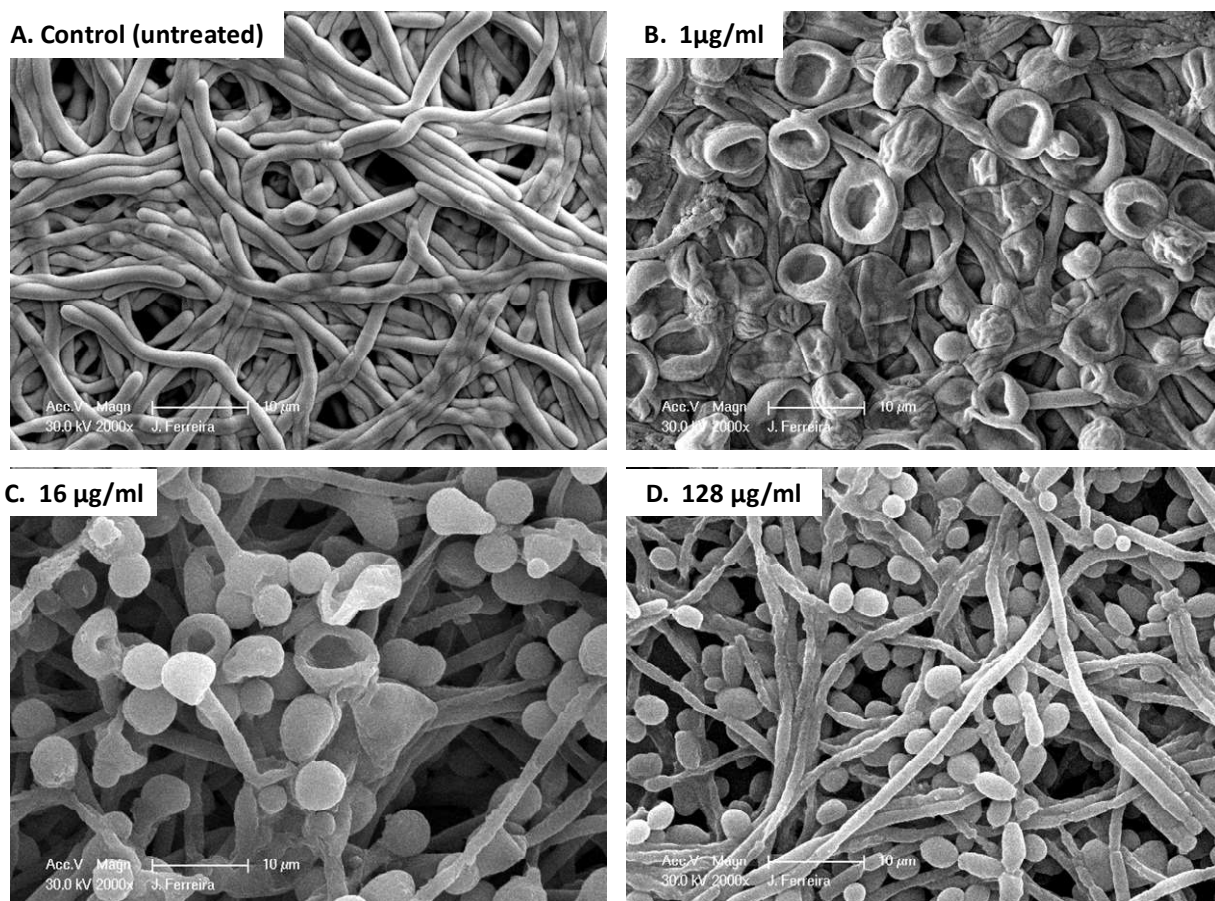


Figura 19. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biofilmes formados por *Candida albicans*, em discos de silicone, após exposição a diferentes concentrações de CAS. Biofilmes foram formados por 48 h em meio RPMI 1640. (A) Biofilme de *C. albicans* sem exposição à droga (controle). (B) Biofilme de *C. albicans* após exposição de 1 µg/ ml. (C) Biofilme de *C. albicans* após exposição de 16 µg/ ml. (D) Biofilme de *C. albicans* após exposição de 128 µg/ ml. As imagens são representativas dos campos visualizados. Barras, 10 µm.

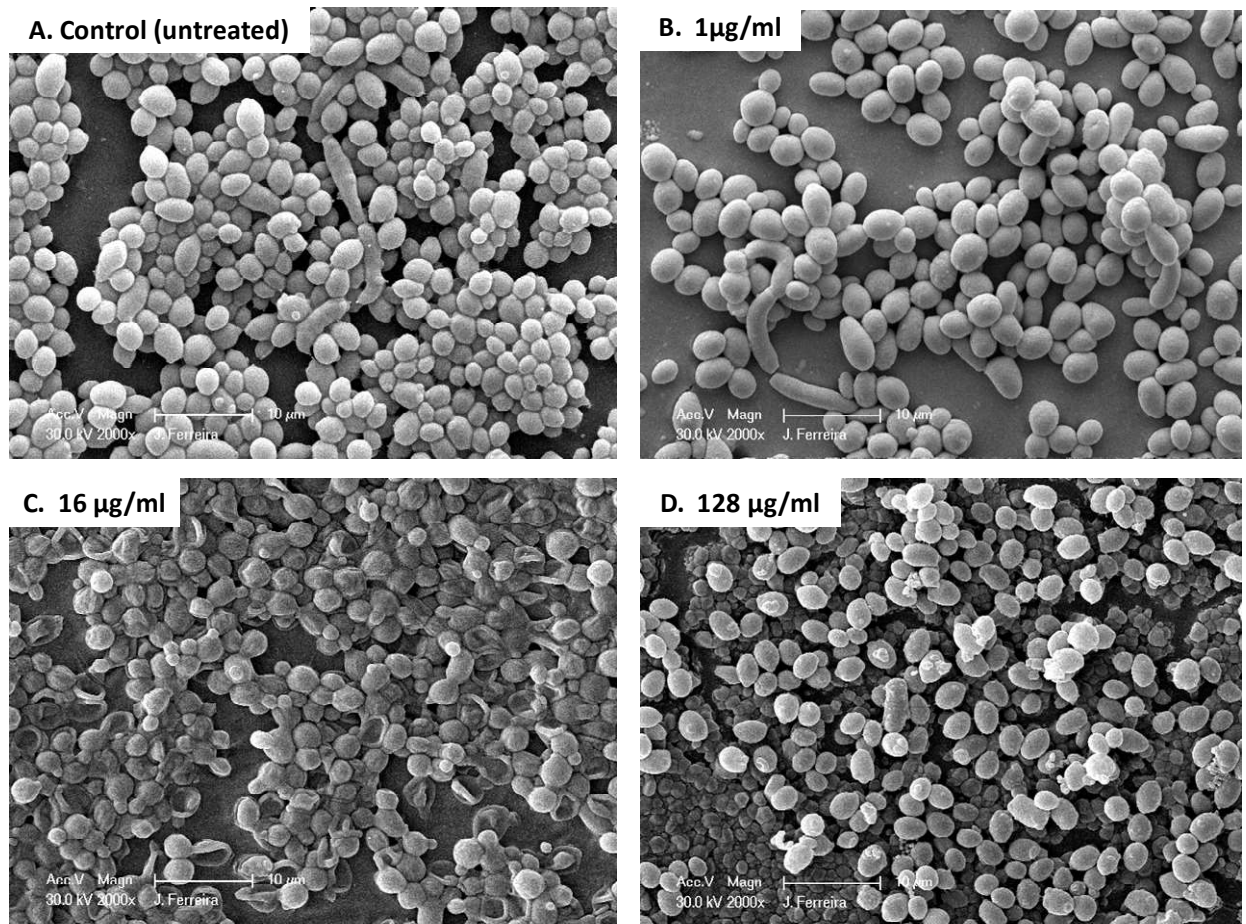


Figura 20. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biofilmes formados por *Candida parapsilosis*, em discos de silicone, após exposição a diferentes concentrações de CAS. Biofilmes foram formados por 48 h em meio RPMI 1640. (A) Biofilme de *C. parapsilosis* sem exposição à droga (controle). (B) Biofilme de *C. parapsilosis* após exposição de 1 µg/ ml. (C) Biofilme de *C. parapsilosis* após exposição de 16 µg/ ml. (D) Biofilme de *C. parapsilosis* após exposição de 128 µg/ ml. As imagens são representativas dos campos visualizados. Barras, 10 µm.

Neste estudo foram avaliados 168 episódios de candidemia. Segundo os dados analisados, 69%, dos episódios ocorreram na UTI. Porém, sabe-se que a disponibilidade de leitos de UTI é pequena e muitos dos pacientes internados em enfermarias, pela gravidade do seu quadro clínico, provavelmente deveriam estar alocados na UTI.

A magnitude da ocorrência dos fungos como patógenos de infecções sistêmicas tem sido bem documentada, embora ainda seja recente a valorização de seu papel entre as infecções de corrente circulatória de pacientes hospitalizados. Ao lado do aumento da frequência com que estes microrganismos são identificados como agentes etiológicos, vários autores têm reportado aumento no espectro de espécies de leveduras do gênero *Candida* refratárias ao tratamento com agentes antifúngicos (SINGH, 2001; EGGIMANN *et al.* 2003; PFALLER & DIEKEMA, 2007; COLOMBO *et al.*, 2008).

As leveduras do gênero *Candida* têm grande importância pela alta frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano. Espécies de *Candida* são encontradas no tubo gastrointestinal em 20 a 80% da população adulta saudável. Estes microorganismos comensais tornam-se patogênicos caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou o comprometimento de barreiras anatômicas secundariamente a queimadura ou a 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 às doenças degenerativas, neoplásicas, imunodeficiências congênitas ou adquiridas e imunodepressão induzida por atos médicos (DIGNANI *et al.*, 2003).

A sepse é a principal causa de óbito em pacientes internados e gravemente doentes. Houve um aumento de 164.000 para 660.000 casos anuais de sepse nos Estados Unidos, sendo que a taxa decorrente das infecções provocadas por fungo cresceu 207% no período entre 1979 e 2000 (MARTIN *et al.*, 2003). A frequência de infecções hematogênicas por *Candida* (candidemia) tem aumentado consideravelmente, especialmente em unidades de terapia intensiva e/ou de assistência a pacientes críticos. Dentre estas infecções, *Candida albicans* é considerada a espécie de *Candida* mais prevalente. No entanto, estudos indicam um aumento das infecções provocadas por espécies não-*albicans* (KRCMERY & BARNES, 2002; MORGAN, 2005; COLOMBO *et al.* 2008).

É importante observar que além da alta incidência de candidemia nos hospitais terciários, esta complicação infecciosa apresenta índices de mortalidade geral de 60%, mortalidade

atribuída de cerca de 40% (WEY *et al.*, 1988; WENZEL, 1995; EGGIMANN *et al.*, 2003; BILLE *et al.*, 2005) e representa um importante aumento nos custos assistenciais, da ordem de US\$ 44.536 por caso (RENTZ *et al.*, 1998). Este panorama justifica a importância do conhecimento epidemiológico por parte dos profissionais de saúde e das medidas necessárias para o diagnóstico, controle e tratamento de infecções invasivas por *Candida* spp. (COLOMBO *et al.*, 2008).

No Brasil, o conhecimento sobre a epidemiologia dos quadros de candidemia em hospitais terciários tem aumentado de forma considerável nos últimos anos (NUCCI *et al.*, 1998; COLOMBO *et al.*, 1999; ANTUNES *et al.*, 2004; BARBERINO *et al.*, 2006; COLOMBO *et al.*, 2006; BRITO *et al.*, 2006; PASQUALOTTO *et al.*, 2007; PASSOS *et al.*, 2007). Esta realidade reflete o maior interesse da classe médica e científica neste tema, uma vez que, na atualidade, como em outros centros do mundo, uma grande parte da população atendida em hospitais brasileiros é caracterizada por pacientes gravemente enfermos. Entretanto, o perfil epidemiológico das candidemias em hospitais do estado de Minas Gerais ainda se caracteriza como um campo pouco explorado, limitando-se a relatos de casos e pequenas casuísticas restritas a alguns centros médicos isolados.

Neste cenário, o presente estudo caracteriza-se como um projeto pioneiro em que os quadros de candidemias hospitalares diagnosticados em quatro hospitais terciários na capital do estado, Belo Horizonte, foram registrados de forma prospectiva e analisados epidemiologicamente. Paralelamente, estudos microbiológicos foram realizados com o objetivo de disponibilizar informações sobre o perfil de resistência dos isolados de *Candida* spp. a cinco drogas antifúngicas.

Os resultados apresentados no presente trabalho confirmaram os relatos descritos previamente por outros centros brasileiros (ANTUNES *et al.*, 2004; AQUINO *et al.*, 2005; COLOMBO *et al.*, 2006; CHANG *et al.*, 2008). *Candida* spp. foi o sexto agente etiológico mais isolado em hemoculturas nos quatro hospitais estudados. As espécies não-*albicans* representaram 55% dos 168 casos registrados durante os cinco anos de vigilância. *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* reponderam por mais de 80% das infecções causadas por espécies não-*albicans*, resultado este que confirma a relevância destas espécies em hospitais brasileiros. Porém, este resultado contrasta com relatos de maior ocorrência de *Candida glabrata* em trabalhos americanos e europeus (SANDVEN, 2000; COLOMBO *et al.*, 2008).

A mortalidade global neste estudo foi de 50%, sendo que as infecções provocadas por *C. albicans* foram estatisticamente relacionadas a um maior risco de evolução ao óbito. Os dados obtidos neste estudo ainda demonstram que, nos hospitais estudados, a candidemia foi uma

complicação infecciosa encontrada em pacientes portadores de doenças hematológicas, neutropênicos, com um score de gravidade elevado (APACHE II score >20), e naqueles submetidos a procedimentos invasivos.

A resistência das espécies de *Candida* frente aos antifúngicos testados foi considerada baixa, incluindo-se os resultados obtidos para o fluconazol. Entre as espécies não-*albicans*, este estudo confirmou que grande parte dos problemas evidenciados com a resistência ao fluconazol e ao itraconazol estiveram relacionados com as espécies *C. krusei* e *C. glabrata*. Estes achados confirmaram estudos prévios onde *C. krusei* foi reconhecida como naturalmente resistente ao fluconazol e cerca de 10% das amostras de *C. glabrata* recuperadas no sangue também se apresentaram resistentes a esta droga (PFALLER *et al.*, 2000; OSTROSKY-ZEICHNER *et al.*, 2003; PFALLER *et al.*, 2004).

As peculiaridades apresentadas por diferentes espécies de *Candida* spp. neste estudo, do ponto de vista epidemiológico e terapêutico, justificam a necessidade de se identificar as leveduras no nível de espécie quando tais microorganismos estão associados às doenças sistêmicas. Para tanto, a sensibilização dos profissionais envolvidos diretamente no diagnóstico clínico e laboratorial nos hospitais estudados faz-se fundamental a fim de permitir a escolha das melhores estratégias de prevenção e opções terapêuticas a serem instituídas em pacientes infectados. Ressalte-se, ainda, que os dados de susceptibilidade *in vitro* deste estudo devem ser avaliados em conjunto com as características clínicas apresentadas pelos pacientes candidêmicos (KRCMERY & BARNES, 2002; BILLE *et al.*, 2005).

Na segunda parte deste estudo, realizado em colaboração com o Dr. Rodney Donlan, do Laboratório de Biofilmes do CDC, EUA, modelos experimentais foram desenvolvidos objetivando avaliar, em um primeiro momento, o efeito dos biofilmes bacterianos pré-formados no processo de colonização e formação de biofilmes por espécies de *Candida* em CVCs e, em um segundo momento, avaliar a atividade da CAS e AMB sobre biofilmes fúngicos. Adicionalmente, estes experimentos visaram um treinamento nas diferentes técnicas laboratoriais de estudos *in vitro* dos biofilmes microbianos, área esta ainda incipiente no Brasil.

As infecções associadas à utilização de implantes médicos invasivos estão relacionadas com a formação de biofilmes nesses dispositivos (DONLAN, 2001). As células microbianas podem invadir os tecidos em contacto com o dispositivo ou ser libertadas na corrente sanguínea, causando infecção. O desenvolvimento do biofilme depende do tipo e do número de células que aderem ao dispositivo, da natureza físico-química da superfície e do meio ou fluidos na qual os microorganismos estão expostos (DONLAN & COSTERTON, 2002).

Os biofilmes que se formam na superfície do CVCs podem ser constituídos por bactérias Gram positivas (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*), Gram negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) ou fungos, sendo que muitas vezes estes biofilmes podem também ser polimicrobianos (DONLAN, 2001; MERMEL *et al.* 2001; KOJIC & DAROUICHE, 2004). Na perspectiva do controle de infecções hospitalares, estes microrganismos podem ser provenientes da pele dos pacientes colonizados, das mãos dos profissionais de saúde, da água da torneira ou de outras fontes ambientais (DONLAN, 2001).

O presente trabalho objetivou também ilustrar as diferentes interações entre bactérias e leveduras em biofilmes polimicrobianos através de um modelo laboratorial para infecções em CVC. Diversos conceitos relacionados à natureza da associação entre bactéria-*Candida* em biofilmes e os possíveis fatores regulatórios interespecies ainda necessitam ser elucidados, tornando, desta forma, os resultados deste estudo pertinentes ao cenário científico internacional. Através de modificações no protocolo para uso do dispositivo mDFR tentou-se reproduzir *in vitro* condições fisiológicas a fim de correlacionar os resultados obtidos no presente estudo com as situações vivenciadas na prática clínica. A escolha das espécies bacterianas *P. aeruginosa* e *S. epidermidis* foi baseada na relevância destes microrganismos como agentes etiológicos das infecções relacionadas ao uso de CVCs (MERMEL *et al.*, 2001; RAAD & HANNA, 2002).

Os resultados deste trabalho essencialmente apontaram que os biofilmes formados por *C. albicans* e *C. tropicalis* foram significativamente influenciados pela presença de biofilmes pré-formados de *P. aeruginosa* e *S. epidermidis*. Por outro lado, os biofilmes formados por *C. parapsilosis* não apresentaram importantes mudanças na presença de células sésseis bacterianas. Apesar da limitada disponibilidade de informações científicas envolvendo o estudo de biofilmes polimicrobianos e leveduras do gênero *Candida*, os resultados obtidos estão de acordo com estudos previamente publicados onde a atividade inibitória de *P. aeruginosa* sobre o processo de formação de biofilmes por *C. albicans* foi evidenciado (KERR ET al., 1999; HOGAN & KOLTER, 2002; WARGO & HOGAN, 2006). Interessantemente, os resultados observados através das análises de MEV, somados aos dados obtidos nos experimentos de coagregação e da avaliação do efeito de sobrenadantes obtidos a partir de biofilmes bacterianos sobre a formação de biofilmes fúngicos indicaram que, neste modelo experimental, a natureza da inibição provocada por *P. aeruginosa* estava associada não somente com a presença física do biofilme bacteriano, mas também com a produção tempo-dependente de substâncias inibitórias presentes no sobrenadante das culturas. Pode-se especular, baseado em estudos publicados que possíveis moléculas envolvidas na sinalização entre células, como por exemplo “Quorum-sensing”, possam desempenhar um papel fundamental na regulação dos biofilmes formados por algumas

espécies de *Candida* e *P. aeruginosa* (KERR *et al.*, 1999; WARGO & HOGAN, 2006; GIBSON *et al.*, 2009). Em relação aos biofilmes formados por *Candida* spp. e *S. epidermidis*, uma variação significativa foi observada em *C. albicans* na presença de biofilmes bacterianos, o mesmo não sendo evidenciado para as outras espécies não-*albicans*. Estes resultados sugerem uma adaptação destas espécies na presença de *S. epidermidis* em biofilmes polimicrobianos. Estudos de MEV forneceram informações adicionais para as conclusões deste estudo.

Também foi avaliada a eficácia de duas importantes drogas antifúngicas, usualmente utilizadas no tratamento de quadros de candidemia, sobre biofilmes formados por espécies de *Candida*. As bases teóricas para este experimento foram obtidas de diversos relatos da literatura, como o publicado por Kuhn e colaboradores (2002) que descreveram a boa atividade da CAS e das formulações lipídicas de AMB na inibição da formação de biofilmes fúngicos. Outros relatos confirmaram esta atividade diferenciada contra os biofilmes fúngicos (MUKHERJEE & CHANDRA, 2004). Adicionalmente, em se tratando especificamente da CAS e das outras equinocandinas, a potente atividade *in vitro* sobre biofilmes foi confirmada por diferentes grupos, apesar das diferenças dos métodos experimentais utilizados (BACHMANN *et al.*, 2002; SHUFORD *et al.*, 2006; MELO *et al.*, 2007; CATEAU *et al.*, 2008).

No presente trabalho discos de silicone foram utilizados como substrato para a formação de biofilmes por espécies de *Candida*. Esses discos foram imersos em soro humano por 24 horas com o objetivo de reproduzir condições fisiológicas (KUHN *et al.*, 2002). Diferentes concentrações das drogas foram utilizadas, sendo as diluições preparadas de acordo com o preconizado pelo CLSI (2002). O ensaio de redução do sal XTT-tetrazolium foi utilizado para monitorar a atividade metabólica das células sésseis durante a formação dos biofilmes na presença das drogas (HAWSER *et al.*, 1998; JIN *et al.*, 2003). Este teste vem sendo sugerido como a metodologia padrão para a avaliação da sensibilidade *in vitro* dos biofilmes fúngicos por apresentar uma boa correlação com os valores obtidos para a concentração inibitória mínima (CIM) através da metodologia do CLSI para células planctônicas (HAWSER *et al.*, 1998). Paralelamente, os resultados obtidos nos teste de susceptibilidade para biofilmes foram comparados ao perfil de sensibilidade das células planctônicas e análises de MEV.

Os resultados obtidos nos experimentos com AMB mostraram um perfil de susceptibilidade muito próximo entre células planctônicas e biofilmes formados por *C. albicans* e *C. tropicalis*. Porém, na presença de CAS, esses biofilmes apresentaram um valor de CIM superior quando comparado com os obtidos para as células planctônicas. Para *C. parapsilosis* a formação biofilmes foi relacionada com um aumento significativo nos valores obtidos de CIM. A exposição à CAS foi relacionada a um aumento dos valores de CIM quando comparados com

as células planctônicas. Este perfil diferenciado de susceptibilidade dos biofilmes formados por *C. parapsilosis* à CAS está em concordância com outros resultados previamente publicados (KUHN *et al.*, 2004; MELO *et al.*, 2007).

Este estudo também confirmou o crescimento paradoxal das espécies *C. albicans* e *C. tropicalis* na presença de altas concentrações de CAS. Esses achados foram confirmados por MEV e estiveram relacionados com importantes variações na morfologia celular das leveduras nos biofilmes. Interessantemente, estudos complementares visando avaliar o número de células viáveis nos biofilmes confirmaram este fenômeno. O efeito paradoxal frente à exposição de células planctônica de *C. albicans* à CAS tem sido relatado na literatura (STEVENS *et al.*, 2004; STEVENS *et al.*, 2006; WIEDERHOLD, 2007). Este mesmo efeito foi também recentemente confirmado em biofilmes formado por diferentes espécies de *Candida* (MELO *et al.*, 2007; KATRAGKOU *et al.*, 2008). Os resultados obtidos neste estudo, a partir das análises de MEV, geraram um conhecimento adicional sobre a relação droga/morfologia do biofilme produzido por espécies de *Candida*, abrindo novas perspectivas de estudos no sentido de correlacionar os efeitos observados no crescimento paradoxal com possíveis variações genotípicas. A aplicação clínica dos achados *in vitro* ainda é questionável, porém, uma importante limitação do uso da CAS como alternativa na terapia intraluminal ou instilação local de antimicrobianos na luz do cateter (“antibiotic lock therapy”) pode ser vislumbrada. Novos estudos *in vivo* serão necessários para a elucidação deste efeito.

Por último, mas não menos importante, deve-se ressaltar o cuidado necessário ao debate dos resultados deste projeto. Os dados gerados nos estudos sobre a epidemiologia dos quadros de candidemia nos hospitais de Belo Horizonte e as observações feitas nos estudos laboratoriais de biofilmes fúngicos devem ser considerados dentro do contexto clínico, epidemiológico e científico, como informações adicionais na abordagem preventiva e terapêutica das infecções provocadas por leveduras do gênero *Candida*.

7. CONCLUSÃO

- *Candida* spp. foi o sexto agente etiológico em importância nas infecções de corrente sanguínea nos hospitais avaliados.
- Os quadros de candidemia foram associados à presença de doenças hematológicas, neutropenia, APACHE II >20, falência renal aguda e uso de CVC.
- A mortalidade global dos quadros de candidemia foi elevada (50%), sendo as infecções causadas por *C. albicans* associadas a um pior prognóstico.
- A resistência às drogas antifúngicas foi um fenômeno infrequente nos hospitais estudados.
- A presença de *P. aeruginosa* em biofilmes pré-formados em CVC foi relacionada com a inibição da formação de biofilmes por *C. albicans* e *C. tropicalis*, sendo esta inibição associada à presença física de células sésseis bacterianas, bem como, pela produção tempo-dependente de substâncias inibitórias.
- A presença de biofilmes pré-formados de *S. epidermidis* foi relacionada com a inibição de formação de biofilmes por *C. albicans*. Entretanto este efeito não foi evidenciado para as outras espécies não-*albicans* testadas.
- *Candida parapsilosis* apresentou uma capacidade diferenciada de crescer em biofilmes polimicrobianos, confirmando a melhor adaptação desta espécie nas infecções relacionadas aos biofilmes.
- Os antifúngicos CAS e AMB apresentaram um bom perfil de atividade frente aos biofilmes formados por *C. albicans* e *C. tropicalis*. Entretanto, a atividade destas drogas sobre células sésseis de *C. parapsilosis* foi variável.
- O crescimento paradoxal foi evidenciado nos biofilmes formados por *C. albicans* e *C. tropicalis* após exposição a altas concentrações de CAS, sendo este fenômeno relacionado com importantes alterações estruturais e morfológicas nos biofilmes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abi-Said, D., E. Anaissie, O. Lzun, I. Raad, H. Pinzcowski, and S. Vartivarian. 1997. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. **Clin. Infect. Dis.** 24: 1122-1128.
- Adam, B., G.S. Baillie, and L. J. Douglas. 2002. Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. **J. Med. Microbiol.** 51:344-349.
- Almirante, B., D. Rodríguez, B. J. Park, M. Cuenca-Estrella, A. M. Planes, M. Almela, J. Mensa, F. Sanchez, J. Ayats, M. Gimenez, P. Saballs, S. K. Fridkin, J. Morgan, J. L. Rodriguez-Tudela, D. W. Warnock, and A. Pahissa. 2005. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **J. Clin. Microbiol.** 43:1829–1835.
- Anaissie E, G. Samonis, D. Kontoyiannis, J. Costerton, U. Sabharwal, G. Bodey, and I. Raad. 1995. Role of catheter colonization and infrequent hematogenous seeding in catheter-related infections. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 14:134-137.
- Andes, D., J. Nett, P. Oschel, R. Albrecht, K. Marchillo, and A. Pitula. 2004. Development and characterization of an in vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. **Infect. Immun.** 72: 6023–6031.
- Antoniadou, A., H.A., R. E. Lewis, J. Thornby, G. P. Bodey, J. P. Tarrand, X Y. Han, K. V. Rolston, A. Safdar, I. I. Raad, and D. P. Kontoyiannis. 2003. Candidemia in a tertiary care cancer center: in vitro susceptibility and its association with outcome of initial antifungal therapy. **Medicine.** 82: 309-321.
- Antunes, A.G.V., A. C. Pasqualotto, M. C. Diaz, P. A. d'Azevedo, and L. C. Severo. 2004. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: Species distribution and susceptibility patterns. **Rev. Inst. Med. Trop.** 46: 239-241.
- Aquino, V.R., L. W. Lunardi, L. Z. Goldani, and A. L. Barth. 2005. Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in southern Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.** 9: 411-418.
- Bachmann, S.P., K. VandeWalle, G. Ramage, T.F. Patterson, B.L. Wickes, J.R. Graybill, and J.L. López-Ribot. 2002. In vitro activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. **Antimicrob. Agents Chemother.** 46: 3591-3596
- Baillie, G.S. and L.J. Douglas. 1998. Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. **Antimicrob. Agents Chemother.** 42: 1900-1905.
- Baillie, G.S. and L.J. Douglas. 1999. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. **J. Med. Microbiol.** 48: 671-679.

Baillie, G.S. and L.J. Douglas. 2000. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. **J. Antimicrob. Chemother.** 46: 397-403.

Banerjee, S.N., T.G. Emori, D.H. Culver, R.P. Gaynes, W.R. Jarvis, T. Horan, J.R. Edwards, J. Tolson, T. Henderson, and W. J. Martone. 1991. Secular trends in nosocomial primary blood-stream infections in the United-States, 1980–1989. **Am. J. Med.** 91: S86–S89.

Barberino, M.G., N. Silva, C. Rebouças, K. Barreiro, A. P. Alcântara, E. M. Netto, L. Albuquerque, and C. Brites. 2006. Evaluation of blood stream infections by *Candida* in three tertiary hospitals in Salvador, Brazil: a case-control study. **Braz J. Infect. Dis.** 10: 36-40.

Banerjee, S.N., T.G. Emori, D.H. Culver, R.P. Gaynes, W.R. Jarvis, and T. Horan. 1991. Secular trends in nosocomial primary blood stream infections in the United States. **Am. J. Med.** 91:86S-89S.

Barchiesi, F., D. Arzeni, F. Caselli, and G. Scalise. 2000. Primary resistance to flucytosine among clinical isolates of *Candida* spp. **J. Antimicrob. Chemother.** 45: 408-409.

Beck-Sagué, C. and W.R. Jarvis. 1993. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. **J. Infect. Dis.** 167:1247-1251.

Bedini, A., C. Venturelli, C. Mussini, G. Guaraldi, M. Codeluppi, V. Borghi, F. Rumpianesi, F. Barchiesi, and R. Esposito. 2006. Epidemiology of candidaemia and antifungal susceptibility patterns in an Italian tertiary-care hospital. **Clin. Microbiol. Infect.** 12: 75-80.

Bille, J., O. Marchetti., and T. Calandra. 2005. Changing face of health-care associated fungal infections. **Curr. Opin. Infect. Dis.** 18: 314–319.

Blankenship, J.R., and A. P. Mitchell. 2006. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Cur Opin Microbiol.** 9: 588–594

Blot, S., K. Vandewoude, E. Hoste, J. Poelaert, and F. Colardyn. 2001. Outcome in critically ill patients with candidal fungaemia: *Candida albicans* vs. *Candida glabrata*. **J. Hosp. Infect.** 47: 308-313.

Bodey, G.P., M. Mardani, H. A. Hanna, M. Boktour, J. Abbas, E. Girgawy, R. Y. Hachem, D. P. Kontoyiannis, and I. I. Raad. 2002. The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* fungemia in immunocompromised patients with cancer. **Am. J. Med.** 112: 380–385.

Brito, L.R., T. Guimarães, M. Nucci, R.C. Rosas, L. Paula Almeida, D.A. Da Matta, and A.L. Colombo. 2006. Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *Candida parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. **Med. Mycol.** 44: 261-266.

Chang, M.R., F.P. Correia, L.C. Costa, P.C. Xavier, D.B. Palhares, D.L. Taira, A.M. Paniago, E.R. Pontes, and V.E. Machado. 2008. *Candida* bloodstream infection: data from a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.** 50: 265-268.

Christensen, G.D., W.A. Simpson, J.J. Younger, L.M. Baddour, F.F. Barrett, D.M. Melton, and E.H. Beachey. 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a

- quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. **J. Clin. Microbiol.** 22:996-1006.
- Calderone, R.A. 2002. Introduction and historical perspectives. In: *Candida and Candidiasis*, ed. RA Calderone, pp. 3–13. Washington, DC: ASM Press
- Carratala, J. 2002. The antibiotic-lock technique for therapy of ‘highly needed’ infected catheters. **Clin. Microbiol. Infect.** 8: 282–289.
- Cateau, E., M.H. Rodier, and C. Imbert. 2008. In vitro efficacies of caspofungin or micafungin catheter lock solutions on *Candida albicans* biofilm growth. **J. Antimicrob. Chemother.** 62: 153-155.
- Chandra, J., P. K. Mukherjee, S. D. Leidich, F. F. Faddoul, L. L. Hoyer, L. J. Douglas, and M. A. Ghannoum. 2001. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. **J. Dent. Res.** 80:903–908.
- Clark, T. A., S. A. Slavinski, J. Morgan, T. Lott, B. A. Arthington-Skaggs, M. E. Brandt, R. M. Webb, M. Currier, R. H. Flowers, S. K. Fridkin, and R. A. Hajjeh. 2004. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. **J. Clin. Microbiol.** 42: 4468–4472.
- Cocuaud, C., M.H. Rodier, G. Daniault, and C. Imbert. 2005. Anti-metabolic activity of caspofungin against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. **J. Antimicrob. Chemother.** 56: 507-512
- Colombo, A.L., M. Nucci, R. Salomão, M.L. Branchini, R. Richtmann, A. Derossi, and S.B. Wey. 1999. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 34: 281-286.
- Colombo, A. L., Z. Nakagawa, F. Valdetaro, M. L. Branchini, E. J. Kussano, and M. Nucci. 2003. Susceptibility profile of 200 bloodstream isolates of *Candida* spp. collected from Brazilian tertiary care hospitals. **Med. Mycol.** 41: 235-239.
- Colombo, A.L., A.S. Melo, R.F. Crespo Rosas, R. Salomão, M. Briones, R.J. Hollis, S.A. Messer, and M.A. Pfaller. 2003. Outbreak of *Candida rugosa* candidemia: an emerging pathogen that may be refractory to amphotericin B therapy. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 46: 253-257.
- Colombo, A.L., M. Nucci, B. J. Park, S. A. Nouer, B. Arthington-Skaggs, D. A. da Matta, D. W. Warnock, and J. Morgan. 2006. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **J. Clin. Microbiol.** 44: 2816-2823.
- Colombo, A.L., T. Guimarães, L. R. Silva, L. P. de Almeida Monfardini, A. K. Cunha, P. Rady, T. Alves, and R. C. Rosas. 2007. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.** 28: 570-576.
- Colombo, A.L., L. Thompson, and J.R. Graybill. 2008. The north and south of candidemia: Issues for Latin America. **Drugs Today.** 44 Suppl A:1-34.

- Crump, J.A., and P.J. Collignon. 2000. Intravascular catheter-associated infections. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 19:1-8.
- Cuenca-Estrella, M., L. Rodero, G. Garcia-Effron, and J. L. Rodriguez-Tudela. 2002. Antifungal susceptibilities of *Candida* spp. isolated from blood in Spain and Argentina, 1996-1999. **J. Antimicrob. Chemother.** 49: 981-987.
- Cugini, C., M.W. Calfee, J.M. Farrow 3rd, D.K. Morales, E.C. Pesci, and D.A. Hogan. 2007. Farnesol, a common sesquiterpene, inhibits PQS production in *Pseudomonas aeruginosa*. **Mol. Microbiol.** 65:896-906
- Denning, D. W. 2002. "Echinocandins: a new class of antifungal", **J. Antimicrob. Chemother.** 49:889-891.
- Diekema, D.J., S. A. Messer, A. B. Brueggemann, S. L. Coffman, G. V. Doern, L. A. Herwaldt, and M. A. Pfaller. 2002. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. **J. Clin. Microbiol.** 40: 1298–1302.
- Dimick, J.B., R.K. Pelz, R. Consunji, S.M. Swoboda, C.W. Hendrix, and P.A. Lipsett. 2001. Increased resource use associated with catheterrelated bloodstream infection in the surgical intensive care unit. **Arch. Surg.** 136:229-234
- Dignani, M.C., J.S. Solomkin, and E. Anaissie. 2003. *Candida*. In: Anaissie E, McGinnis MR, Pfaller MA (eds) **Medical Mycology**. 1ª Edição, Churchill Livingstone, Filadélfia, p. 195-239.
- Donlan, R.M. 2001. Biofilms and device-associated infections. **Emerg. Infect. Dis.** 7: 277–281
- Donlan, R.M. and J.W. Costerton. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.** 15: 167–193
- Donlan, R.M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg. Infect. Dis.** 8: 881-890
- Douglas, L.J. 2002. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. **Rev. Iberoam. Micol.** 19:139-143.
- Downes, K.J., J.P. Metlay, L.M. Bell, K.L. McGowan, M.R. Elliott, and S.S. Shah. 2008. Polymicrobial bloodstream infections among children and adolescents with central venous catheters evaluated in ambulatory care. **Clin. Infect. Dis.** 46: 387-394.
- Edmond, M.B., S.E. Wallace, D.K. McClish, M.A. Pfaller, R.N. Jones, and R.P. Wenzel. 1999. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. **Clin. Infect. Dis.** 29: 239-244.
- Eggimann, P., J. Garbino, and D. Pittet. 2003. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **Lancet Infect. Dis.** 3:685-702.
- El-Azizi, M.A., S.E. Starks, and N. Khardori. 2004. Interactions of *Candida albicans* with other *Candida* spp. and bacteria in the biofilms. **J. Appl. Microbiol.** 96: 1067-1073.
- Fraenkel, D.J., C. Rickard, and J. Lipman. 2000. Can we achieve consensus on central venous catheter-related infections? **Anaesth. Intensive Care.** 28:475-490

- Fridkin, S.K., R. P. Gaynes. 1999. Antimicrobial resistance in intensive care units. **Clin. Chest Med.** 20:303-316
- Fridkin, S.K. and W.R. Jarvis. 1996. Epidemiology of nosocomial fungal infections. **Clin. Microbiol. Rev.** 9:499-511.
- Gardiner, R.E., P. Souteropoulos, S. Park, and D.S. Perlin. 2005. Characterization of *Aspergillus fumigatus* mutants with reduced susceptibility to caspofungin. **Med. Mycol.** 43 (Suppl 1):S299–S305.
- Garner, J.S., W.R. Jarvis, T.G. Emori, T.C. Horan, and J.M. Hughes. 1996. CDC definitions for nosocomial infections. In: Olmsted RN, Ed. **APIC Infection control and applied epidemiology: principles and practice.** St. Louis: Mosby: A1-A20.
- Georgopapadaku, N. H. 2001. “Update on antifungals targeted to the cell wall: focus on beta-1,3-glucan synthase inhibitors”, **Expert. Opin. Investig. Drug.** 10: 269–280.
- Gibson, J., A. Sood, and D.A. Hogan. 2009 *Pseudomonas aeruginosa-Candida albicans* interactions: localization and fungal toxicity of a phenazine derivative. **Appl. Environ. Microbiol.**75: 504-13
- Girão, E., A.S. Levin, M. Basso, S. Gobara, L.B. Gomes, E.A. Medeiros, and S.F. Costa. 2008. Seven-year trend analysis of nosocomial candidemia and antifungal (fluconazole and caspofungin) use in Intensive Care Units at a Brazilian University Hospital. **Med. Mycol.** 10:1-8.
- Grillot, R., V. Portmann-Coffin, and P. Ambroise-Thomas. 1994. Growth inhibition of pathogenic yeasts by *Pseudomonas aeruginosa* in vitro: clinical implications in blood cultures. **Mycoses.** 37:343–347.
- Gudlaugsson, O., S. Gillespie, K. Lee, J. Vande Berg, J. Hu, S. Messer, L. Herwaldt, M.A. Pfaller, and D. Diekema. 2003. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. **Clin. Infect. Dis.** 37: 1172–1177
- Hajjeh, R. A., A. N. Sofair, L. H. Harrison, G. M. Lyon, B. A. Arthington-Skaggs, S. A. Mirza, M. Phelan, J. Morgan, W. Lee-Yang, M. A. Ciblak, L. E. Benjamin, L. Thomson Sanza, S. Huie, S. F. Yeo, M. E. Brandt, and D. W. Warnock. 2004. Incidence of blood stream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. **J. Clin. Microbiol.** 42: 1519–1527.
- Hawser, S.P., and L.J. Douglas. 1995. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in-vitro. **Antimicrob. Agents. Chemother.** 39: 2128–2131.
- Hawser, S. P., H. Norris, C. J. Jessup and M. A. Ghannoum. 1998. Comparison of a 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]- 2H-tetrazolium hydroxide (XTT) colorimetric method with the standardized National Committee for Clinical Laboratory Standards method of testing clinical yeast isolates for susceptibility to antifungal agents. **J. Clin. Microbiol.** 36: 1450–1452.
- Hobson, R.P. 2003. The global epidemiology of invasive *Candida infections*- is the tide turning? **J. Hosp. Infect.** 55: 159–168

- Hogan, D.A. and R. Kolter. 2002. *Pseudomonas-Candida* interactions: an ecological role for virulence factors. **Science**. 296: 2229-2232.
- Hogan, D.A., A. Vik, and R. Kolter. 2004. A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. **Mol. Microbiol.** 54:1212-1223.
- Hogan, D.A. 2006. Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. **Eukaryot. Cell**. 5: 613-619.
- Hsu, L.Y., G.E. Minah, D.E. Peterson, J.R. Wingard, W.G. Merz, V. Altomonte, and C.A. Tylenda. 1990. Coaggregation of oral *Candida* isolates with bacteria from bone marrow transplant recipients. **J. Clin. Microbiol.** 28: 2621-6.
- Jin, Y., H. K. Yip, Y. H. Samaranyake, J. Y. Yau, and L. P. Samaranyake. 2003. Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. **J. Clin. Microbiol.** 41: 2961–2967.
- Kaleli, I., N. Cevahir, M. Demir, U. Yildirim, and R. Sahin. 2007. Anticandidal activity of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical specimens. **Mycoses**. 50: 74-78.
- Katragkou, A., A. Chatzimoschou, M. Simitsopoulou, M. Dalakiouridou, E. Diza-Mataftsi, C. Tsantali, and E. Roilides. 2008. Differential activities of newer antifungal agents against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. **Antimicrob. Agents Chemother.** 52: 357-360.
- Kauffman, C.A., and P.L. Carver. 2008. Update on echinocandin antifungals. **Semin. Respir. Crit. Care Med.** 29: 211-219
- Krcmery V., and A. J. Barnes. 2002. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **J. Hosp. Infect.** 50: 243-260
- Kennedy, M.J. and P.A. Volz. 1985. Effect of various antibiotics on gastrointestinal colonization and dissemination by *Candida albicans*. **Sabouraudia**. 23: 265-73.
- Keren, I., D. Shah, A. Spoering, N. Kaldalu, and K. Lewis. 2004. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 186: 8172–8180.
- Kerr, J.R. 1994. Suppression of fungal growth exhibited by *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Clin. Microbiol.** 32: 525-527.
- Kerr, J.R., G.W. Taylor, A. Rutman, N. Høiby, P.J. Cole, and R. Wilson. 1999. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth. **J. Clin. Pathol.** 52: 385-387.
- Kiani, D., E.L. Quinn, K.H. Burch, T. Madhavan, L.D. Saravolatz, and T.R. Neblett. 1979. The increasing importance of polymicrobial bacteremia. **JAMA**. 242: 1044-1047.
- Kim, R., D. Khachikia, and A. C. Reboli. 2007. A comparative evaluation of properties and clinical efficacy of the echinocandins. **Expert. Opin. Pharmacother.** 8: 1479-1492

- Klotz, S.A., B.S. Chasin, B. Powell, N.K. Gaur, and P.N. Lipke. 2007. Polymicrobial bloodstream infections involving *Candida* species: analysis of patients and review of the literature. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 59:401-406.
- Kojic, E.M., and R.O. Darouiche. 2004. *Candida* infections of medical devices. **Clin. Microbiol. Rev.** 17: 255-267.
- Kuhn, D. M., T. George, J. Chandra, P. K. Mukherjee, and M. A. Ghannoum. 2002. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. **Antimicrob. Agents Chemother.** 46:1773–1780.
- Kuhn, D.M., J. Chandra, P.K. Mukherjee, and M.A. Ghannoum. 2002. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. **Infect. Immun.** 70: 878-88.
- Kuhn, D. M., and M. A. Ghannoum. 2004. *Candida* biofilms: antifungal resistance and emerging therapeutic options. **Curr. Opin. Investig. Drugs.** 5: 186–197
- Kumamoto, C. A. 2002. *Candida* biofilms. **Curr. Opin. Microbiol.** 5:608–611.
- Kumamoto, C.A. 2008. Molecular mechanisms of mechanosensing and their roles in fungal contact sensing. **Nat. Rev. Microbiol.** 6: 667-673
- Kuramitsu, H.K., X. He, R. Lux, M.H. Anderson, and W. Shi. 2007. Interspecies interactions within oral microbial communities. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 71: 653-670.
- Lafleur, M., C. Kumamoto, and K. Lewis. 2006. *Candida albicans* produce antifungal- tolerant persisters cells. **Antimicrob. Agents Chemother.** 50: 3839–3846
- Lagrou, K., J. Verhaegen, W. E. Peetermans, T. De Rijdt, J. Maertens, and E. Van Wijngaerden. 2007. Fungemia at a tertiary care hospital: incidence, therapy, and distribution and antifungal susceptibility of causative species. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 26: 541-547.
- Levin, A.S., S.F. Costa, N.S. Mussi, M. Basso, S.I. Sinto, C. Machado, D.G. Geiger, M.C. Villares, A.Z. Schreiber, A.A. Barone, and M.L. Branchini. 1998. *Candida parapsilosis* fungemia associated with implantable and semi-implantable central venous catheters and the hands of healthcare workers. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 30: 243-249.
- Levy, I., L. G. Rubin, S. Vasishtha, V. Tucci, and S. K. Sood. 1998. Emergence of *Candida parapsilosis* as the predominant species causing candidemia in children. **Clin Infect Dis.** 26: 1086-1088.
- Mackowiak, P.A., R.H. Browne, P.M. Southern, Jr., and J.W. Smith. 1980. Polymicrobial sepsis: an analysis of 184 cases using log linear models. **Am. J. Med. Sci.** 280:73–80.
- Maki, D.G. and L.A. Mermel. 1998. Infections due to infusion therapy. In: Bennett JV, Brachman PS, eds. **Hospital infections**, 4th edn. Philadelphia: Lippincott-Raven. 689–724.

- Martin, G.S., D.M. Mannino, S. Eaton, and M. Moss. 2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **N. Engl. J. Med.** 348: 1546-1554.
- Martin, D., F. Persat, M. A. Piens, and S. Picot. 2005. *Candida* species distribution in bloodstream cultures in Lyon, France, 1998–2001. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 24:329–333.
- Mateus, C., S. A. Crow, Jr., and D. G. Ahearn. 2004. Adherence of *Candida albicans* to silicone induces immediate enhanced tolerance to fluconazole. **Antimicrob. Agents Chemother.** 48: 3358–3366.
- McAlester, G., F. O'Gara, and J.P. Morrissey. 2008. Signal-mediated interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. **J. Med. Microbiol.** 57:563-569.
- Melo, A.S., A.L. Colombo, and B.A. Arthington-Skaggs. 2007. Paradoxical growth effect of caspofungin observed on biofilms and planktonic cells of five different *Candida* species. **Antimicrob. Agents Chemother.** 51: 3081-3088
- Mermel, L.A., B.M. Farr, R.J. Sherertz, I. Raad, N. O'Grady, J.S. Harris, and D.E. Craven. 2001. Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections. **Clin. Infect. Dis.** 32: 1249-1272.
- Morgan, J. 2005. Global trends in candidemia: review of reports from 1995– 2005. **Curr. Infect. Dis. Rep.** 7:429–439.
- Mukherjee, P.K., and J. Chandra. 2004. *Candida* biofilm resistance. **Drug Resist. Updat.** 7: 301-309.
- Mukherjee, P.K., J. Chandra, D.M. Kuhn, and M.A. Ghannoum. 2003. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. **Infect. Immun.** 71: 4333-4340.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved standard M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
- Nett, J., L. Lincoln, K. Marchillo, R. Massey, K. Holoyda, B. Hoff, M. VanHandel, and D. Andes. 2007. Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.** 51: 510-520
- Nguyen, M.H., J. E. Jr. Peacock, A. J. Morris, D. C. Tanner, M. L. Nguyen, D. R. Snyderman, M. M. Wagener, M.G., Rinaldi, and V. L. Yu . 1996. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. **Am. J. Med.** 100: 617-623.
- Nguyen, M. H., C. J. Clancy, V. L. Yu, Y. C. Yu, A. J. Morris, D. R. Snyderman, D. A. Sutton, and M. G. Rinaldi. 1998. Do in vitro susceptibility data predict the microbiologic response to amphotericin B? Results of a prospective study of patients with *Candida* fungemia. **J. Infect. Dis.** 177:425–430.
- Nucci, M., A. L. Colombo, F. Silveira, R. Richtmann, R. Salomão, M. L. Branchini, and N. Spector. 1998. Risk factors for death in patients with candidemia. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.** 19: 846–850.

- Nucci, M. and E. Anaissie. 2001. Revisiting the source of candidemia: skin or gut? **Clin. Infect. Dis.** 33: 1959-1967
- Odds, F.C. 1987. *Candida* infections: an overview. **Crit. Rev. Microbiol.** 15:1-5
- O'Grady, N.P., M. Alexander, E.P. Dellinger, J.L. Gerberding, S.O. Heard, D.G. Maki, H. Masur, R.D. McCormick, L.A. Mermel, M.L. Pearson, I. Raad, A. Randolph, and R.A. Weinstein. 2002. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. Centers for Disease Control and Prevention. **MMWR Recomm Rep.** 51: 1-29
- Ostrosky-Zeichner, L., J.H. Rex, P.G. Pappas, R.J. Hamill, R.A. Larsen, H.W. Horowitz, W.G. Powderly, N. Hyslop, C.A. Kauffman, J. Cleary, J.E. Mangino, and J. Lee. 2003. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. **Antimicrob. Agents Chemother.** 47:3149-3154.
- O'Toole, G., H.B. Kaplan, and R. Kolter. 2000. Biofilm formation as microbial development. **Ann. Rev. Microbiol.** 54:49-79.
- O'Toole, G.A. and R. Kolter. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. **Mol. Microbiol.** 28: 449-61.
- Pappas, P. G., J. H. Rex, J. Lee, R. J. Hamill, R. A. Larsen, W. Powderly, C. A. Kauffman, N. Hyslop, J. E. Mangino, S. Chapman, H. W. Horowitz, J. E. Edwards, and W. E. Dismukes. 2003. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. **Clin. Infect. Dis.** 37:634-643.
- Pasqualotto, A.C., A.B. de Moraes, R.R. Zanini, and L.C. Severo. 2007. Analysis of independent risk factors for death among pediatric patients with candidemia and a central venous catheter in place. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.** 28:799-804.
- Passos, X.S., C. R. Costa, C. R. Araujo, E. S. Nascimento, L. K. Souza, O. F. Fernandes, W. S. Sales, and M. R. Silva. 2007. Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* spp. bloodstream isolates from a Brazilian tertiary care hospital. **Mycopathologia.** 163:145-151.
- Pfaller, M.A., R.N. Jones, S.A. Messer, M.B. Edmond, R.P. Wenzel and the SCOPE Participant Group. 1998. National Surveillance of Nosocomial bloodstream infection due to species of *Candida* other than *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the Scope Program. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 30:121-129.
- Pfaller, M.A., R. N. Jones, G. V. Doern, H. S. Sader, S. A. Messer, A. Houston, S. Coffman, and R. J. Hollis. 2000. Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998. **Antimicrob. Agents Chemother.** 44:747-751.
- Pfaller, M.A., D. J. Diekema, R. N. Jones, H. S. Sader, A. C. Fluit, R. J. Hollis, and S. A. Messer. 2001. SENTRY Participant Group. International surveillance of bloodstream infections due to

Candida species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. **J. Clin. Microbiol.** 39: 3254-3259.

Pfaller, M. A., S. A. Messer, L. Boyken, S. Tendolkar, R. J. Hollis, and D. J. Diekema. 2004. Geographic variation in the susceptibilities of invasive isolates of *Candida glabrata* to seven systemically active antifungal agents: a global assessment from the ARTEMIS Antifungal Surveillance Program conducted in 2001 and 2002. **J. Clin. Microbiol.** 42: 3142–3146.

Pfaller, M.A. and D.J. Diekema. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin. Microbiol. Rev.** 20: 133-163.

Ponce de Leon, S., S. Critchley, and R.P. Wenzel. 1984. Polymicrobial bloodstream infections related to prolonged vascular catheterization. **Crit. Care Med.** 12: 856-859.

Raad, I. and G.P. Bodey. 1992. Infectious complications of indwelling vascular catheters Clin. Infect. Dis.15:197-208

Raad, I.I. and H. A. Hanna. 2002. Intravascular catheter-related infections. New horizons and recent advances. **Arch. Intern. Med.**162: 871–878.

Ramage, G., B. L. Wickes, and J. L. Lopez-Ribot. 2001. Biofilms of *Candida albicans* and their associated resistance to antifungal agents. **Am. Clin. Lab.** 20:42–44.

Ramage, G., J.P. Martínez, and J.L. López-Ribot. 2006. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. **FEMS Yeast Res.** 6:979-986.

Ramage, G., K. Vande Walle, B. L. Wickes, and J. L. Lopez-Ribot. 2001. Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. **J. Clin. Microbiol.** 39: 3234–3240.

Ramage, G, K. VandeWalle, S.P. Bachmann, B.L. Wickes, and J.L. López Ribot. 2002. In vitro pharmacodynamic properties of three antifungal agents against preformed *Candida albicans* biofilms determined by time-kill studies. **Antimicrob. Agents Chemother.** 46: 3634–3636.

Ramage, G., S. Bachmann, T. F. Patterson, B. L. Wickes, and J. L. Lopez- Ribot. 2002. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. **J. Antimicrob. Chemother.** 49: 973–980.

Rentz, A.M., M.T. Halpern, and R. Bowden. 1998. The impact of candidemia on length of hospital stay, outcome and overall cost of illness. **Clin. Infect. Dis.** 27: 781-788.

Richards, M.J., J.R. Edwards, D.H. Culver, and R.P. Gaynes. 2000. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.** 21:510-515.

Sandven, P. 2000. Epidemiology of candidemia. **Rev. Iberoam. Micol.** 17: 73-81

Schinabeck, M.K., L.A. Long, M.A. Hossain, J. Chandra, P.K. Mukherjee, S. Mohamed, M.A., and Ghannoum. 2004. Rabbit model of *Candida albicans* biofilm infection: liposomal amphotericin B antifungal lock therapy. **Antimicrob. Agents Chemother.** 48: 1727-1732.

- Seneviratne, C.J., L. Jin, and L.P. Samaranayake. 2008. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. **Oral Dis.** 14: 582-590.
- Shuford, J. A., M. S. Rouse, K. E. Piper, J. M. Steckelberg, and R. Patel. 2006. Evaluation of caspofungin and amphotericin B deoxycholate against *Candida albicans* biofilms in an experimental intravascular catheter infection model. **J. Infect. Dis.** 194:710–713.
- Silva, V., M. C. Diaz, and N. Febre. 2004. Invasive fungal infections in Chile: a multicenter study of fungal prevalence and susceptibility during a 1-year period. **Med. Mycol.** 42: 333-339.
- Singh, N. 2001. Trends in the epidemiology of opportunistic fungal infections: predisposing factors and the impact of antimicrobial use practices. **Clin. Infect. Dis.** 33:1692-1696.
- Stevens, D. A., M. Espiritu, and R. Parmar. 2004. Paradoxical effect of caspofungin: reduced activity against *Candida albicans* at high drug concentrations. **Antimicrob. Agents Chemother.** 48: 3407–3411
- Stevens, D. A., M. Ichinomiya, Y. Koshi, and H. Horiuchi. 2006. Escape of *Candida* from caspofungin inhibition at concentrations above the MIC (paradoxical effect) accomplished by increased cell wall chitin: evidence for β -1,6-glucan synthesis inhibition by caspofungin. **Antimicrob. Agents Chemother.** 50: 3160–3161.
- Sutter, D., D. Stagliano, L. Braun, F. Williams, J. Arnold, M. Ottolini, and J. Epstein. 2008. Polymicrobial bloodstream infection in pediatric patients: risk factors, microbiology, and antimicrobial management. **Pediatr. Infect. Dis. J.** 27: 400-405.
- Thomas, J.G., G. Ramage, and J.L. Lopez-Ribot. 2004. Biofilms and implant infections. In **Microbial Biofilms**. Edited by Ghannoum M, O'Toole GA. Washington DC: ASM Press: 269-293.
- Tortorano, A. M., J. Peman, H. Bernhardt, L. Klingspor, C. C. Kibbler, O. Faure, E. Biraghi, E. Canton, K. Zimmermann, S. Seaton, and R. Grillot. 2004. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 23: 317-322.
- Trick, W. E., S. K. Fridkin, J. R. Edwards, R. A. Hajjeh, and R. P. Gaynes. 2002. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. **Clin. Infect. Dis.** 35:627-630.
- Van der Walt, J.P. and D. Yarrow. 1984. Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. In: Kreger-van Rij, N.J.W., Editor, **The Yeasts**. Amsterdam: Elsevier Publishers; 45-104.
- Viscoli, C., C. Girmenia, A. Marinus, L. Collette, P. Martino, B. Vandercam, C. Doyen, B. Lebeau, D. Spence, V. Krcmery, B. Pauw, F. Meunier, and the Invasive Fungal Group of the EORTC. 1999. Candidemia in Cancer Patients: A Prospective, Multicenter Surveillance Study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). **Clin. Infect. Dis.** 28: 1071-1079.

- Wargo, M.J. and D.A. Hogan. 2006. Fungal--bacterial interactions: a mixed bag of mingling microbes. **Curr. Opin. Microbiol.** 9: 359-364.
- Warren, D.K., W.W. Quadir, C.S. Hollenbeak, A.M. Elward, M.J. Cox, and V.J. Fraser. 2006. Attributable cost of catheter-associated bloodstream infections among intensive care patients in a nonteaching hospital. **Crit. Care Med.** 2006. 34:2084-2089.
- Warren, N.G. and K.C. Hazen. *Candida, Cryptococcus* and other yeasts of medical importance. In: Murray PR, ed. **Manual of Clinical Microbiology**. Washington, DC: ASM Press, 1999: 1184- 1199.
- Watnick P, and R. Kolter. 2000. Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.* 182: 2675-2679.
- Weems Jr., J.J. 1992. *Candida parapsilosis*: Epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations and antimicrobial susceptibility. **Clin. Infect. Dis.** 14: 756-766.
- Weinstein, M.P., L.B. Reller, and J.R. Murphy. 1986. Clinical importance of polymicrobial bacteremia. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 5: 185–196.
- Wenzel, R.P. 1995. Nosocomial candidemia: Risk factors and attributable mortality. **Clin. Infect. Dis.** 20: 1531-1534.
- Wey, S.B., M. Mori, M. A. Pfaller, R. F. Woolson, and R. P. Wenzel. 1988. Hospital acquired candidemia: the attributable mortality and excess length of stay. **Arch. Intern. Med.** 148: 2642–2645.
- Wiederhold, N.P. 2007. Attenuation of equinocandin activity at elevated concentrations: a review of the paradoxical effect. **Curr. Opin. Infect. Dis.** 20: 547-578
- Wingard, J.R. 1995. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. **Clin. Infect. Dis.** 20: 115-125.

9.1 ARTIGO . J. A. Ferreira, J. H. Carr, E. Perez, C. E. F. Starling, M. A. de Resende, and R. M. Donlan. Biofilm formation and the effect of caspofungin on the biofilm structure of *Candida* spp. bloodstream Isolates.

9.2 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

9.3 RELATÓRIO FINAL CO-ORIENTADOR, EUA

9.4 APROVAÇÃO DO PROJETO PELO CNPQ

9.5 ATIVIDADES EXTRAS REALIZADAS DURANTE TREINAMENTO NOS EUA

9.1 ARTIGO 3

**Biofilm formation and the effect of caspofungin on the biofilm structure of *Candida* spp.
bloodstream Isolates.**

J. A. Ferreira, J. H. Carr, E. Perez, C. E. F. Starling, M. A. de Resende, and R. M. Donlan.

Antimicrobial Agents Chemotherapy

Biofilm formation and the effect of caspofungin on the biofilm structure of *Candida* spp. bloodstream Isolates

Authors: J.A.Ferreira^{1, 3,*}, J.H.Carr², E. Perez², C.E.F. Starling³, M.A. de Resende¹, and R.M. Donlan².

¹Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

²Division of Healthcare Quality Promotion, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia.

³Department of Infectious Diseases, Hospital Vera Cruz, Belo Horizonte, Brazil.

***Corresponding author:** Jose A. Ferreira, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 31270-901.
Tel: 55-31-3499-2730; e-mail: jantgferr@hotmail.com

Abstract

Candida biofilms are microbial communities, embedded in a polymeric matrix, growing attached to a surface and are highly recalcitrant to antimicrobial therapy. *Candida* biofilms exhibit enhanced resistance against most antifungal agents, except echinocandins and lipid formulations of Amphotericin B.

In this study, biofilm formation by different *Candida* species, particularly *C. albicans*, *Candida tropicalis*, and *C. parapsilosis*, was evaluated, and the effect of caspofungin (CAS) and amphotericin B (AMB) on biofilm processes was assessed using a clinically relevant in vitro model system. Both drugs displayed in vitro activity against biofilm *C. albicans* and *C. tropicalis* cells within biofilms.

Biofilm formation was evaluated after 48h of antifungal drug exposure and the effects of caspofungin on preformed *Candida* species biofilms were visualized by using the scanning electron microscopy (SEM). Several species-specific differences of the cellular morphologies associated with biofilms were observed. Our results confirmed the presence of paradoxical growth (PG) in *C. albicans* and *C. tropicalis* biofilms in the presence of high CAS concentrations. These findings were also confirmed through the SEM analysis and associated with the metabolic activity obtained by biofilm susceptibility testing. Importantly, these results suggest that the presence of atypical, enlarged, conical cells could be associated with PG, and with tolerant cells in *Candida* species biofilm populations. The clinical implications of these findings still unknown.

Introduction

Candida species are opportunistic pathogens which cause superficial and systemic disease in critical ill patients (Odds, 1987; Hobson, 2003), and rank among the four most common causes of bloodstream infection in U.S. hospitals, surpassing Gram-negative rods in incidence (Banerjee et al. 1991; Edmond et al. 1999), associated with high mortality rates (35%) and costly treatments (Calderone, 2002; Gudlaugsson et al., 2003).

Recent studies suggests that the majority of disease produced by this pathogen is associated with biofilm growth style (Douglas, 2002; Kojic and Darouiche, 2004; Ramage et al, 2005). Biofilms are organized communities of microorganisms that grow on an abiotic or biotic surface, are embedded in a self-produced matrix of extracellular polymeric substance (Donlan, 2001; Donlan and Costerton, 2002), and are usually associated with implanted medical devices commonly refractory to antimicrobial therapy.

As opportunistic pathogens *Candida* species are able to attach to polymeric surfaces and generate a biofilm structure, protecting the yeasts cells from the host defenses and antifungal drugs (Douglas, 2002; Ramage et al., 2005; Seneviratne and Samaranayake, 2008). *Candida* biofilms are more resistant than their planktonic counterparts to various antifungal agents, including amphotericin B, fluconazole, itraconazole, and ketoconazole (Hawser and Douglas, 1995). However, the molecular basis for the antifungal resistance of biofilm related organisms is not completely understood.

The complex architecture of biofilms observed both *in vitro* and *in vivo* suggests that morphological differentiation to produce hyphae plays an important role in biofilm formation and maturation (Blankenship and Mitchell, 2006; Kumamoto, 2008). Baillie and Douglas (1999) demonstrated that although mutant cells fixed in either hyphal or yeast form can develop into biofilms, the hyphae structure is the essential elements for providing the integrity and multilayered architecture. It has been reported that *C. parapsilosis*, *C. glabrata* and *C. tropicalis*

biofilms are not as large as those generated by *C. albicans* (CA), however further structural analysis studies are needed to describe biofilm formation within these organisms (Kuhn et al., 2004).

Unclear mechanisms could be responsible for the resistance characteristics displayed by *Candida* biofilms. The possible mechanisms include: decreased growth rate and nutrient limitation effects of the biofilm, expression of resistance genes (particularly those encoding efflux pumps matrix on penetration of drugs), and presence of 'persister' cells (Baillie & Douglas, 1998, and 2000; Ramage et al., 2001 and 2002; Kuhn et al., 2002; Mukherjee et al., 2003; Andes et al., 2004; Mateus et al., 2004; Lafleur et al. 2006).

The echinocandins are a novel class of semisynthetic amphiphilic lipopeptides that display an important antifungal activity. There are echinocandins that are presently marketed: caspofungin, micafungin, and anidulafungin. The echinocandins show considerable efficacy *in vitro* and *in vivo* in the treatment of candidemia and invasive candidiasis (Ostrosky-Zeichner et al. 2003; Kim et al. 2007; Kauffman and Carver, 2008). Caspofungin (CAS) is the first antifungal agent to be licensed that inhibits the synthesis of β -1,3-glucan, the major structural component of *Candida* cell walls; glucan synthesis might prove to be a particularly effective target for biofilms (Baillie and Douglas, 2000; Kuhn and Ghannoum, 2004). The paradoxical attenuation of antifungal activity at high echinocandins concentrations is a phenomenon that occurs usually in *C. albicans* isolates and appears to be specific to CAS among echinocandins. The surviving cells at high concentrations appear to be still subject to some drug effect, showing evidence of slowed growth in the presence of CAS (Wiederhold, 2007). Recent studies described this effect in *Candida* species biofilms (Ramage et al. 2002; Melo et al. 2007; Katragkou et al. 2008), however, fewer data has been elucidated the structural effect of CAS over *Candida* biofilm structure.

The present study was designed to characterize the *in vitro* biofilm growth of bloodstream *Candida* species isolates, and evaluate the structural effect of CAS in order to obtain visual

evidence of biofilm morphology changes associated with PG using scanning electron microscopy analysis.

Materials and methods

Organisms

Three clinical *Candida* spp. isolates, including one isolate of *C. albicans* (CA4), one isolate of *C. tropicalis* (CT8), and one isolate of *C. parapsilosis* (CP1) were evaluated in our study. All strains were obtained from patients with candidaemia that were admitted to the Intensive Care Unit (ICU) of Vera Cruz Hospital, Belo Horizonte, Brazil. The identification of these clinical isolates was carried out by using conventional physiological and morphological studies such as the germ-tube test in serum, micromorphology on cornmeal-Tween 80 agar, and metabolic properties using the ID32C system (bioMerieux Marcy l'Etoile, France).

Medium and growth conditions

The organism stocks were maintained at -70°C . Each frozen stock culture was initially inoculated onto Sabouraud dextrose agar (Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD) and incubated at 35°C for 24 hours. Then, a loopful of the yeasts was inoculated into RPMI 1640 broth medium with L-glutamine, without bicarbonate (Sigma Chemicals), buffered to pH 7.0 with 3-(*N*-morpholino) propanesulfonic acid (165 M; Sigma Chemicals). A standardized suspension of 1.0×10^6 colony-forming units CFU/mL (OD of 0.12 at 600 nm) was prepared and used immediately. This density of cells was chosen because previous experiments in our laboratory pointed an optimal biofilm formation at this specific density (data not shown). This concentration was used throughout all the experiments.

Substrate material. Flat circular silicone disks, measuring 13 mm diameter and 4 mm thickness, were obtained from Biosurface Technologies (Bozeman, MT, USA). The disks were washed in dilute laboratory soap (Versaclean, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), rinsed at least 5 times in

reverse osmosis- purified water, rinsed once in 70% ethanol, air-dried, and autoclaved before use.

Preconditioning films with human serum. Blood used in our experiments was obtained from the Division of Scientific Resources (Centers for Disease Control and Prevention). Blood was collected from donors, who were non-smokers, with on no medications and previously tested as negative for viral infections (HIV, Hepatitis B and C). The blood was incubated at 37°C for one hour, and centrifuged for 4000 x g for 20 minutes. Serum was removed, filter-sterilized and incubated in a water bath at 56 °C for 30 minutes to allow the complement inactivation. Aliquots were stored at -30°C until use.

Biofilm formation. Mature *Candida* biofilms were formed as previously described (Chandra et al., 2001; Kuhn et al., 2002; Shuford et al., 2006; Melo et al., 2007). Autoclaved silicone disks were placed in 12-well tissue culture plates (Corning Inc., Corning, NY), one disk per well, incubated in human serum for 24 hours at 37°C and rinsed in 5 mL phosphate buffered saline (PBS) to remove the excess serum. Disks were transferred to a new 12-well plate containing three ml of a 1×10^6 CFU/mL⁻¹ *Candida* cell suspension. Disks were incubated at 37°C for 1.5 h with shaking at 100 rpm, so that the cells could attach. Following the attachment phase, coupons were gently rinsed in phosphate PBS and transferred to new plates containing fresh RPMI 1640 broth and incubated for 72 h at 35°C on a rocker table to allow biofilm formation. For controls, disks were handled in an identical fashion except that no *Candida* cells were added. All assays were carried out in triplicate.

Quantitative Measurement of Biofilms. Quantitation of *Candida* biofilms was performed as described previously (Chandra et al., 2001; Ramage et al., 2001; Kuhn et al., 2002; Melo et al., 2007) using the 2,3-bis(2-methoxy- 4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) reduction assay. XTT (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) is reduced by mitochondrial dehydrogenase to a water-soluble formazan product that is measured

spectrophotometrically. The 50% RMA (reduction in biofilm metabolic activity) is equivalent to the MIC50 (minimum drug concentration at which there is 50% growth inhibition compared to control), as determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) broth microdilution M27-A method (Hawser et al. 1998; Chandra et al., 2001). Briefly, the XTT menadione solution was prepared fresh each day of testing by adding 1.5 ml of XTT (1 g/l in Ringer's lactate; Sigma Chemicals, St. Louis, MO) to 300 μ l menadione solution (0.4 mM in acetone; Sigma Chemicals). Disks containing *Candida* species biofilms were washed and transferred to a new 12-well tissue culture plate containing 3 ml of PBS and 180 μ l of XTT-menadione solution per well (prepared as described above). Plates were incubated at 37°C for 2 h and the medium was removed and centrifuged for 5 min at 6,000 x g to pellet any suspended cells or debris. XTT-formazan in the supernatant was measured at 490 nm by using a spectrophotometer (Hach Company; Loveland, CO).

***Candida* spp. biofilm quantification after caspofungin exposure by viable plate count .** Plots of CAS concentration versus viable CFU recovered from the silicone disks are presented in Table 2. Briefly, *Candida* biofilms were formed on silicone disks as described above. After 48h of CAS exposure, the disks were removed aseptically washed gently in 5 ml phosphate buffered saline (PBS), to remove planktonic and loosely adherent cells. Individual disks were transferred to in 10 ml PBS and subjected to sonication for 10 min at 42 kHz (Branson 2510, Danbury, CT), followed by high speed vortexing for 30 s, further sonication for 5 min, vortexing for 30 s, sonication for 30 s, and a final vortexing for 30 s. *Candida* suspension were diluted in butterfield buffer (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD) and spread on Sabouraud dextrose agar. Earlier studies indicated that the process removed essentially all of the viable *Candida* spp. cells from the surface of the disk and that sonication was not associated with loss of viability of the cells in suspension (data not shown). In each experiment, the viable cell counts

in three different disks were established and the mean values for tested isolates were expressed as CFU/cm².

Antifungal susceptibility. Two antifungal agents were used in this study. Amphotericin B (AMB) was from Sigma (provide location) and caspofungin (CAS) was from Merck (Rahway, N.J.). For the planktonic susceptibility testing we used the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) broth microdilution method (CLSI, 2002). *Candida* isolates were stored at -70°C until use. Each isolate was plated on Sabouraud dextrose agar and incubated at 37°C for 24 h. Stock solutions of AMB were prepared in dimethyl sulfoxide before dilution in sterile RPMI 1640 medium with l-glutamine and without sodium bicarbonate. CAS stock solutions were prepared in sterile saline and diluted in RPMI 1640 medium. Dilutions ranging from 16 - 0.0625 µg/mL were tested. The lowest concentration inhibiting any visible growth at 48 h was used as the MIC for AMB, whereas the lowest concentration associated with a significant reduction in turbidity compared with the control well at 48 h was used as the MIC for CAS.

For biofilm susceptibility testing, biofilms were formed in RPMI 1640 medium as described above. After 24 h of biofilm growth, disks containing biofilms were washed three times with PBS prior to challenge with CAS and AMB. CAS and AMB were diluted in RPMI 1640 medium to yield 10 doubling serial dilutions ranging from 0.25 to 128 µg/ml. Biofilm-containing disks were gently agitated and transferred to new culture plates containing RPMI 1640 medium (3 ml) and different concentrations of the antifungal agents. After exposure to the antifungal agent for 48 h at 35°C on a rocker table, biofilm activity was measured by XTT reduction as described above. The antifungal concentration which caused a 50% reduction in metabolic activity (50% RMA) of biofilm compared with the activity of the drug-free control (untreated) was then determined. Isolates were tested in triplicate.

SEM. For examination by scanning electron microscopy (SEM), *Candida* species biofilms were grown as described in the above paragraph using 12-well tissue culture plates. After 24 h of growth the disks were washed with PBS and different CAS and AMB concentrations (1.0 µg/ml, 16 µg/ml and 128 µg/ml of RPMI 1640) were added to the samples. Plates were then incubated for an additional 48 h at 35°C on a rocker table. Control samples (untreated) were incubated in RPMI 1640 only. The drug concentrations were selected based upon the results of metabolic activity obtained in the susceptibility testing assays.

After incubation, the samples were washed with PBS and placed in a fixative solution of 5% glutaraldehyde in cacodylate buffer (0.67 M, pH 6.2) overnight at room temperature. Samples were then dehydrated in a graded series of ethanol, immersed in hexamethyldisilazane (Polysciences Inc., Warrington, PA), and finally air dried overnight at room temperature. The samples were then mounted on aluminum stubs with silver paint, sputter coated with gold (Polaron SC7640 sputter coater; Thermo VG Scientific, United Kingdom), and observed with a FEI XL30 ESEM (FEI Co., Hillsboro, Oreg.). The entire surface of the sample was examined, and images were taken that were representative of the sample. Experiments were carried out in triplicate.

Statistical analysis

Data was analyzed using the two-tailed *t* test and Excel 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, WA). *P* values of ≤ 0.05 were considered significant.

Results

In vitro activity of CAS and AMB against preformed *Candida* spp. biofilms. Susceptibility of planktonic and biofilm *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* to CAS and AMB is shown in Table 1. Planktonic (free-floating cells) *Candida* isolates used in our study were highly

susceptible to the antifungal agents tested, except that *C. parapsilosis* tended to be less susceptible to both AMB and CAS.

The biofilm susceptibility test results are shown in Figure 1. As shown in Fig. 1A, B and C, the 50% reduction in the metabolic activities (SMIC 50) for AMB for *C. albicans*, *C. tropicalis*, and *C. parapsilosis* was 1 µg/ml. This was comparable (agreement within ±1 twofold dilution) to planktonic MIC values for each organism (Table 1). Biofilm SMICs for CAS (Fig. 1D - F) for *C. tropicalis*, *C. albicans*, and *C. parapsilosis* were not comparable to planktonic MIC results for these organisms. The MIC values for *C. tropicalis* and *C. albicans* were estimated at 0.25 and 0.5 µg/ml, respectively, and were more than two dilutions higher than their planktonic MICs. The SMIC for *C. parapsilosis* (4 µg/ml) was 16X the planktonic MIC (Fig. 1F), demonstrating that biofilm-associated *C. parapsilosis* cells are substantially more resistant to CAS than their planktonic counterparts.

The susceptibility pattern exhibited by *C. tropicalis* and *C. albicans* in which biofilm cells were less susceptible to CAS at concentrations above the SMIC (4-16 µg/ml) than at ~0.25-2 µg/ml is termed paradoxical growth (PG). PG in CAS was not observed for *C. parapsilosis*, nor was it observed for any of the *Candida* species treated with AMB.

Overall, these results suggest that CAS is effective against preformed *C. albicans* and *C. tropicalis* biofilms at concentrations similar to the MICs determined by CLSI methodologies for planktonic cells.

Microscopic Evaluation of PG in *Candida* spp. biofilms. In an effort to correlate the PG with *Candida* cellular morphological changes, we used SEM to examine the effects of different CAS concentrations on biofilm associated-cells. SEM provided useful information on the different cellular morphologies present in the biofilm structure. Triplicate disks containing biofilms of each species were exposed to three different CAS concentrations (1, 16, 128 µg/ml), and compared to the untreated control. Because silicone disks have a uniformly flat surface, planar

imaging was readily obtained. Figures 2-4 show SEM images of biofilms formed by different *Candida* species. *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* (Fig. 2 and 4, respectively) produced a less extensive biofilm than *C. albicans* (Fig. 3). SEM also revealed species-specific differences in biofilm structure. In the case of the *C. albicans* control (untreated) the biofilm architecture was highly heterogeneous and composed of a dense layer of yeasts, pseudohyphae, and hyphal forms (Fig.3a) . *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* biofilms displayed a typical microcolony/ water channel architecture containing yeasts cells aggregates (irregular groupings of basal blastospore layer) and filamentous forms (Fig. 2a and Fig. 4a)

Biofilms of *C. albicans* grown in the presence of CAS exhibited less hyphae and a substantial increase in the number of enlarged blastospores, most of which appeared to have collapsed in the 1 $\mu\text{g/ml}$ treatment. Collapsed blastospores were also observed to a lesser extent in the 16 $\mu\text{g/ml}$ treatment. Biofilms exposed to 128 $\mu\text{g/ml}$ CAS contained substantially more blastospores (though smaller than those seen at 1 and 16 $\mu\text{g/ml}$), than biofilms not exposed to CAS, but otherwise appeared unaffected by CAS treatment. Biofilms grown in 1 $\mu\text{g/ml}$ CAS had viable counts that were approximately 2 Log CFU/cm² lower than the untreated biofilms, but counts at 16 $\mu\text{g/ml}$ were approximately equivalent to the control (Table 2). Biofilms grown in 128 $\mu\text{g/ml}$ CAS had reduced but detectable viable counts but undetectable XTT reduction.

Unlike *C. albicans*, *C. tropicalis* did not exhibit substantial changes in cellular morphology when grown in the presence of CAS (Fig. 2). However, all of the cells in all fields examined exhibited collapsed cell walls when grown in the presence of 1 $\mu\text{g/ml}$ CAS. There was substantially less effect on cellular morphology at 16 $\mu\text{g/ml}$ though conically shaped cells were observed. Biofilms grown in 128 $\mu\text{g/ml}$ of CAS appeared very similar morphologically to untreated biofilms. Viable counts and XTT activity agreed for the 1 and 16 $\mu\text{g/ml}$ exposure to CAS (Table 2 and Fig 1D). However, the 128 $\mu\text{g/ml}$ exposure showed reduced but still

detectable viable counts; XTT activity was not detected at this concentration. Cells exposed to 128 µg/ml were similar morphologically to the untreated control.

C. parapsilosis biofilms were predominantly composed of yeast cells whether or not they were exposed to CAS. In contrast to *C. albicans* and *C. tropicalis*, 1 µg/ml CAS did not appear to affect *C. parapsilosis* cell structures. There was an observed effect on cell morphology at 16 but not 128 µg/ml. Viable counts and XTT reduction values demonstrated a gradual reduction with increasing CAS concentration. The XTT reduction was not detectable at 64 and 128 µg/ml though viable cells were detected (Table 2).

These results suggest that for *C. albicans* and *C. tropicalis*, paradoxical growth is associated with increased metabolic activity, increased viable count, and a change in the predominant cellular morphology within the biofilm.

Discussion

In recent years, the ability of *Candida* species to form biofilm has been evaluated (Hawser and Douglas, 1995; Ramage et al. 2001; Kojic and Darouiche, 2004). An special attention has been focused in the clinical setting, where *Candida* biofilms have gained prominence because of the recognition that the frequent use of medical devices has led to a concomitant increase in device-related infections (Kojic and Darouiche, 2004; Sereviratne and Samaranayake, 2008). Biofilm cells are characterized by the significantly enhanced resistance to some antifungal agents and altered phenotypes making eradication difficult (Baillie and Douglas, 1999; Chandra et al., 2001; Ramage et al. 2001; Sereviratne and Samaranayake, 2008). An understanding of the complexities of *Candida* species biofilm development and phenotypic characteristics will allow us to understand and create new strategies aimed at eradicating and preventing this process, thereby reducing the incidence of these infections.

In the present study, we investigated the biofilm formation in *Candida* isolates of patients with candidaemia, using an efficient, reliable and reproducible laboratory model. In our model, an

inoculum of 1×10^6 CFU/ml, an adhesion time of 90 min, and a biofilm formation time of 48 hours were selected as optimal conditions for growing *Candida* biofilm on silicone disk that was pre-treated with human serum and incubated in chemically defined RPMI 1640 medium (pH 7). A well described semiquantitative colorimetric technique (XTT reduction assay) was chosen in order to evaluate the effect of CAS and AMB on 48 h pre-formed biofilms (Kuhn et al., 2002; Jin et al., 2003; Melo et al., 2007). By this method, it was possible to estimate the SMIC₅₀ for the sessile organisms from the absorbance readings.

Studies in *Candida* biofilms have been described the effect of substratum, nutrients, presence of preconditioning film and osmolarity on biofilm formation process. In our study we selected the RPMI 1640 in order to correlate possible MIC results between planktonic and sessile cells susceptibility testing, and because it has been previously described as a medium which allowed the biofilm formation of different *Candida* species (Melo et al., 2007). The choice for the silicone disks used as substrate for biofilm formation was based in our own unpublished observations, and in other studies (Hawser and Douglas, 1994) that confirmed that this substrate allows better biofilm formation.

In the present study based MICs of planktonic cells were also determined according to the CLSI (formerly NCCLS) method with RPMI 1640 medium.

Using this biofilm model, we confirmed the SMIC₅₀s among isolates tested from three medically relevant *Candida* species, including *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis*. Our sessile MIC results confirmed the finding of others groups that indicated that CAS has good *in vitro* activity against *C. albicans* and *C. tropicalis* in clinical concentrations, (Bachmann et al., 2002; Ramage et al., 2002; Cocuauud et al., 2005; Melo et al. 2007). *C. parapsilosis* biofilm was susceptible to AMB but had a slightly higher SMIC 50 (1 rather than 4 $\mu\text{g/ml}$) for CAS. On the other hand, experiments revealed that AMB exhibited a certain degree of activity against biofilms, as indicated by the SMIC₅₀s results obtained. However, as Table 1 shows, both CAS

and AMB exhibited inhibitory activities against *Candida* species biofilms, with MICs similar to those seen for their planktonic counterparts. We assumed, as previously published by others (Hawser and Douglas, 1994; Chandra et al. 2001), that metabolic measurements based on XTT metabolic were sufficient to quantify biofilms. While XTT measurement may be used to monitor biofilm formation, microscopy analyses are critical for strain and species comparisons (Kuhn et al., 2002). The PG effect was confirmed in our study for *C. albicans* and *C. tropicalis* but not for *C. parapsilosis*. Our biofilm quantitative results are in agreement with a study by Melo et al. (2007) which reported high PG frequency in *C. albicans* (100% of the tested isolates), *C. tropicalis* (67% of the tested isolates) and *C. parapsilosis* (57% of tested isolates).

In this study, we used SEM to visualize morphological changes associated with CAS exposure. The efficacy of CAS was confirmed with 1 µg/ml by SEM for *C. tropicalis* and *C. albicans* sessile cells. We showed that CAS 16 µg/ml causes significant alterations in the morphology of *C. albicans* and *C. tropicalis*, with the presence of enlarged blastospores, atypical conical cells and decreased hyphae. Sample preparation for SEM involves fixation in an aldehyde, graded dehydration steps, and critical point drying. This dehydration processing will alter the extracellular polymeric substance matrix of the biofilm (Kuhn et al., 2002) when samples are exposed to a vacuum during examination. Appearance of collapsed cells, especially in *C. albicans* and *C. tropicalis* treated with 1 and 16 µg/ml of CAS suggests an altered cell wall structure that is more susceptible to processing artifacts. Transmission electron microscopic examination of treated and untreated cell walls would be required to ascertain this effect.

Biofilm morphological changes associated with PG were previously described for *Candida* sp. isolates (Melo et al., 2007), however, to our knowledge, this study provides the first detailed SEM image analysis of PG of *C. albicans* and *C. tropicalis* biofilms adherent to biomaterial disks. Interestingly, our results suggest a possible association between low metabolic activity and *Candida* species biofilm formation in presence of 128 µg/ml of CAS. There are three

plausible explanations for this finding. i) there is an abundance of biofilm production, and such cells may be shifting metabolism away from regular functions (Watnick and Kolter, 2000); ii) biofilm consists of a heterogeneous population with different growth rates; therefore a subpopulation of cells could also confer antifungal resistance because their slower growth rate (Kumamoto, 2002); iii) there are persister cells in the biofilm that are able to survive despite the presence of antibiotics at concentrations well above the MIC; these are phenotypic variants of the wild type rather than mutants (Keren et al., 2004; Lafleur et al. 2006).

CAS belongs to the echinocandin family, and represents the newest class of anti-fungal drugs that inhibit the synthesis of β -1,3-glucan, a fundamental component of the fungal cell wall by the inhibition of β -1,3-glucan synthase, an enzyme complex that forms glucan polymers in the cell wall (Georgopapadakou, 2001; Denning, 2002). Interestingly, *Candida albicans* biofilm cell wall contain significantly higher concentration of β -1,3-glucan than their counterparts, and these glucans can be found in the supernatant surrounding the biofilm and in the matrix (Nett et al., 2007). The equinocandins and the lipid formulations of AMB have been shown to display activity against *Candida* species biofilms (Baillie and Douglas, 2000; Kuhn and Ghannoum. 2004; Mukherjee and Chandra, 2004).

One explanation for the possible correlation of PG and yeast morphology changes was presented by Stevens et al. (2004 and 2006). These researchers quantified β -1,3-glucan, β -1,6-glucan, and chitin after high CAS concentration exposure in a *C. albicans* strain in which the paradoxical effect was previously shown to occur. Whereas both β -1,3-glucan and β -1,6-glucan content declined compared to the control (untreated cells), chitin concentrations significantly increased after drug exposure. This would suggest that CAS exposure affects cell wall composition, which in turn alters morphology. Other mechanisms that have been suggested to explain the PG include an involvement of the calcineurin pathway and upregulation of the protein kinase C (PKC) cell wall integrity pathway (Wiederhold, 2007). The possible explanations for the

attenuation of CAS activity in non *albicans* species biofilm cells *in vitro* largely remain unknown.

From the clinical perspective, there is no published data that clearly demonstrates the PG effect in the treatment of candidaemia and invasive *Candida* infections (Wiederhold, 2007). However, one potential clinical application could be the limited use of CAS in antimicrobial lock therapy. The antibiotic-lock technique was developed as a means to overcome the high grade antimicrobial resistance observed by microbial biofilms and consists of filling a central venous catheter lumen with a high concentration of an antibiotic solution in order to salvage the device (Carratala, 2002). Few studies have evaluated the efficacy of new antifungal drugs with antibiofilm activity against biofilm-encased organisms in catheters by lock therapy (Schinabeck et al., 2004; Cateau et al., 2008). Possible correlations between CAS concentration and its impact in lock therapy strategies is needed.

In conclusion, our results confirmed that therapeutic concentrations of CAS display potent *in vitro* activity against *C. albicans* and *C. tropicalis* biofilm and planktonic cells. PG was confirmed and associated with changes in specific biofilm cell morphologies. Finally, further work involving *in vitro* and *in vivo* experiments is needed in order to determine validity of our observations.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge E. Perez, Dr. M. Williams and T. Foster (Biofilm Laboratory, Centers for Disease Control and Prevention) for their hard work and valuable input and/ or technical support.

We also thank Naureen Iqbal and Dr. J. Frade (Mycotic Diseases Branch, Centers for Disease Control and Prevention) for assistance with the planktonic and sessile susceptibility testing assays.

We thank Dr. D. Warnock, Dr. Fred Tenover, Dr. J. Patel, Dr. R. Carey, Dr. J. Chandra, Dr. T. Walsh, and Dr. M. Arduino for stimulating discussions.

This work was supported in part by a research grant from the Investigator- Initiated Studies Program of Merck & Co., Inc., and by a grant from the CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)

The findings and conclusions in this report are those of the authors and do not necessarily represent the views of the United States Centers for Disease Control and Prevention. Use of trade names and commercial sources are for identification only and do not constitute endorsement by the Public Health Service or the Centers for Disease Control and Prevention. The opinions expressed in this paper are those of the authors and do not necessarily represent the views of Merck & Co., Inc.

REFERENCES

1. **Andes, D., J. Nett, P. Oschel, R. Albrecht, K. Marchillo, and A. Pitula.** 2004. Development and characterization of an in vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infect. Immun.* **72**: 6023–6031.
2. **Bachmann, S.P., K. VandeWalle, G. Ramage, T.F. Patterson, B.L. Wickes, J.R. Graybill, and J.L. López-Ribot.** 2002 .In vitro activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 3591-3596
3. **Banerjee, S.N., T.G. Emori, D.H. Culver, R.P. Gaynes, W.R. Jarvis, T. Horan, J.R. Edwards, J. Tolson, T. Henderson, and W. J. Martone.**1991. Secular trends in nosocomial primary blood-stream infections in the United-States, 1980–1989. *Am. J. Med.* **91**: S86–S89.

4. **Baillie, G.S. and L.J. Douglas.** 1998. Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 1900-1905.
5. **Baillie, G.S. and L.J. Douglas.** 1999. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J. Med. Microbiol.* **48**: 671-679.
6. **Baillie, G.S. and L.J. Douglas.** 2000. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**: 397-403.
7. **Calderone, R.A.** 2002. Introduction and historical perspectives. In *Candida* and Candidiasis, ed. RA Calderone, pp. 3–13. Washington, DC: ASM Press
8. **Carratala, J.** 2002. The antibiotic-lock technique for therapy of ‘highly needed’ infected catheters. *Clin. Microbiol. Infect.* **8**: 282–289.
9. **Cateau, E., M.H. Rodier, and C. Imbert.** 2008. In vitro efficacies of caspofungin or micafungin catheter lock solutions on *Candida albicans* biofilm growth. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**: 153-155.
10. **Chandra, J., P. K. Mukherjee, S. D. Leidich, F. F. Faddoul, L. L. Hoyer, L. J. Douglas, and M. A. Ghannoum.** 2001. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J. Dent. Res.* **80**:903–908.
11. **Cocuaud, C., M.H. Rodier, G. Daniault, and C. Imbert.** 2005. Anti-metabolic activity of caspofungin against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**: 507-512
12. **Denning, D. W.** 2002. “Echinocandins: a new class of antifungal”, *J. Antimicrob. Chemother.* **49**:889-891.
13. **Donlan, R.M.** 2001. Biofilms and device-associated infections. *Emerg. Infect. Dis.* **7**: 277–281

14. **Donlan, R.M. and J.W. Costerton.** 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**: 167–193
15. **Douglas, L.J.** 2002. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev. Iberoam. Micol.* **19**:139-143.
16. **Edmond, M.B., S.E. Wallace, D.K. McClish, M.A. Pfaller, R.N. Jones, and R.P. Wenzel.** 1999. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin. Infect. Dis.* **29**: 239-244.
17. **Gardiner, R.E., P. Souteropoulos, S. Park, and D.S. Perlin.** 2005. Characterization of *Aspergillus fumigatus* mutants with reduced susceptibility to caspofungin. *Med. Mycol.* **43** (Suppl 1):S299–S305.
18. **Georgopapadakou, N. H.** 2001. “Update on antifungals targeted to the cell wall: focus on beta-1,3-glucan synthase inhibitors”, *Expert. Opin. Investig. Drug.* **10**: 269–280.
19. **Gudlaugsson, O., S. Gillespie, K. Lee, J. Vande Berg, J. Hu, S. Messer, L. Herwaldt, M.A. Pfaller, and D. Diekema.** 2003. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin. Infect. Dis.* **37**: 1172–1177
20. **Hawser, S.P., and L.J. Douglas.** 1995. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in-vitro. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **39**: 2128–2131.
21. **Hawser, S. P., H. Norris, C. J. Jessup and M. A. Ghannoum.** 1998. Comparison of a 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]- 2H-tetrazolium hydroxide (XTT) colorimetric method with the standardized National Committee for Clinical Laboratory Standards method of testing clinical yeast isolates for susceptibility to antifungal agents. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 1450–1452.
22. **Hobson, R.P.** 2003. The global epidemiology of invasive *Candida infections*- is the tide turning? *J. Hosp. Infect.* **55**: 159–168

23. **Blankenship, J.R., and A. P. Mitchell.** 2006. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Cur Opin Microbiol.* **9**: 588–594
24. **Jin, Y., H. K. Yip, Y. H. Samaranayake, J. Y. Yau, and L. P. Samaranayake.** 2003. Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 2961–2967.
25. **Kauffman, C.A., and P.L. Carver.** 2008. Update on echinocandin antifungals. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **29**: 211-219
26. **Katragkou, A., A. Chatzimoschou, M. Simitsopoulou, M. Dalakiouridou, E. Diza-Mataftsi, C. Tsantali, and E. Roilides.** 2008. Differential activities of newer antifungal agents against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**: 357-360.
27. **Keren, I., D. Shah, A. Spoering, N. Kaldalu, and K. Lewis.** 2004. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**: 8172–8180.
28. **Kim, R., D. Khachikia, and A. C. Reboli.** 2007. A comparative evaluation of properties and clinical efficacy of the echinocandins. *Expert. Opin. Pharmacother.* **8**: 1479-1492
29. **Kojic, E.M., and R.O. Darouiche.** 2004. *Candida* infections of medical devices. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**: 255-267.
30. **Kuhn, D. M., T. George, J. Chandra, P. K. Mukherjee, and M. A. Ghannoum.** 2002. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1773–1780.
31. **Kuhn, D.M., J. Chandra, P.K. Mukherjee, and M.A. Ghannoum.** 2002. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect. Immun.* **70**: 878-88.

32. **Kuhn, D. M., and M. A. Ghannoum.** 2004. *Candida* biofilms: antifungal resistance and emerging therapeutic options. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* **5**: 186–197
33. **Kumamoto, C. A.** 2002. *Candida* biofilms. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**:608–611.
34. **Kumamoto, C.A.** 2008. Molecular mechanisms of mechanosensing and their roles in fungal contact sensing. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 667-673
35. **Lafleur, M., C. Kumamoto, and K. Lewis.** 2006. *Candida albicans* produce antifungal-tolerant persisters cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**: 3839–3846
36. **Mateus, C., S. A. Crow, Jr., and D. G. Ahearn.** 2004. Adherence of *Candida albicans* to silicone induces immediate enhanced tolerance to fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 3358–3366.
37. **Melo, A.S., A.L. Colombo, and B.A. Arthington-Skaggs.** 2007. Paradoxical growth effect of caspofungin observed on biofilms and planktonic cells of five different *Candida* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 3081-3088
38. **Mukherjee, P.K., and J. Chandra.** 2004. *Candida* biofilm resistance. *Drug Resist. Updat.* **7**: 301-309.
39. **Mukherjee, P.K., J. Chandra, D.M. Kuhn, and M.A. Ghannoum.** 2003. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infect. Immun.* **71**: 4333-4340.
40. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved standard M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
41. **Nett, J., L. Lincoln, K. Marchillo, R. Massey, K. Holoyda, B. Hoff, M. VanHandel, and D. Andes.** 2007. Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 510-520
42. **Odds, F.C.** 1987. *Candida* infections: an overview. *Crit. Rev. Microbiol.* **15**:1–5

43. **Ostrosky-Zeichner, L., J.H. Rex, P.G. Pappas, R.J. Hamill, R.A. Larsen, H.W. Horowitz, W.G. Powderly, N. Hyslop, C.A. Kauffman, J. Cleary, J.E. Mangino, and J. Lee.** 2003. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3149-54.
44. **Ramage, G., K. Vande Walle, B. L. Wickes, and J. L. Lopez-Ribot.** 2001. Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 3234–3240.
45. **Ramage, G., S. Bachmann, T. F. Patterson, B. L. Wickes, and J. L. Lopez- Ribot.** 2002. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**: 973–980.
46. **Ramage, G, K. VandeWalle, S.P. Bachmann, B.L. Wickes, and J.L. López-Ribot.** 2002. In vitro pharmacodynamic properties of three antifungal agents against preformed *Candida albicans* biofilms determined by time-kill studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 3634–3636.
47. **Ramage, G., B. L. Wickes, and J. L. Lopez-Ribot.** 2001. Biofilms of *Candida albicans* and their associated resistance to antifungal agents. *Am. Clin. Lab.* **20**:42–44.
48. **Schinabeck, M.K., L.A. Long, M.A. Hossain, J. Chandra, P.K. Mukherjee, S. Mohamed, M.A., and Ghannoum.** 2004. Rabbit model of *Candida albicans* biofilm infection: liposomal amphotericin B antifungal lock therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 1727-1732.
49. **Seneviratne, C.J., L. Jin, and L.P. Samaranayake.** 2008. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Dis.* **14**: 582-590.
50. **Shuford, J. A., M. S. Rouse, K. E. Piper, J. M. Steckelberg, and R. Patel.** 2006. Evaluation of caspofungin and amphotericin B deoxycholate against *Candida albicans* biofilms in an experimental intravascular catheter infection model. *J. Infect. Dis.* **194**:710–713.

51. **Stevens, D. A., M. Espiritu, and R. Parmar.** 2004. Paradoxical effect of caspofungin: reduced activity against *Candida albicans* at high drug concentrations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 3407–3411
52. **Stevens, D. A., M. Ichinomiya, Y. Koshi, and H. Horiuchi.** 2006. Escape of *Candida* from caspofungin inhibition at concentrations above the MIC (paradoxical effect) accomplished by increased cell wall chitin: evidence for β -1,6-glucan synthesis inhibition by caspofungin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**: 3160–3161.
53. **Watnick P, and R. Kolter.** 2000. Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.* **182**: 2675-2679
54. **Wiederhold, N.P.** 2007. Attenuation of equinocandin activity at elevated concentrations: a review of the paradoxical effect. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **20**: 547-578

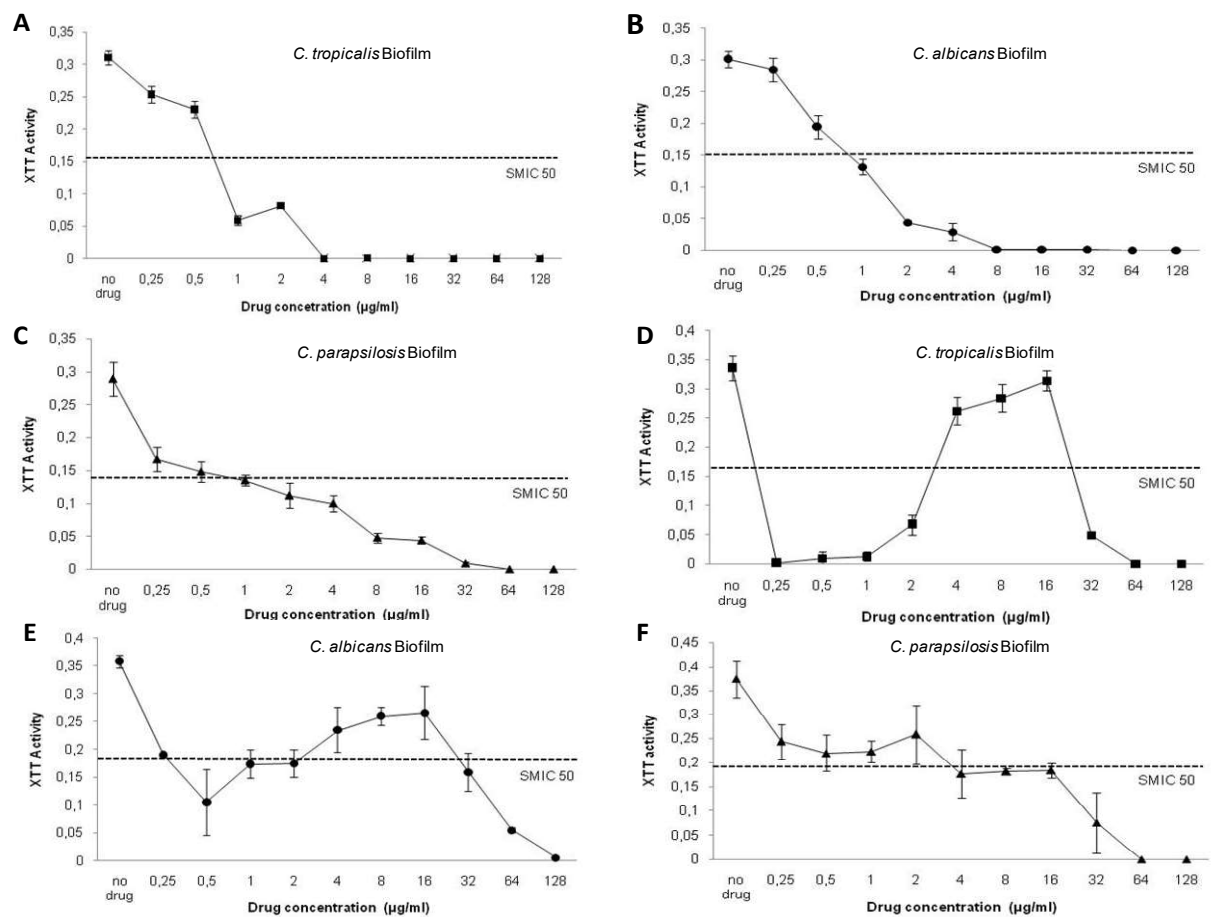


Fig.1. Metabolic activities of amphotericin B (AMB) and caspofungin (CAS) at different concentrations against preformed biofilms of *Candida* species. Values are expressed as the average of OD of silicone disks containing treated biofilms compared to the untreated biofilms (control). (A) *C. tropicalis* biofilms exposed to AMB; (B) *C. albicans* biofilms exposed to AMB; (C) *C. parapsilosis* biofilms exposed to AMB; (D) *C. tropicalis* biofilms exposed to CAS; (E) *C. albicans* biofilms exposed to CAS; (F) *C. parapsilosis* biofilms exposed to CAS. Error bars, standard deviation, n=3.

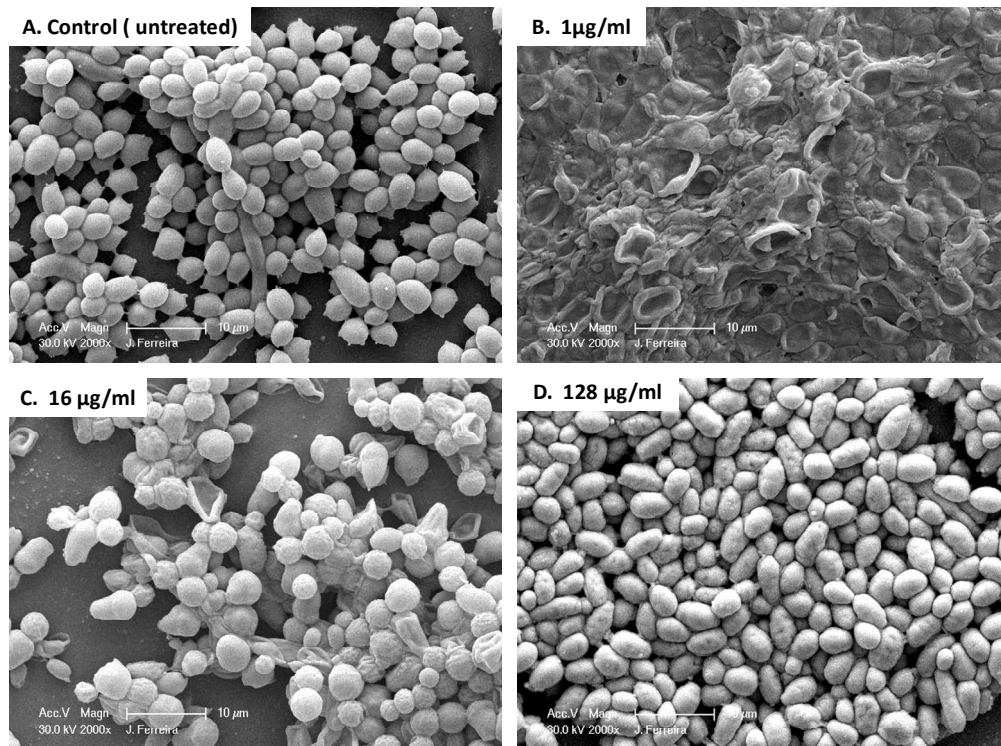


Fig. 2. Scanning electron micrographs of preformed *Candida tropicalis* biofilm in the presence of different caspofungin concentrations. Biofilms were incubated for 48 h in RPMI 1640 medium on the silicone disks. (A) *C. tropicalis* biofilm without drug (control). (B) *C. tropicalis* biofilm after exposition to 1 µg/ ml. (C) *C. tropicalis* biofilm after exposition to 16 µg/ ml. (D) *C. tropicalis* biofilm after exposition to 128 µg/ ml. Images represent typical fields of view. Bars, 10 µm.

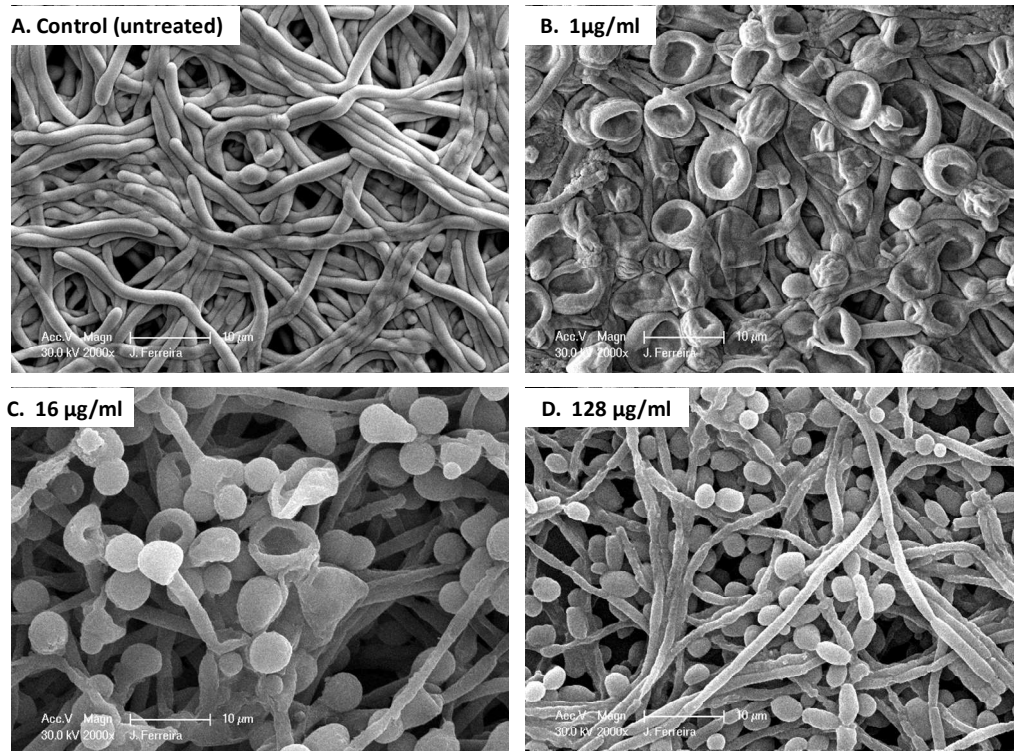


Fig.3. Scanning electron micrographs of preformed *Candida albicans* biofilm in the presence of different caspofungin concentrations. Biofilms were incubated for 48 h in RPMI 1640 medium on the silicone disks. (A) *C. albicans* biofilm without drug (control). (B) *C. albicans* biofilm after exposition to 1µg/ ml. (C) *C. albicans* biofilm after exposition to 16 µg/ ml. (D) *C. albicans* biofilm after exposition to 128µg/ ml. Images represent typical fields of view. Bars, 10 µm.

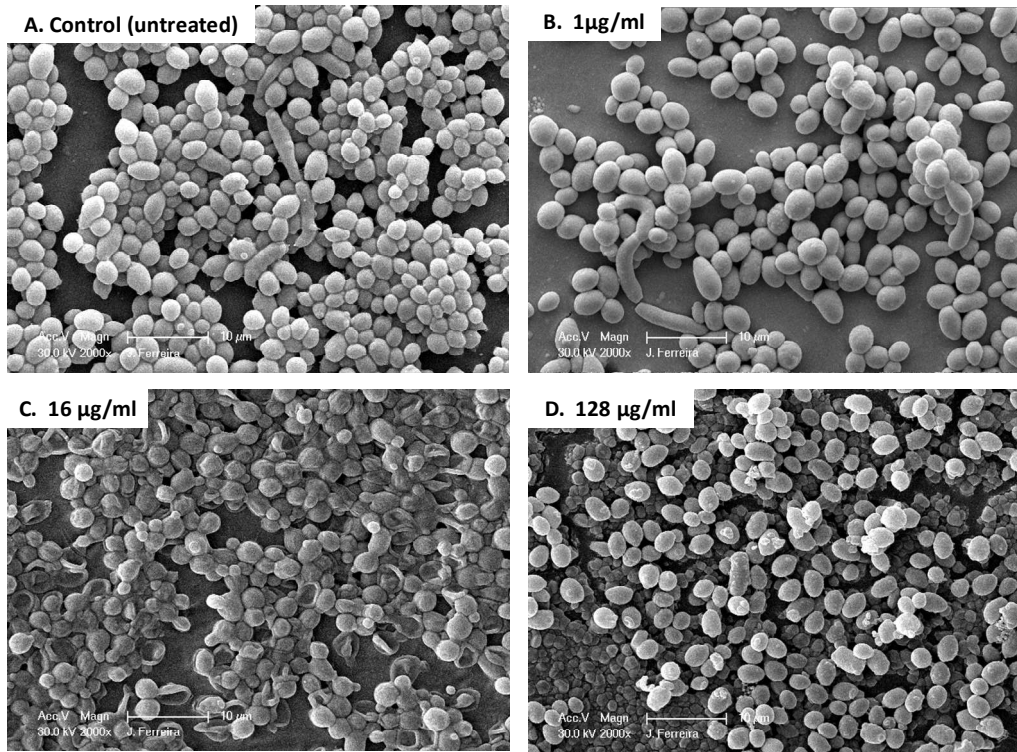


Fig.4. Scanning electron micrographs of preformed *Candida parapsilosis* biofilm in the presence of different caspofungin concentrations. Biofilms were incubated for 48 h in RPMI 1640 medium on the silicone disks. (A) *C. parapsilosis* biofilm without drug (control). (B) *C. parapsilosis* biofilm after exposition to 1µg/ ml. (C) *C. parapsilosis* biofilm after exposition to 16 µg/ ml. (D) *C. albicans* biofilm after exposition to 128µg/ ml. Images represent typical fields of view. Bars, 10 µm.

Table 1. Antifungal susceptibilities of different *Candida* spp. isolates in planktonic and biofilm growth conditions as determined using the CLSI and XTT methods^a.

Isolate	MIC ($\mu\text{g/ml}$) in:			
	Amphotericin B		Caspofungin	
	Planktonic grown cell ^b	Biofilm at 48 h (SMIC 50) ^c	Planktonic grown cell ^b	Biofilm at 48 h (SMIC 50) ^c
<i>C. albicans</i> (CA4)	0.5	1	0.0625	0.5
<i>C. parapsilosis</i> (CP1)	1	1	0.25	4
<i>C. tropicalis</i> (CT8)	0.5	1	0.0625	0.25

^a Results are representative of at least three separate experiments.

^b MIC endpoint based on visual determination of the lowest drug concentration that produced a prominent decrease in growth relative to that for the drug-free growth control well.

^c MIC endpoint based on the lowest drug concentration producing a 50% reduction in metabolic activity relative to that for the untreated growth control, as measured by the XTT reduction assay.

Table 2. Median viable cell counts recovered from silicone coupons (CFU/cm²).

Caspofungin $\mu\text{g/ml}$	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
	Log CFU/cm²	Log CFU/cm²	Log CFU/cm²
No drug	6.4	4.6	6.5
0.25	4.4	0	6.4
0.5	3.4	0	6.2
1	3.3	0	5.7
2	4.7	0	5.9
4	5.3	5.1	5.7
8	5.6	5.2	5.7
16	6.2	4.5	5.7
32	5.6	4.2	5.4
64	4.6	3.6	5.0
128	3.5	2.7	3.3

9.2 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



HOSPITAL VERA CRUZ COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Belo Horizonte, 26 de junho de 2007.

Título do Projeto: "Formação de Biofilmes por Isolados de Corrente Sanguínea de *Candida não Albicans*: Desenvolvimento, Arquitetura e Atividade da Caspofungina"

Nome do Pesquisador Principal: José Antônio G. Ferreira

Data de Recebimento pelo CEP: 20 de junho de 2007

Número do projeto no CEP: 073/07

O CEP reuniu-se no dia 26 de junho de 2007 e deliberou o projeto acima especificado como **APROVADO**.

Abaixo se encontram os documentos avaliados e aprovados pelo CEP nesta reunião:

- Protocolo do estudo;
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- Folha de rosto preenchida;
- Ficha Clínica;
- Declaração de compromisso com o delineamento do estudo;
- Declaração de compromisso com o manuseio das amostras biológicas;
- Termo de compromisso do investigador e da instituição;
- *Curriculum vitae* da equipe do estudo;
- Cronograma de estudo;
- Declaração do orientador no Brasil sobre a necessidade do estudo;
- Carta de aprovação do estudo pelo centro internacional.



DR. ANDRÉ MÁRCIO MURAD
COORDENADOR DO CEP - HVC

Diana Rabello Lobo
Secretária CEP
Hospital Vera Cruz S/A

9.3 RELATÓRIO FINAL CO-ORIENTADOR, EUA



DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES

Centers for Disease Control
and Prevention (CDC)
Public Health Service

25 de Novembro, 2008

Dear Carlos and Maria,

I wanted to provide you both with a brief synopsis of how the year has gone for Jose Ferreira and my experience as his mentor. First of all, thanks so much for getting us together. I am sure you must have suggested that Jose meet me in November 2005 when I first came to Brazil to present a seminar. I think I have really benefited more than Jose by this experience. It's really been a great pleasure and privilege to mentor him.

As you know, Jose has this incredible gift of enthusiasm. Everyone notices this, whether it is the staff in the Biofilm Lab, colleagues at CDC, or researchers at NIH. He is also highly motivated to discuss his research and learn what others are doing in the field. I've commented more than once that he should have plenty of opportunities to choose a postdoc once the Ph.D. is completed. His work ethic and ability to be goal-oriented has also become very clear to me and others here. He and I developed a fairly ambitious plan before he arrived and I am very pleased that he has essentially completed to plan, addressing the two specific aims we established in the research plan that was submitted to Merck. I would expect that the project managers at Merck will agree. He did a very nice job on his seminar last week and several of the senior people in our Branch and Mycotic Diseases Branch commented favorably. He really has a mass of data and he and I have spent time over the last few days trying to determine what is left to do in order to tie up loose ends so that we can submit the work for publication. Our plan is to try and publish at least two papers, one on the role of a preformed bacterial biofilm on *Candida* colonization and biofilm formation on catheters in an in vitro model system, the other pertaining to the effect of *Candida* biofilm structure/architecture on susceptibility to the antifungal drug caspofungin. When he arrives in Brazil I am sure he will sit down with both of you to discuss the data in detail.

I also have to say that Jose has been a wonderful representative of your country and your university/hospital here at CDC, Emory University, and elsewhere. I think this is a very favorable reflection on your excellent mentoring abilities. I am looking forward to visiting in March for Jose's defense. We have a lot to do before then of course, much discussion and writing to get the work published. I'll be sure to stay in close communication with both of you through this process.

Sincerely,

Rodney Donlan, Ph.D.
Biofilm Laboratory Team Leader

9.4 APROVAÇÃO DO PROJETO PELO CNPq

CNPq - Resultado de Julgamento [201709/2007-4] - Bolsas no Exterior -
Doutorado Sanduíche - SWE

De: **CNPq** (cgapb@cnpq.br)
Enviada: sexta-feira, 14 de setembro de 2007 14:11:19
Para: jantgferr@hotmail.com
Cc: cgsau@cnpq.br

Nome: José Antonio Guimarães Ferreira
Processo: 201709/2007-4
Modalidade: Doutorado Sandwich no Exterior - SWE
Instituição: Centers for Disease Control and Prevention - Estados Unidos
Chamada: Bolsas no Exterior - Doutorado Sanduíche - SWE
Comitê Assessor: Microbiologia e Parasitologia

Prezado (a) Senhor(a),

Comunicamos que, com base na recomendação do Comitê Microbiologia e Parasitologia, a Diretoria do CNPq **aprovou** a concessão de bolsa na modalidade acima, com vigência para o período de 15/11/2007 a 15/11/2008.

Para a implementação da bolsa é necessário preencher e realizar o envio eletrônico do Formulário de Dados Complementares de Bolsa no Exterior que se encontra disponível através da chave de acesso abaixo:

<http://efomento.cnpq.br/efomento/termo?token=jjc68708N6326862123518621373638>

[201709/2007-4] - Análise do relatório técnico do processo 201709/2007-4

De: **CNPq** (COBIO@CNPQ.BR)

Enviada: quarta-feira, 28 de janeiro de 2009 13:55:43

Para: jantgferr@hotmail.com

Prezado(a) Pesquisador(a) José Antonio Guimarães Ferreira,

O CNPq informa que seu relatório técnico referente ao processo 201709/2007-4 foi **aprovado** do ponto de vista técnico.

Atenciosamente,

COBIO - Coordenacao do Programa de Pesquisa Em Biociencias em 28/01/2009.

9.5 ATIVIDADES EXTRAS REALIZADAS DURANTE TREINAMENTO NOS EUA

Ferreira, Jose A. (CDC/CCID/NCPDCID) (CTR)

Subject: PostDoc biofilm Brazil

-----Original Message-----

From: Walsh, Thomas (NIH/NCI) [E]
Sent: Tuesday, November 11, 2008 10:34 AM
To: Ferreira, Jose A. (CDC/CCID/NCPDCID) (CTR)
Subject: RE: PostDoc biofilm Brazil

Dear Jose,
I want to thank you for giving an excellent lecture on the pathogenesis of biofilm formation in experimental candida infections of vascular catheters at the Laboratory Meeting of the Immunocompromised Host Section in the Pediatric Oncology Branch of the National Cancer Institute. Your presentation elicited vigorous discussion and opened important areas of possible collaboration. I look forward to working with you in the future as we prepare for your transition as a Senior Research Fellow in the NCI.
Sincerely,
Tom

Thomas J. Walsh, MD, FACP, FCCP, FIDSA
Senior Investigator
Chief, Immunocompromised Host Section
Pediatric Oncology Branch
National Cancer Institute
CRC-1-5750
Bethesda, MD 20892
301-402-0023 (Direct)
301-496-7103 (Secretary)
301-693-1890 (Emergency Patient Care Cell Phone)

From: Juan Leon <jleon3@emory.edu>
Date: Tue, 21 Oct 2008 19:58:36 -0500
To: "Ferreira, Jose A. (CDC/CCID/NCPDCID) (CTR)" <jaf4@cdc.gov>
Subject: Thank you for your Wednesday Seminar

Dear Dr. Ferreira,

I wanted to thank you for coming to the Hubert Department of Global Health last Wednesday and giving your seminar on the innovative Health System in Minas Gerais and Brazil. The students, staff, and faculty of the Rollins School of Public Health of Emory University all enjoyed your seminar. The comments I heard afterwards were, "dynamic speaker" "very articulate" "Interesting topic". As you saw from the number of questions you received, your seminar sparked interest and was received. I also enjoyed speaking with you about potential collaborations between your University and Emory University.

Wishing you the best in your work,

Juan Leon

--

Juan Leon, PhD, MPH
Assistant Professor
Hubert Department of Global Health
Rollins School of Public Health
Emory University
Atlanta, GA 30322

De: **Carol Kumamoto** (carol.kumamoto@tufts.edu)

Enviada: quarta-feira, 17 de dezembro de 2008 12:02:24

Para: José Antonio Ferreira (jantgferr@hotmail.com)

Hi Jose,

I want to thank you for visiting my Lab during the last ASM general meeting in Boston.

As far as project ideas, a proposal focusing on drug resistance and Candida biofilms would be very interesting and a collaboration with your group would be great.

We have been studying a plasma membrane protein that we named Dif1p. If you delete the DIF1 gene, the mutant strain is defective in filamentation in agar and is hypersusceptible to caspofungin. The mutant also makes an abnormal biofilm: under some conditions, the mutant biofilm looks qualitatively different from the normal biofilm but we have not developed a way to quantitate the difference. It would be interesting to characterize the biofilm produced by this mutant in more detail and to explore the susceptibility of dif1 mutant biofilms to caspofungin. The mutant may be hypersusceptible under these conditions too.

This is just a suggestion of something that would be interesting. If you have other ideas, let me know what you are thinking about.

Would you please ask Dr. Donlan and Dr. Aparecida de Resende to send me a letter of recommendation? I would like to learn more about the work you have been doing, both with him and in Brazil.

Best wishes,
Carol

Dr. Carol A. Kumamoto
Professor
Department of Molecular Biology and Microbiology
Tufts University
136 Harrison Ave.
Boston, MA 02111 USA

ph: (617) 636-0404
FAX: (617) 636-0337
email: carol.kumamoto@tufts.edu
www.tufts.edu/sackler/microbiology/faculty/kumamoto/index.html