

CARLA DASSIÊ RANGEL

MONOGRAFIA

**LEVEDURAS EMERGENTES CAUSADORAS DE INFECÇÕES
INVASIVAS, METODOLOGIAS DE IDENTIFICAÇÃO E PERFÍS
DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS**

UFMG

2012

CARLA DASSIÊ RANGEL

**LEVEDURAS EMERGENTES CAUSADORAS DE INFECÇÕES
INVASIVAS, METODOLOGIAS DE IDENTIFICAÇÃO E PERFÍS
DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS**

Monografia apresentada à
Universidade Federal de Minas
Gerais, como parte das exigências
do Curso de Pós-Graduação Lato
Sensu em Microbiologia aplicada às
Ciências da Saúde, para a obtenção
do título de Especialista em
Microbiologia.

Orientadora: Prof. Dra. Susana Johann

BELO HORIZONTE

2012

CARLA DASSIÊ RANGEL

**LEVEDURAS EMERGENTES CAUSADORAS DE INFECÇÕES
INVASIVAS, METODOLOGIAS DE IDENTIFICAÇÃO E PERFÍS
DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS**

Trabalho de Monografia
apresentada à Universidade Federal
de Minas Gerais, como parte das
exigências do Curso de Pós-
Graduação Lato Sensu em
Microbiologia aplicada às Ciências
da Saúde, para a obtenção do título
de Especialista em Microbiologia.

Aprovado em ___ de _____ de 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof.:Dra. Susana Johann
(Orientadora)

Prof. Dra. Carla Pataro
Pós-doutoranda do Departamento de Microbiologia UFMG

Dra. Luciana Rocha Brandão
Pós-doutoranda do Departamento de Microbiologia UFMG

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me conceder a graça de concluir essa especialização e realizar esse grande sonho mesmo com tantas dificuldades e sacrifícios. Agradeço aos meus pais Roberto e Andréia, pelo apoio incansável e amor imensurável, aos meus irmãos, avós, familiares, namorado e à minha orientadora Susana, que esteve ao meu lado auxiliando a monografia.

RESUMO

A incidência de infecções oportunistas por leveduras tem se tornado crescente, devido a vários fatores tais como à maior agressividade no tratamento de neoplasias, transplante de órgãos, síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), lúpus eritematoso sistêmico (LES), entre outras doenças. Estas leveduras apresentam a habilidade de passar da condição de comensal a patógena sob condições favoráveis no hospedeiro, dependendo para isso dos diversos fatores de virulência. Dentre as infecções fúngicas generalizadas, a candidíase tem destaque. A candidemia está entre as principais causas de infecções da corrente sanguínea nosocomiais e está associada com mortalidade significativa. A incidência de candidemia está crescendo com o aumento da complexidade dos procedimentos cirúrgicos, a existência de populações de pacientes em maior risco de infecção e as mudanças do paciente de acordo com características demográficas. Sua incidência global elevou-se cinco vezes nos últimos dez anos e as leveduras do gênero *Candida* estão atualmente entre a quarta e sexta infecção da corrente sanguínea mais comum na América do Norte e na Europa. Outras leveduras como as espécies do gênero *Trichosporon* e de *Rhodotorula*, pertencentes à família *Cryptococcaceae* são causas frequentes de fungemia, e podem levar a um agravamento em pacientes imunossuprimidos, a septicemia. Outras leveduras raras que podem causar doenças invasivas em pacientes severamente imunossuprimidos incluem as do gênero *Geotrichum*, *Hansenula*, *Malassezia* e *Saccharomyces*. Com esse crescente aumento de septicemia por leveduras, houve necessidade do aprimoramento das técnicas de diagnóstico. Tendo em vista a gravidade das infecções fúngicas sistêmicas, bem como seu elevado custo socioeconômico, é importante um diagnóstico rápido e preciso para que a intervenção medicamentosa possa ser iniciada precocemente na tentativa de minimizar as elevadas taxas de mortalidade.

Palavras-chave: oportunistas, leveduras, infecções, *Candida* e septicemia.

ABSTRACT

The incidence of opportunistic infections by yeast has become increasing due to several factors such as the more aggressive the treatment of cancer, organ transplantation, acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), systemic lupus erthematosus (SLE), among other diseases. These yeasts have ability to pass of conditions commensal to pathogenic under favorable conditions in the host, for this depending on the various virulence factors. Among the widespread fungal infections, candidiasis prominently. The candidemia is among the leading causes of nosocomial bloodstream infections and is associated with significant mortality. The incidence of candidemia is increasing with the increasing complexity of surgical procedures, the existence of patient populations at increased risk of infection and changes in the patient according to demographic characteristics. Its overall incidence has risen five times in the last ten years and the *Candida* yeasts are currently the fourth to sixth bloodstream infection most common in North America and Europe. Other yeasts and species of the genus *Trichosporon* and *Rhodotorula*, belonging to the family *Cryptococcaceae* are frequent causes of fungemia, and can lead to an increase in immunosuppressed patients, septicemia. Other rare yeast that can cause invasive disease in severely immunosuppressed patients include the genera *Geotrichum*, *Hansenula*, *Malassezia* and *Saccharomyces*. With the increasing growth of yeast septicemia, there was need for improving diagnostic techniques. Given the severity of systemic fungal infections, as well as its high socioeconomic cost, it is important to a rapid and accurate diagnosis so that medical intervention can be started early in an attempt to minimize the high mortality rates.

Key-words: opportunistic, yeast, infections, *Candida* and septicemia.

LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1 – Micrografia de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em brotamento	15
FIGURA 2 – Célula <i>Schizosacharomyces pombe</i> no início da divisão por fissão binária	15
FIGURA 3 – Atividade de fosfolipase de <i>Candida albicans</i> em Ágar Sabouraud dextrose suplementado com gema de ovo	18
FIGURA 4 – Esquema de <i>Cryptococcus sp.</i> corado com tinta nanquim	36
FIGURA 5 – Fotomicrografia de uma preparação com tinta nanquim de <i>C. neoformans</i>	37
FIGURA 6 – Fotomicrografia de escarro com coloração de Gram característicos de espécie de <i>Candida</i>	37
FIGURA 7 – Crescimento de diferentes espécies de <i>Candida</i> em CHROMagar™ Candida	40
FIGURA 8 – Fotomicrografia de um tubo germinativo, característico de <i>Candida albicans</i>	41
FIGURA 9 – Clamidósporos no interior das hifas de <i>C. albicans</i>	42
FIGURA 10 – Clamidósporos de cepas de <i>C. dubliniensis</i> e <i>C. albicans</i>	43
FIGURA 11 – Teste de assimilação de açúcares	44
FIGURA 12 – Réplica platining para o isolamento de colônias de auxotrofia ..	44

LISTAS DE SIGLAS

AIDS / SIDA - Síndrome da imunodeficiência adquirida

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EUA - Estados Unidos da América

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

IgA - Imunoglobulina A

LES - Lúpus eritematoso sistêmico

PFGE - Técnica de eletroforese em campo pulsátil incluindo gel

RNA - Ácido ribonucleico

SIRS - systemic inflammatory response syndrome

SNC - Sistema nervoso central

UTI - Unidades de terapia intensiva

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	9
2 - OBJETIVOS	11
2.1 - OBJETIVO GERAL	11
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3 - RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	12
4 - METODOLOGIA	12
5 - CARACTERÍSTICAS DAS LEVEDURAS	13
5.1 Classificação das leveduras	15
5.1.1 Filo <i>Ascomycota</i>	15
5.1.2 Filo <i>Basidiomycota</i>	16
5.1.3 Filo <i>Zigomycota</i>	16
5.1.4 <i>Deuteromycetes</i>	16
6 - LEVEDURAS ENVOLVIDAS EM INFECCÕES INVASIVAS	17
6.1 <i>Candida</i>	17
6.2 <i>Cryptococcus</i>	22
6.3 <i>Wickermomyces anomalus</i> (<i>Pichia anomala</i>)	23
6.4 <i>Trichosporum</i>	24
6.5 <i>Malassezia</i>	25
6.6 <i>Saccharomyces</i>	27
6.7 <i>Rhodotorula</i>	28

6.8 <i>Geotrichum</i>	29
7 - SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS	30
7.1 Anfotericina B	30
7.2 Flucitosina	32
7.3 Derivados azólicos	33
8 - DIAGNÓSTICO	34
8.1 Exame microscópico direto	35
8.2 Cultivo	38
8.2.1 Características em meios cromogênicos	39
8.2.2 Fluorescência em ágar azul- metil	40
8.3 Micromorfologia	41
8.3.1 Características fenotípicas para a diferenciação de <i>Candida</i> não- <i>albicans</i>	41
8.3.2 Produção de clamidósporos	42
8.4 Teste de assimilação de açúcares	43
8.4.1 Assimilação de carboidratos e identificação por sistemas comerciais	45
8.5 Testes moleculares	47
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
10. REFERÊNCIAS	51

1. INTRODUÇÃO

A incidência de infecções oportunistas por leveduras tem se tornado crescente, devido ao aumento de fatores como, a maior agressividade no tratamento de neoplasias, transplante de órgãos, síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), lúpus eritematoso sistêmico (LES), entre outras doenças. Atualmente, podemos evidenciar uma mudança marcante no perfil epidemiológico das leveduras ao serem relatados casos de infecções por espécies emergentes (MACEDO *et al.*, 2009).

Estas leveduras podem apresentar a habilidade de passar da condição de comensal a patógenas. Esta habilidade vai depender de condições favoráveis no hospedeiro e também de fatores de virulência da levedura, incluindo a secreção de enzimas hidrolíticas como proteases, fosfolipases, produção de biofilme entre outros (KANTARCIOGLU & YUCEL, 2002). A atividade proteásica relaciona-se diretamente com a degradação de componentes teciduais, como colágeno, queratina e mucina, além de componentes imunológicos como anticorpos, complemento e citocinas. A habilidade de leveduras de interesse médico em secretar proteases tem sido associada a fatores de patogenicidade (SILVA, FERREIRA & CANDIDO, 2007).

Os biofilmes representam o tipo mais prevalente de crescimento microbiano na natureza e são cruciais para o desenvolvimento de infecções clínicas, estando nos últimos anos associados com alto nível de resistência dos organismos associados aos antibióticos (OZKAN *et al.*, 2005). Um biofilme é formado por micro-organismos e seus polímeros extracelulares que estão ligados a uma superfície (g-PFALLER *et al.*, 1995). A capacidade de formar biofilmes nas superfícies de cateteres e outros dispositivos proteicos, também contribui para a alta prevalência do organismo aderido como agente etiológico de infecções nosocomiais (MATSUMOTO *et al.*, 2001).

As condições favoráveis no hospedeiro incluem principalmente a imunossupressão. Por exemplo, vários aspectos da imunidade são alterados em pacientes com diabetes e tuberculose. Nestas doenças, a função de leucócitos polimorfonucleares é deprimida, ocorrendo nos casos de diabetes quando a acidose está presente. A aderência leucocitária, a quimiotaxia e a fagocitose podem ser afetadas conduzindo a infecções oportunistas por leveduras (MACEDO *et al.*, 2009).

A sepse é a principal causa de morte nas unidades de terapia intensiva (UTI's) e está entre as principais causas de morte nos EUA (MARTIN *et al.*, 2003). Em torno de 2% a 11% das internações hospitalares e nas UTI's são por esta sepse (ANGUS & WAX, 2001). No Brasil (2006) foi realizado um estudo prospectivo em 65 hospitais de todas as regiões do Brasil evidenciando uma elevada mortalidade por sepse nas UTI's do país. Dentre os micro-organismos causadores as infecções fúngicas foram responsáveis por 5% das mortes. A ventilação mecânica foi a causa predominante de sepse, no qual ocorreu em 82,1% dos casos (JÚNIOR *et al.*, 2006).

No Brasil, os aspectos epidemiológicos da sepse têm sido investigados, destacando-se BASES Study (Brazilian Sepsis Epidemiological Study) – estudo de coorte multicêntrico e observacional realizado em cinco unidades de terapia intensiva públicas e privadas –, no qual se identificou uma densidade de incidência de sepse de 57,9 por 1000 pacientes-dia (95% IC 51,5-65,3) (SILVA *et al.*, 2004).

Dentre as infecções fúngicas generalizadas, a candidíase tem destaque. Em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva, muitas vezes o curso é de sepse grave o que muitas vezes leva à morte (CIOK-PATER & GOSPODAREK, 2007). Existem diversas espécies de *Candida*, além da *C. albicans* associadas a estas infecções (ELLS *et al.*, 2009). Outras leveduras como as espécies do gênero *Trichosporon* e de *Rhodotorula*, pertencentes à família *Cryptococcaceae* são causas frequentes de fungemia, e podem levar a um agravamento em pacientes imunossuprimidos, a septicemia. Outras leveduras raras que podem causar doenças invasivas em pacientes severamente imunossuprimidos incluem os gêneros *Geotrichum*, *Hansenula*, *Malassezia* e *Saccharomyces* (MICELI *et al.*, 2011).

Para se obter um tratamento eficaz, é essencial ter um conhecimento de qual é a espécie causadora da infecção, assim como da sua sensibilidade a drogas (FALAGAS *et al.*, 2010). Portanto, no presente trabalho serão descritas algumas das leveduras causadoras de infecções sistêmicas, assim como as metodologias de identificação e os tratamentos disponíveis.

2. OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL

Realizar uma revisão bibliográfica descrevendo as leveduras emergentes causadoras de infecções invasivas no homem, além das metodologias de identificação e o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir o que são leveduras;
- Caracterizar as principais leveduras causadoras de infecções invasivas;
- Caracterizar o perfil de susceptibilidade destas leveduras frente aos antifúngicos usuais;
- Descrever as metodologias de identificação destas leveduras;
- Descrever a importância do diagnóstico correto na identificação das leveduras.

3. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A incidência de infecções sanguíneas causadas por leveduras emergentes tem crescido de forma preocupante nos últimos anos, com isso, tem aumentado também a necessidade de maior eficiência no diagnóstico, uma vez que estas leveduras muitas vezes não são diagnosticadas corretamente acarretando em erros no tratamento dos pacientes acometidos. Além disso, muitas vezes os isolados são resistentes aos antifúngicos mais utilizados na prática médica, dificultando o tratamento e comprometendo a saúde pública como um todo.

Logo, esse trabalho justifica-se por ser crescente o número de casos de septicemia por leveduras antes comensais e atualmente patogênicas e ressalta a importância no investimento em pesquisa para o desenvolvimento de novas drogas a fim de controlar esses índices de infecções multirresistentes.

4. METODOLOGIA

O trabalho foi baseado em pesquisa exploratória, com obtenção de dados a partir de uma revisão bibliográfica, que por sua vez recupera o conhecimento científico sobre um determinado problema, que nesse caso é a septicemia causada por *Candida não-albicans* e outras leveduras.

Os sites de busca utilizados neste projeto foram: Pub Med, Science Direct, Periódicos CAPES e Scielo. Foram utilizadas as seguintes palavras-chave: leveduras emergentes, *Candida albicans*, *Candida não-albicans*, *Pichia*, *Trichosporum*, *Rhodotorula*, *Geotrichum*, *Hansenula*, *Malassezia*, *Saccharomyces*, antifúngicos, resistência, diagnóstico, entre outras.

5. CARACTERÍSTICAS DAS LEVEDURAS

As leveduras são fungos predominantemente unicelulares dentro de um grupo filético classificadas dentro de Asco e Basidiomicetos (KURTZMAN, FELL & BOEKHOUT, 2011). São caracteristicamente esféricas ou ovais e estão distribuídas amplamente no ambiente, assim como os fungos filamentosos, sendo frequentemente encontradas como um pó branco cobrindo frutas e folhas (TORTORA *et. al*, 2005). A maioria das leveduras é classificada como ascomiceto; são muito maiores que células bacterianas, podendo ser distinguidas microscopicamente das bactérias por suas dimensões e pela presença de estruturas internas, tal como o núcleo. Crescem abundantemente em habitats onde há presença de açúcares, como frutas, flores e cascas de árvores. Algumas espécies vivem simbioticamente com animais, em especial insetos, sendo espécies patogênicas para animais e humanos (MADIGAN, MARTINKO & PARKER, 2004).

Os fungos não possuem mecanismos químicos, fotossintéticos ou autotróficos para produção de energia ou síntese de constituintes celulares. Absorvem oxigênio e desprendem anidrido carbônico durante seu metabolismo oxidativo. Alguns fungos podem germinar muito lentamente em meio com pouco oxigênio (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

São capazes de crescimento anaeróbio facultativo e podem utilizar o oxigênio ou um componente orgânico como aceptor final de elétrons, sendo este de grande importância, uma vez que permite que esses fungos sobrevivam em vários ambientes. Se houver acesso ao oxigênio, as leveduras respiram aerobicamente para metabolizar hidratos de carbono formando dióxido de carbono e água; na ausência do oxigênio, elas fermentam os hidratos de carbono e produzem o etanol e dióxido de carbono. Essa fermentação é usada na fabricação de cerveja, do vinho e nos processos de panificação (TORTORA *et. al*, 2005).

As leveduras podem ser definidas como fungos cuja reprodução predominante é de forma assexuada, resultado de brotamento ou fissão, e que não fazem seus estados sexuais dentro ou em cima de um corpo de frutificação. Esta distinção tem sido apoiada por comparações moleculares, que demonstram que leveduras provenientes de brotamento e fissão são filogeneticamente distintas uma da outra e dos Euscomycota. Uma exceção é o gênero *Eremascus*, que tem ascos

não inclusos, mas as células não são formadas de brotamento. Uma distinção semelhante pode ser feita para leveduras do filo basidiomicota, que muitas vezes são filogeneticamente separadas dos cogumelos que se originam a partir de corpos de frutificação complexos. Em resumo, leveduras, ascomicéticas ou basidiomicéticas, são geralmente caracterizadas por brotamento ou fissão como principal meio de reprodução assexuada, e tem estado sexual que não são inclusos em corpos de frutificação (KURTZMAN, FELL & BOEKHOUT, 2011).

No brotamento, a célula parental forma uma protuberância (broto) na superfície externa (Fig. 1). À medida que o broto se desenvolve, o núcleo da célula parental se divide, e um dos núcleos migra para o broto. O material da parede celular é então sintetizado entre o broto e a célula parental, e o broto acaba se separando da célula parental. Uma célula de levedura pode produzir mais de 24 células-filhas por brotamento. Algumas leveduras produzem brotos que não se separam uns dos outros; esses brotos formam uma pequena cadeia de células chamada de pseudo-hifa (TORTORA *et. al*, 2005).

As leveduras que se reproduzem por fissão, como *Schizosaccharomyces*, dividem-se produzindo duas células novas iguais. Durante a fissão-binária, as células parentais se alongam, seus núcleos se dividem, e duas células filhas são produzidas (Fig. 2). O aumento do número de células de leveduras em meio sólido produz uma colônia similar às colônias de origem bacteriana (TORTORA *et. al*, 2005).

Algumas leveduras realizam a reprodução sexuada, em que ocorre uma fusão de duas células. No interior da célula fundida, o zigoto, ascósporos (no caso dos Ascomicetos) são eventualmente formados (MADIGAN, MARTINKO & PARKER, 2004).

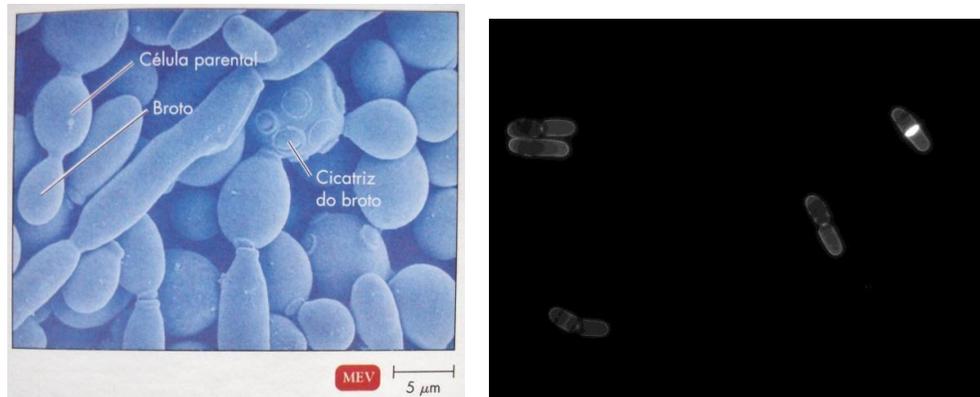


Fig. 1: Micrografia de *Saccharomyces cerevisiae* em diversos estágios de brotamento. *Fonte:* Levedura de brotamento, TORTORA *et. al.*, 2005.

Fig. 2: Microscopia óptica de Célula *Schizosaccharomyces pombe* corada com calcofluór no início da divisão por fissão binária. *Fonte:* JOHANN, 2011.

As principais leveduras de importância econômica correspondem ao gênero *Saccharomyces*, utilizadas na panificação e na produção de bebidas alcoólicas. Embora o habitat natural dessas leveduras sejam as frutas e sucos de frutas, as leveduras comerciais atualmente utilizadas são relativamente diferentes das linhagens selvagens, visto que foram aperfeiçoadas ao longo dos anos por cuidadosa seleção e manipulação genética, sendo o primeiro organismo eucarioto a ter seu genoma completamente sequenciado (MADIGAN, MARTINKO & PARKER, 2004).

5.1 Classificação das leveduras

A taxonomia dos fungos tem apresentado progresso expressivo baseados em técnicas moleculares, principalmente a prova de PCR e seleção de oligonucleotídeos com sondas específicas. Os fungos patogênicos e oportunistas mais importantes estão distribuídos em três filos do reino *Fungi*: *Zygomycota*, *Basidiomycota*, *Ascomycota* e no grupo dos *Deuteromycetes* (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

5.1.1 Filo *Ascomycota*:

São denominados fungos superiores, principalmente porque possuem uma estrutura consideravelmente mais complexa do que os outros fungos. Os membros dos ascomicetos incluem as formas leveduriformes, miceliais e fungos dimórficos

(PELCZAR & JOSEPH, 1997). Agrupa fungos de hifas septadas. A sua principal característica é o asco, estrutura em forma de bolsa, no interior do qual são produzidos os ascósporos, esporos sexuados, com forma, número e cor variáveis para cada espécie. Conídios, propágulos sexuados são também encontrados. Compreende 80% das espécies fúngicas patogênicas e oportunistas. Três classes nesse filo possuem espécies patogênicas para o homem: *Hemiascomycetes*, *Loculoascomycetes* e *Plectomycetes* (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008). Os ascomicetos desempenham um papel ecológico importante na degradação de moléculas animais e vegetais resistentes como a celulose, a lignina e o colágeno (PELCZAR & JOSEPH, 1997).

5.1.2 Filo *Basidiomycota*:

Os basidiomicetos podem ser distinguido de todos os outros fungos por possuírem basídio, uma estrutura reprodutiva microscópica em forma de clava onde ocorre a cariogamia e meiose (PELCZAR & JOSEPH, 1997). Compreende os fungos superiores ou cogumelos comestíveis. Apresentam hifas septadas, e são caracterizados pela produção de esporos sexuados externos, os basidiósporos, típico para cada espécie. Conídios ou propágulos assexuados podem ser encontrados. A classe *Teliomycetes* contém a espécie patogênica mais importante, *Filobasidiella neoformans* (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

5.1.3 Filo *Zigomycota*

Inclui os fungos de micélio cenocítico, ainda que septos possam separar estruturas como esporângios. A reprodução pode ser sexuada pela formação de zigosporos e assexuada com a produção de esporos, os esporangiosporos, no interior de esporângios. A classe dos *Zygomycetes* contém fungos de interesse médico, encontrados nas ordens *Mucolales* e *Entomophthorales* (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

5.1.4 *Deuteromycetes* (Fungos Mitospóricos)

Todos os fungos que não têm conexão com *Ascomycetes* e *Basidiomycetes* são incluídos no grupo artificial dos *Deuteromycetes*. Outros termos como fungos imperfeitos, fungos assexuados e fungos conidiais têm sido usados para designar

esses organismos. Ainda que outros fungos possuam estruturas assexuadas, como *Omycota* e *Zygomycota*, estes organismos nunca foram tratados como *Deuteromycetes*. A grande maioria dos fungos desse grupo tem habitat no solo e são os principais componentes da microbiota atmosférica. Fungos patogênicos e oportunistas, em sua maioria estão, no grupo dos *Deuteromycetes*, entre as classes *Blastomycetes*, *Coelomycetes* e *Hyphomycetes* (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

Algumas espécies desse grupo são importantes na indústria e na medicina. Um dos antibióticos mais conhecidos, a penicilina, é produzida pelo *Penicillium notatum* e *P. chrysogenum*. Um dos patógenos oportunistas mais comuns é a *Candida albicans* (PELCZAR & JOSEPH, 1997).

6. LEVEDURAS ENVOLVIDAS EM INFECÇÕES INVASIVAS

6.1 *Candida*

Várias espécies do gênero *Candida* existem como comensais das membranas das mucosas na maioria dos indivíduos saudáveis e de outros animais de sangue quente onde crescem sem causar qualquer dano (RAMAGE *et al.*, 2001; SULLIVAN *et al.*, 2004). No entanto, em condições de comprometimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro, as leveduras deste gênero podem se tornar patogênicas (NIEWERTH & KORTING, 2002).

Este fungo leveduriforme apresenta como os principais fatores de virulência: aderência, variabilidade fenotípica (“switching”), produção de toxinas e enzimas extracelulares. A aderência se deve a características químicas e estruturais da parede celular. O composto químico que permite a união é uma manoproteína, enquanto que a estrutura é uma capa fibrilar que recobre a parede. Tem-se descrito também outras moléculas de aderência, como as adesinas (lectinas e glicoproteínas de superfície), que se aderem a receptores protéicos (laminina, fibronectina e fibrina) presentes na superfície celular das mucosas. Esta interação pode ser influenciada pela temperatura, pH, nutrientes, IgA secretória e hidrofobicidade superficial celular (GHANNOUM & RICE, 1999; GREENFIELD, 1992).

As exoenzimas fosfolipases desempenham um papel importante na patogênese de fungos oportunistas, bem como um papel ativo na invasão do tecido do hospedeiro durante a candidíase. Por clivagem de fosfolípidios, a fosfolipase desestabiliza a membrana celular e promove lise desta membrana (SCHEID *et al.*, 2010). Essas fosfolipases extracelulares têm um papel significativo na patogênese da infecção e invasão ao epitélio da mucosa. Além disso, vários estudos mostram que isolados clínicos de *C. albicans* tem nível mais elevado de atividade de fosfolipase extracelular quando comparado com isolados comensais (Fig. 3) (MAHMOUDABADI, ZARRIN & MIRY, 2010).



Fig. 3: Atividade de fosfolipase de *C. albicans* em Ágar Sabouraud dextrose suplementado com gema de ovo, demonstrando a diferença no diâmetro do halo branco produzido por isolados clínicos e comensais. Fonte: Mahmoudabadi, *et al.*, 2010.

Desde a descrição de um método de placa para a detecção de atividade de fosfolipase em *C. albicans* por PRICE *et al.* (1982), este tornou-se método de triagem para a atividade de fosfolipase tradicionais entre as espécies de *Candida* bem como para outras leveduras como *Cryptococcus neoformans* e *Malassezia pachydermatis* que também apresentam fosfolipases.

No gênero *Candida* existem muitas leveduras que produzem pseudo-hifas ou micélio verdadeiro (fator favorece o potencial invasivo desse gênero), vista ao exame direto do Gram e/ou cultura. A *C. albicans*, entre outras, possui a particularidade de emitir tubos germinativos após incubação em contato com soro humano à $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ por duas a três horas em observação microscópica. Mas, no entanto, alguns isolados de *C. albicans* não formam tubo germinativo em condições ideais. Desta maneira, devem ser realizados outros testes para a sua identificação, com base nas propriedades bioquímicas, fisiológicas e genéticas como a capacidade

de assimilação dos açúcares, produção de clamidósporos ou produção de enzimas e identificação molecular (CONCEIÇÃO *et al.*, 2005).

A candidemia está entre as principais causas de infecções da corrente sanguínea e está associada com mortalidade significativa (FALAGAS *et al.*, 2010). A incidência de candidemia está crescendo com o aumento da complexidade dos procedimentos cirúrgicos, a existência de populações de pacientes em maior risco de infecção e as mudanças do paciente de acordo com características demográficas. Sua incidência global elevou-se cinco vezes nos últimos dez anos e as leveduras do gênero *Candida* estão atualmente entre a quarta e sexta infecção da corrente sanguínea mais comum na América do Norte e na Europa (BASSETTI *et al.*, 2011).

No entanto, as taxas de candidemia podem variar geograficamente. Por exemplo, uma incidência crescente de candidemia na Islândia foi relatada no período entre 1980 e 1999 (ASMUNDSDO'TTIR, ERLENDSDO'TTIR & GOTTFREDSSON, 2002), mas o mesmo não foi observado na Suíça, onde um estudo nacional de vigilância mostrou que a incidência de candidemia manteve-se inalterada durante o período de 1991 a 2000 (MARCHETTI *et al.*, 2004). Parece, portanto, que existem diferenças entre diferentes países na epidemiologia da candidemia, ressaltando a necessidade de vigilância contínua para monitorar tendências da incidência, a distribuição das espécies, e os perfis de susceptibilidade à drogas antifúngica. A epidemiologia de candidemia tem sido estudada extensivamente nos Estados Unidos, Europa e alguns países da América do Sul (BASSETTI *et al.*, 2011).

A *Candida* é uma importante causa de infecções da corrente sanguínea, causando mortalidade e morbidade significativa em ambientes de cuidados de saúde. Globalmente, dentre as espécies de *Candida* isoladas, a *C. albicans* é responsável por cerca de 50% dos casos de infecções nosocomiais e as outras espécies não-albicans juntas equivalem aos outros 50% dos casos. As não-albicans incluem *C. parapsilosis* (28,4%), *C. glabrata* (9,5%), *C. tropicalis* (6,6%) e *C. krusei* (2,6%). (BASSETTI *et al.*, 2011).

A *C. parapsilosis* é uma das principais causas de candidose sistêmica. Indivíduos com maior risco de infecção grave são recém-nascidos e pacientes em

unidades de terapia intensivas. As espécies de *C. tropicalis* e *C. krusei* são as principais causadoras de infecções fúngicas invasivas em pacientes submetidos à transplante de medula óssea ou de células-tronco, e em pacientes com doenças hematológicas malignas (TRIFILIO, SINGHAL, WILLIAMS, *et al.*, 2007 ; LEUNG, CHIM, HO, *et al.*, 2002).

A *C. dubliniensis* tem sido frequentemente associada à candidíase oral e sistêmica em pacientes HIV positivos, pacientes utilizando quimioterapia e que receberam transplante de medula óssea, sendo responsável às vezes, por casos de morte (RIBEIRO *et al.*, 2011). A *C. dubliniensis* é um importante patógeno implicado no desenvolvimento de candidose orofaríngea em indivíduos HIV-positivos (NONAKA *et al.*, 2008). Estudos desenvolvidos na América do Norte e na Irlanda revelaram prevalências de *C. dubliniensis* na cavidade oral de indivíduos HIV-positivos variando entre 11,1-17,5% (KIRKPATRICK *et al.*, 1998; MEILLER *et al.*, 1999) e 18-32% (POTON *et al.*, 2000), respectivamente. Por sua vez, análises da microbiota oral de pacientes HIV-positivos, realizadas em países da América do Sul, demonstraram menor prevalência desta levedura, variando entre 1,1-3,9% (HARTUNG *et al.*, 2005; SANO *et al.*, 2000; MILLAN *et al.*, 2001).

As razões para esta diferença entre as frequências de isolamento de *C. dubliniensis* da cavidade oral de indivíduos HIV-negativos e HIV-positivos são desconhecidas. É provável que a prevalência da *C. dubliniensis* na cavidade oral de indivíduos saudáveis tenha sido subestimada devido ao uso de métodos ineficientes de identificação ou à coleta em sítios anatômicos não habitados por esta levedura (SULLIVAN *et al.*, 2004; SULLIVAN *et al.*, 2005).

Em contra partida, a *C. guilliermondii* é um componente da microbiota humana e raramente é isolada como patógeno nos pacientes. Devido a menor frequência, elas são menos estudadas quando comparadas as outras espécies de *Candida* causadoras de infecções. Além disso, parece ser umas das espécies menos virulentas entre as leveduras deste gênero (PASQUALOTTO, ANTUNES & SEVERO, 2006).

A *C. rugosa* é uma levedura que parece estar emergindo como causa de infecção em algumas regiões geográficas. Embora bastante raras como causadoras

de infecções invasivas essa levedura foi recentemente citada como um possível fungo patogênico “emergente” (PFALLER *et al.*, 2006). A fungemia causada devido a esta espécie de *Candida* não foi relatada antes de 1985, no entanto quando associada à fungemia em catéter foi relatada em duas diferentes instituições dos Estados Unidos (REINHARDT *et al.*, 1985; SUGAR & STEVENS, 1985). Posteriormente, DUBE *et al.* (1994), relataram 15 episódios de candidemia por *C. rugosa* em pacientes com queimaduras e recebendo tratamento com nistatina tópica em um hospital dos EUA. Nenhuma fonte das infecções de fato foi encontrada, no entanto, os isolados mostraram-se resistentes à nistatina e susceptibilidade reduzida para anfotericina B e fluconazol.

Mais recentemente, um conjunto de seis episódios de candidemia causada por *C. rugosa* foi relatada no Brasil (COLOMBO *et al.*, 2003). Os dados da vigilância revelaram que essa espécie foram colonizadores frequentes de pacientes de alto risco e foi responsável por 44% dos 32 episódios consecutivos de fungemia em um centro de atendimento terciário brasileiro (ROSAS *et al.*, 2004). Esses relatórios sugerem que a *C. rugosa* pode apresentar sensibilidade diminuída para os polienos e fluconazol; pode causar fungemia relacionada ao cateter em pacientes em estado grave; pode ser transmitida de paciente para paciente no ambiente hospitalar e pode ser endêmica em certas instituições (NUCCI & MARR, 2005). Mesmo com essas observações, há uma escassez de informações sobre a epidemiologia, frequência de ocorrência e perfil de susceptibilidade antifúngica dessa espécie incomum de *Candida* (PFALLER & DIEKEMA, 2004).

Em pacientes com acúmulo de fatores de risco para candidemia, como uso de cateter em UTI, na qual a probabilidade desta infecção é alta, os médicos utilizam tratamentos empíricos disponíveis antes dos resultados laboratoriais de identificação e de antifungogramas. A terapia empírica é utilizada em indivíduos com sintomas de infecção sem fonte óbvia, que recebem terapia com base em razões clínicas. Pacientes instáveis podem se beneficiar utilizando medicamentos de amplo espectro antifúngico, que pode ser reduzido uma vez que o paciente tenha se estabilizado e a identidade da espécie infectante seja estabelecida. Em pacientes estáveis, uma abordagem mais clássica usando o fluconazol pode ser satisfatória desde que o paciente não esteja colonizado com isolados resistentes ao fluconazol ou desde que

não tenha havido uma exposição prévia recente a um azol (<30 dias), seguido da anfotericina b (GUERY *et al.*, 2009).

6.2 *Cryptococcus*

A Criptococose é uma infecção sistêmica causada por um basidiomiceto naturalmente encapsulado do gênero *Cryptococcus*. Esta levedura causa diferentes infecções humanas, variando de colonização pulmonar assintomática até meningite e doenças disseminadas. A criptococose é causada por duas espécies: *C. gattii* encontrada em climas tropicais e subtropicais e geralmente causa doenças em hospedeiros imunocompetentes enquanto *C. neoformans* presente em fezes de pombos urbanos, tem uma distribuição mundial e é causa de infecção comumente oportunista. Especificamente, as condições predisponentes a uma mudança na imunidade celular têm sido associadas com um aumento significativo no risco para obter a criptococose, e estas incluem imunossuprimidos por infecções por HIV, transplantes de órgãos e recebimento de terapia imunossupressora, como quimioterapia. A criptococose, uma das mais comuns infecções fúngicas oportunistas em pacientes com SIDA, é associada a uma alta taxa de mortalidade nesse grupo (GAZZONI *et al.*, 2009).

Microscopicamente, as leveduras do gênero *Cryptococcus* são células esféricas, 4-10 μm de diâmetro, cercados por uma cápsula polissacarídica (as células podem apresentar diâmetro $\geq 20 \mu\text{m}$ se a cápsula for incluída na medida), que é um importante fator de virulência (KONEMAN *et al.*, 2008). *Cryptococcus* não-*neoformans* são saprófitas e são raramente relatados como patógenos humanos. *Cryptococcus* não-*neoformans* são leveduras que prevalentes em todo o mundo e foram identificadas a partir de várias fontes ambientais, incluindo ar, água, solo, fezes de pombos, e alimentos tais como queijo, leite, feijão e vinho (MICELI *et al.*, 2011). No entanto, casos esporádicos de infecções criptocócica não-*neoformans* tem sido relatadas por pacientes imunodeprimidos, especialmente aqueles com infecção avançada por HIV e pacientes com câncer que são submetidos a cirurgia de transplante. As espécies de *C. laurentii* e *C. albidus* causam 80% dos casos destas infecções. No entanto, *C. curvatus*, *C. humicolus* e *C. uniguttulatus* também tem sido associados com infecções oportunistas em seres humanos (KHAWCHAROENPORN, APISARNTHANARAK & MUNDY, 2007).

Espécies de *Cryptococcus* podem colonizar os seres humanos através do trato respiratório e gastrointestinal. As manifestações clínicas são geralmente indistinguíveis daquelas de infecções por *C. neoformans*. Os locais mais comuns de infecção são a corrente sanguínea e sistema nervoso central (SNC), seguido por sítios pulmonares e da pele, olhos, trato gastrointestinal e peritônio em pacientes submetidos à diálise peritoneal ambulatorial (KHAWCHAROENPORN, APISARNTHANARAK & MUNDY, 2007; FURMAN, NAUMNIK & MYSLIWIEC, 2009).

Dados sobre a resistência a medicamentos de *Cryptococcus* não-*neoformans* são escassos. De acordo com estudos realizados por PFALLER *et al.* (2006) e KHAWCHAROENPORN *et al.* (2007), o fluconazol e a flucitocina têm baixa atividade contra *Cryptococcus* não-*neoformans*. Estes autores, descobriram ainda que a resistência ao fluconazol é mais freqüente em pacientes com exposição prévia a azóis quando comparado a pacientes que ainda não ministraram azóis. Em um estudo realizado por DENNING (2003), observou-se que espécies de *Cryptococcus* são naturalmente resistentes a equinocandinas.

6.3 *Wickermomyces anomalus* (*Pichia anomala*)

A *W. anomalus*, levedura ascomicética, é frequentemente associada com alimentos e produtos da alimentação, seja como um organismo de produção ou como uma levedura que causa deterioração (MASOUD *et al.*, 2004; SUJAYA *et al.*, 2004). Estas pertencem às leveduras não *Saccharomyces* de vinho e contribui para o aroma do vinho pela produção de compostos voláteis. A capacidade de crescer em alimento humano e animal e ambientes preservados é devido à sua capacidade de crescimento sob baixo pH, pressão osmótica elevada e baixa tensão de oxigênio (FREDLUND *et al.*, 2002).

A *W. anomalus*, também foi encontrada em isolados clínicos e é considerada um patógeno oportunista em hospedeiros imunodeprimidos (HAZEN, 1995). Embora capaz de crescer em uma ampla faixa de pH e de alta pressão osmótica, ela não é particularmente tolerante ao etanol e acetato (KALATHENOS *et al.*, 1995; FREDLUND *et al.*, 2002). Vários relatos têm apontado a *W. anomalus* como causa de um grande espectro de infecções invasivas, sendo fungemia a mais comum. É considerada uma levedura hematogênica emergente, havendo escassos dados sobre a susceptibilidade aos antifúngicos (Da MATTA *et al.*, 2007).

Por outro lado, as toxinas dessa levedura têm um potencial como agente antimicrobiano. A levedura pode usar uma ampla gama de fontes de nitrogênio e fósforo, o que torna um potencial agente para diminuir a poluição ambiental por resíduos orgânicos provenientes da agricultura (PASSOTH *et al.*, 2006).

A fisiologia e genética desta levedura são pouco conhecidas. Os primeiros relatos sobre uma caracterização geral fisiológica e genética, bem como a manipulação genética molecular foram recentemente publicados (GREVESSE *et al.*, 2003; NAUMOV *et al.*, 2001; FREDLUND *et al.*, 2004). A nova aplicação de *W. anomalus* é seu uso como agente de controle biológico, que é baseado no potencial de inibir uma variedade de fungos em diferentes ambientes (PASSOTH *et al.*, 2006).

6.4 *Trichosporum*

Trichosporon é um gênero de levedura basidiomicética, que produz hifas septadas, artroconídios, blastoconídios e pseudohifas. A presença de blastoconídios com hifas diferencia *Trichosporon* de *Geotrichum* (MELCHER *et al.*, 1991). As principais espécies desse gênero que levam à infecções fúngicas invasivas são *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. inkin*, *T. mucoides* e *T. ovoides*. Antigamente todas estas espécies eram classificadas como *T. beigelii* (FLEMMING, WALSH & ANAISSIE, 2002). Espécies de *Trichosporon* podem ser encontradas no solo e água fresca, e são parte da microbiota normal da pele humana e do trato gastrointestinal. A infecção pode ser superficial, subcutânea ou sistêmica. *T. ovoides* causa piedra branca, que é uma infecção superficial que ocorre mais comumente em regiões tropicais e subtropicais.

A infecção invasiva por *Trichosporon* tem sido cada vez mais identificada durante os últimos 30 anos. A maioria dos casos ocorrem em pacientes com doenças hematológicas, particularmente aqueles com leucemia aguda (GIRMENIA, *et al.*, 2005). A infecção pode ocorrer em pacientes com queimaduras extensas, AIDS e uso crônico de corticosteróides, além de cirurgia de válvula cardíaca (GIRMENIA *et al.*, 2005; RUAN, CHIEN, HSUEH, 2009).

Espécies de *Trichosporum* são a segunda causa mais comum de fungemia em pacientes com doenças hematológicas malignas (depois de espécies de *Candida*) e são caracterizados pela resistência à anfotericina B e equinocandinas.

Além disso, possuem um mau prognóstico (FLEMMING, WALSH & ANAISSIE, 2002). Características clínicas da infecção disseminada por *Trichosporum* incluem hemocultura positiva, insuficiência renal, infiltrado pulmonar, lesões de pele e doença hepática crônica (WALSH *et al.*, 2004). A anfotericina B não tem atividade fungicida contra *Trichosporum* e *in vitro* a susceptibilidade a esta droga é variável. A flucitosina e equinocandinas são ineficazes contra as infecções por estas leveduras. Estudos clínicos e *in-vitro* sugerem que os azólicos, principalmente voriconazol e posaconazol, têm maior eficácia contra leveduras do gênero *Trichosporon*. As espécies *T. mucoides*, *T. inkin* e *T. ovoides* parecem ser muito mais suscetíveis à fluconazol que *T. asahii* (*T. beigeli*) ou *T. cutaneum*. O antifúngico voriconazol tem atividade muito boa contra espécies de *Trichosporon*, além de *T. beigeli* ou *T. cutaneum*. No entanto, o prognóstico é pobre sem recuperação da função imunológica (MICELI *et al.*, 2011).

6.5 *Malassezia*

O gênero *Malassezia* compreende leveduras lipofílicas e lipodependentes que fazem parte da microbiota normal de seres humanos e de animais. Essas leveduras foram descritas pela primeira vez no século 19 como leveduras de brotamento encontradas na pele de pacientes com dermatite seborreica. Foi nomeado após Louis-Charles Malassez, um cientista francês, tê-las identificado na camada mais externa da epiderme de pacientes com dermatite seborreica. Estas leveduras podem apresentar formas de leveduras ou pseudo-hifas, dependendo das condições da cultura. Em sua forma de levedura, pode ser esférica, oval ou alongada e se reproduzem por brotamento unipolar (LEVIN, 2009; KURTZMAN, FELL & BOEKHOUT, 2011).

Guého *et al.* (1996), reclassificaram as leveduras em sete espécies (*M. furfur*, *M. obtusa*, *M. globosa*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*, *M. pachydermatis* e *M. restricta*) com base na morfologia, microscopia, fisiologia e características biológicas e moleculares. Além delas, na última década, sete novos táxons isolados de humanos saudáveis e animais com lesão de pele, foram aceitos. *M. dermatis*, *M. japonica*, *M. yamatoensis*, *M. nana*, *M. caprae*, *M. equina* e *M. cuniculi*. passando a serem classificadas atualmente englobando 14 espécies (GAITANIS *et al.*, 2012). Um estudo realizado por CABAÑES *et al.* (2010), investiu a microbiota da pele de

coelho, descrevendo a espécie *M. cuniculi*. A validação dessa nova espécie foi suportada pela análise das regiões D1/D2 do gene RNAr 26 S e ITS-5.8 S sequências de genes RNAr. Os resultados destes estudos confirmaram a separação dessa nova espécie a partir do gênero *Malassezia*, bem como a presença de leveduras *Malassezia* sobre lagomorfos.

Para o desenvolvimento e evolução de quadros patológicos associados às espécies do gênero *Malassezia* é necessário que existam fatores predisponentes no hospedeiro. A distribuição de novos casos é esporádica ou associada a surtos nosocomiais em pacientes de unidades de terapia Intensiva, especialmente em contextos pediátricos (MICELI *et al.*, 2011).

Entre as patologias que estão associadas a infecções por espécies do gênero *Malassezia* podemos citar pitiríase versicolor, foliculite pitirospórica e infecções sistêmicas. Já na dermatite seborréica, na dermatite atópica, e outros quadros patológicos, o papel patogênico da *Malassezia* spp. não está claramente definido, embora seus quadros clínicos possam ser agravados ou desencadeados por esta levedura (SCHLOTTFELD *et al.*, 2002). *Malassezia* spp. também têm sido associados com doenças cutâneas e sistêmicas em pacientes imunocomprometidos, incluindo foliculite, dermatite seborréica, fungemia relacionada a cateter e uma variedade de infecções invasivas profundas (TRAGIANNIDIS *et al.*, 2009).

De acordo com um relato de caso realizado na Espanha por Cuevas *et al.* (1999), uma criança submetida a internação na Unidade de Terapia Intensiva por 64 dias foi diagnosticada com sepse neonatal causada por *M. furfur*. A sepse neonatal causada por *M. furfur* tem sido associada à prematuridade, baixo peso, administração de emulsões lipídicas por cateter via central. O tratamento destes pacientes por longos períodos de tempo favorece a colonização da pele, o que representa um risco de contaminação do cateter que pode favorecer a entrada do micro-organismo, cujo crescimento é alimentado pela ingestão de lipídios, provocando assim a infecção sistêmica (LONG & KEYSERLING, 1985; SIZUN *et al.*, 1994).

Para facilitar a invasão dos tecidos, alguns micro-organismos produzem enzimas hidrolíticas que destroem a membrana das células e leva uma ruptura ou disfunção da mesma. A produção de fosfolipases tem sido demonstrada por

diferentes espécies do gênero *Malassezia* (RICIPUTO *et al.*, 1996; COUTINHO & PAULA, 2000; MANCIANTI *et al.*, 2000). Riciputo *et al.* (1996) relataram que estas enzimas são mais frequentemente produzidas por cepas (*M. furfur*) isoladas de pacientes com lesões quando comparada com aqueles isolados de indivíduos saudáveis.

Quando à susceptibilidade aos antifúngicos, um estudo realizado por GUPTA *et al.* (2000) avaliou 55 estirpes de sete espécies de *Malassezia*. Várias concentrações (0,03-64,0 microg/mL) de três fármacos azólicos (cetoconazol, voriconazol e itraconazol) bem como alilamina (terbinafina), usando o método de diluição em ágar, foram testados. Todos os estirpes das sete espécies foram sensíveis às três drogas azólicas em baixas concentrações. *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. slooffiae*, *M. pachydermatis*, *M. globosa*, *M. obtusa* e *M. restricta* foram mais sensíveis ao cetoconazol e itaconazol. O antifúngico recentemente introduzido, voriconazol, também foi muito eficaz. Houve variação na susceptibilidade das sete espécies de *Malassezia* para todos os antifúngicos.

6.6 *Saccharomyces*

Saccharomyces cerevisiae, a levedura comum do “padeiro” ou do “fermentador”, em geral coloniza as mucosas dos seres humanos, parte da flora normal do trato gastrointestinal, do aparelho respiratório e da vagina, mas comumente não é considerada patogênica (KONEMAN *et al.*, 2008; MUÑOZ *et al.*, 2005). Além disso, *Saccharomyces* spp. têm sido utilizados como suplementos nutricionais e administrados para tratamento de diarreia causada por *Clostridium difficile* (KLEIMANN *et al.*, 2011).

Brandão *et al.* (2010) isolaram *S. cerevisiae* em um lago recreacional em Lagoa Santa (Minas Gerais) resistentes à anfotericina B (um isolado) e itraconazol (dois isolados).

Casos ocasionais de fungemia em pacientes imunossuprimidos foram relatados na literatura mais antiga (KONEMAN *et al.*, 2008). OLVER *et al.* (2002), descreveram três pacientes receptores de transplante de medula óssea em uma unidade de hematologia que desenvolveram infecção invasiva por *S. cerevisiae*. Dois destes pacientes morreram. A genotipagem dos isolados invasivos e

carreadores revelou um isolado indistinguível da encontrada nos pacientes que estiveram na mesma unidade no mesmo período, sugerindo infecção cruzada.

A maioria dos relatos descritos de fungemia é em pacientes gravemente enfermos, sendo a maioria com longas internações hospitalares, principalmente em UTI's. Quase todos os pacientes doentes tiveram exposição a levedura (probiótico, usado para tratar diarreia, ou pacientes vizinhos de outros pacientes tratados com probiótico). A maioria dos pacientes eram imunocomprometidos, tinham doenças malignas, receberam tratamentos quimioterápicos ou foram submetidos a uma cirurgia abdominal complicada, sendo os possíveis mecanismos de contaminação a migração da levedura através da mucosa pelas barreiras gastrointestinais danificadas ou infecções pulmonares (CASSONE *et al.*, 2003; FIORE *et al.*, 1998).

No ano de 2003, foi relatado um surto de fungemia por *S. cerevisiae* em uma UTI em Madri. Três pacientes internados na nesse ano foram avaliados. Testes de susceptibilidade foram realizados tendo como controle de qualidade de cepas *C. parapsilosis* e *C. Krusei*. Os agentes antifúngicos utilizados foram anfotericina B, flucitosina, fluconazol, itraconazol e voriconazol. Para anfotericina B, os pontos finais de MIC foram definidos como a menor redução de concentração da droga, exibindo crescimento de $\geq 90\%$, em comparação com a do controle de crescimento. Para flucitosina e azóis, o ponto final de MIC definida como a menor concentração da droga exibindo uma redução no crescimento de 50% (MUÑOZ *et al.*, 2005).

6.7 *Rhodotorula*

Rhodotorula spp. são leveduras pertencentes à família Cryptococcaceae e são onipresentes no ambiente e no corpo humano (TUON & COSTA, 2008; GARCÍA *et al.*, 2010). São contaminantes transportados pelo ar que podem se tornar comensais na pele e podem ser isolados na urina e nas fezes. No passado, as infecções eram raras; entretanto, atualmente *R. mucilaginosa* está entre os agentes "emergentes" de infecção. A fungemia está mais associada a cateteres colonizados ou a soluções endovenosas contaminadas com esta levedura (KONEMAN *et al.*, 2008). Espécies de *Rhodotorula* têm sido cada vez mais reconhecidas como patógenos emergentes, particularmente em pacientes imunocomprometidos (TUON & COSTA, 2008; GARCÍA *et al.*, 2010). A *R. mucilaginosa* anteriormente conhecida como *R. rubra*, é uma levedura uréase-positiva, que não é capaz de fermentar

açúcares, porém pode assimilar vários carboidratos. Suas colônias caracterizam-se pela coloração rosa-salmão e coral-vermelho (NEOFYTOS; HORN & DE SIMONE, 2007).

Rhodotorula spp. pode formar biofilme segundo ELVERS, LEEMING, LAPPIN-SCOTT (2002), o que pode explicar a ocorrência frequente de fungemia associadas à cateteres. Tal como acontece com outras infecções fúngicas associadas a cateteres, a remoção deste frequentemente é suficiente para resolver a fungemia (ANATOLIOTAKI *et al.*, 2003).

Um estudo realizado em Madri, na Espanha, demonstrou a importante participação dessa levedura em infecções hospitalares, principalmente em pacientes hematológicos. O mais comum distúrbio hematológico diagnosticado foi a presença de leucemia aguda, representando 65,5 % dos casos. Dos 29 casos de fungemia 79,3% foi causada pela *R. mucilaginosa*, sendo que a maioria dos casos (58,6%) tinham fatores de risco simultaneamente. Os fatores predisponentes mais comuns foram a presença de cateter venoso central (CVC, 100%) e neutropenia (62,1%). Um número substancial de pacientes (81,5%) receberam tratamento antifúngico com anfotericina B. Pacientes com leucemia aguda tiveram uma maior taxa de mortalidade (15,7%) do que pacientes com linfoma não-Hodgkin (0%), sugerindo que pacientes com leucemia aguda podem ser geridos como pacientes de alto risco e que medidas intensivas podem ser tomadas. Além disso, parece que o subgrupo de pacientes sem leucemia aguda têm um bom resultado e podem ser geridos como pacientes de baixo risco com uma abordagem menos intensiva (GARCÍA *et al.*, 2010).

De acordo com Gómez-López *et al.* (2005), fluconazol é inefetivo *in vitro* para a maioria dos isolados de *Rhodotorula* spp., enquanto anfotericina B e flucitosina mostram boa atividade *in vitro*.

6.8 Geotrichum

As infecções causadas por *Dipodascus capitatus*, também conhecido como *Geotrichum capitatum* são raras e de difícil tratamento. *Dipodascus capitatus* constitui-se no estágio teleomórfico de *Geotrichum capitatum*, ambos os fungos leveduriformes da classe Endomycetes, divisão Ascomycota do reino Fungi. Esta

espécie já foi nomeada *T. capitatum* e *Blastoschizomyces capitatus*. Este fungo é considerado um comensal do trato respiratório e digestivo de indivíduos sadios (DE HOOG *et al.*, 2000). As infecções oportunistas por *D. capitatus* (*G. capitatum*) acometem pacientes imunocomprometidos, todavia, aqueles com malignidades hematológicas são os mais vitimados. As infecções invasivas ocorrem exclusivamente em pacientes neutropênicos, notadamente naqueles recebendo quimioterapia intensiva para leucemia agudas. As infecções disseminadas causadas por *G. capitatum* são raras, com menos de 100 casos relatados; a utilização de antibacterianos de amplo espectro e uso de cateteres, contribuem no agravamento, manifestado pelo surgimento de lesões na pele ou mucosas (DE HOOG *et al.*, 2000; ERSOZ *et al.*, 2004).

Um caso foi relatado recentemente em Santa Maria, Rio Grande do Sul, de infecção sistêmica causada por *Geotrichum* em paciente com leucemia mielocítica aguda, com evolução fatal. A paciente de 17 anos procurou atendimento no Hospital Universitário de Santa Maria, relatando febre, náuseas, sudorese, tonturas e dor na axila esquerda há duas semanas. Ao exame físico apresentava palidez, febre e lesões crostosas sugestivas de Herpes simplex na coxa esquerda. O hemograma revelou leucocitose ($51.000/\text{mm}^3$) com células blásticas (68%), granulócitos (7,3%) e monócitos (22%); as plaquetas somavam $137.000/\text{mm}^3$ e hemoglobina era de 6,1g/dL. Confirmou-se o diagnóstico de Leucemia mielóide aguda com imunofenótipo CD13 e CD33 positivos. A paciente evoluiu com sepse acompanhada de hematêmese, melena, hematúria e insuficiência renal aguda, requerendo diálise peritoneal. Após exames laboratoriais como hemocultura e microcultivo, foi realizada identificação genotípica, na qual baseou-se na sequência obtida pela amplificação da região D1/D2, a qual, comparada com o banco de dados do GenBank, identificou o fungo como *Dipodascus capitatus* (LAFAYETTE *et al.*, 2011).

7. SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

7.1. Anfotericina B

As anfotericinas A e B são antibióticos antifúngicos produzidos pela bactéria *Streptomyces nodosus*. Destas, somente a anfotericina B tem aplicação clínica

(SILVA, 2010). A anfotericina B é um macrolídeo heptaênico e pertence a uma família de cerca de 200 antibióticos poliênicos (BRUTON, LAZO & PARKER, 2007). Possui, entre os antifúngicos, o mais amplo espectro de ação. É ativa contra leveduras clinicamente significantes, inclusive *C. albicans* e *C. neoformans*. Age também contra fungos que causam micoses endêmicas, como por exemplo *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* e *Coccidioides immitis*. É ativa também contra mofo, tais como *Aspergillus fumigatus* e *Mucor*. Alguns fungos tais como *C. lusitanae* e *Pseudallescheria boydii*, apresentam resistência intrínseca à anfotericina B (SILVA, 2010).

Para exercer sua atividade antifúngica, o fármaco depende principalmente de sua ligação a um grupo esterol, primariamente o ergosterol presente na membrana dos fungos sensíveis. Em virtude de sua interação com esses esteróis, os agentes poliênicos parecem formar poros ou canais que aumentam a permeabilidade da membrana, permitindo o extravasamento de uma variedade de pequenas moléculas (BRUTON, LAZO & PARKER, 2007).

Frequentemente, o uso da anfotericina B é limitado pela sua toxicidade, especialmente nefrotoxicidade. Esse fato provocou o desenvolvimento de formulações lipídicas da anfotericina, devido à suposição de que a droga administrada num invólucro lipídico (lipossomo) se ligaria menos facilmente às membranas celulares dos mamíferos, permitindo o uso de doses eficazes da droga com menos toxicidade. Nas formulações de anfotericina lipossômica, a droga ativa é colocada em veículos lipídicos de administração, diferentemente das suspensões coloidais ainda em uso. A anfotericina se liga aos lipídios desses veículos com uma afinidade situada entre a afinidade pelo ergosterol fúngico e aquela pelo colesterol humano. O veículo lipídico serve como reservatório de anfotericina reduzindo a ligação não específica às membranas celulares dos seres humanos. Essa preferência de ligação reduz a toxicidade da anfotericina sem sacrifício da sua eficácia e permite o uso de doses mais elevadas. Além disso, alguns fungos possuem lipases, que podem liberar a anfotericina B diretamente no local da injeção (SILVA, 2010).

A anfotericina B tópica também é utilizada na candidíase cutânea. Comercialmente encontra-se em forma de loção, creme e pomada, todas contêm 3%

de anfotericina B e são aplicadas sobre a lesão (BRUTON, LAZO & PARKER, 2007). Quanto à resistência fúngica, alguns isolados de *C. lusitaniae* mostraram-se relativamente resistentes à anfotericina B. A resistência primária à anfotericina B é de ocorrência limitada. Alguns patógenos emergentes como *Aspergillus* spp., *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., *Scopulariopsis* spp. e *Trichosporon beigelii*, todavia, têm demonstrado certo grau de resistência primária *in vitro* (CANUTO & RODERO, 2002; CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 2006). Além disso, alguns casos de infecção disseminada por cepas de *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. albicans* que desenvolveram resistência à anfotericina B durante o tratamento antifúngico têm sido descritos (PEREA & PATTERSON, 2002; ROGERS, 2006). A resistência aos poliênicos está primariamente relacionada a alterações qualitativas e quantitativas dos lipídios da membrana celular fúngica (CANUTO & RODERO, 2002).

7.2 Flucitosina

A flucitosina foi descoberta em 1957, durante uma pesquisa de novos fármacos antineoplásicos, tendo demonstrado potentes propriedades antifúngicas, porém sem ser antineoplásica. É um análogo hidrossolúvel da pirimidina, relacionado com o fármaco quimioterápico fluorouracil (SILVA, 2010). Possui atividade clinicamente útil contra *C. neoformans*, *Candida* spp. e os agentes da cromoblastomicose. Nessas espécies, a determinação da sensibilidade *in vitro* é extremamente dependente do método empregado, e os testes de sensibilidade efetuados em micro-organismos isolados, obtidos antes do tratamento, não exibiram nenhuma correlação com o desfecho clínico (BRUTON, LAZO & PARKER, 2007).

No que diz respeito ao mecanismo de ação, a flucitosina é um fungicida e tem como alvo o DNA dos fungos. Ela é captada pelas células fúngicas através da enzima citosina permease. O fármaco é transformado intracelularmente em fluorouracil e, depois, em monofosfato de 5-fluoruridina que, respectivamente inibem a síntese do DNA e do RNA dos fungos. As células humanas não são capazes de converter a flucitosina em seus metabólitos ativos. A resistência dos fungos à flucitosina parece resultar do metabolismo alterado da flucitosina. Apesar de não ser comum nos isolados primários, a resistência se desenvolve rapidamente no curso de monoterapia com flucitosina (SILVA, 2010).

A resistência a fármacos que surge durante a terapia (resistência secundária) constitui uma importante causa de fracasso terapêutico quando a flucitosina é utilizada isoladamente no tratamento da criptococose e da candidíase. Na cromoblastomicose, o reaparecimento de lesões após a obtenção de uma resposta inicial levou à pressuposição de resistência secundária ao fármaco (BRUTON, LAZO & PARKER, 2007).

7.3 Derivados azólicos

Os derivados azólicos são compostos sintéticos que podem ser classificados em imidazóis e triazóis, de acordo com o número de átomos de nitrogênio no anel azólico e compartilham o mesmo espectro antifúngico e mecanismo de ação. Os imidazóis são representados pelo cetoconazol, miconazol e clotrimazol. O miconazol e clotrimazol só são utilizados como terapia tópica. Os derivados triazólicos são representados pelo itraconazol, fluconazol e voriconazol (SILVA, 2010).

O grupo dos azólicos exibe atividade clinicamente útil contra *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, espécies de *Coccidioides*, *Paracoccidioides brasiliensis* e dermatófitos. Já contra os fungos, *Aspergillus* spp., *Scedosporium apiospermum* (*Pseudallescheria boydii*), *Fusarium* e *Sporothrix schenckii* possuem atividade intermediária. A *Candida krusei* e os agentes causadores da mucormicose mostram-se resistentes. Por conseguinte, esses fármacos não têm nenhuma atividade antibacteriana ou antiparasitária, com possível exceção de seu efeito antiparasitário contra *Leishmania major*, e o azól em fase de investigação, o posaconazol, que exibe alguma atividade *in vitro* contra mucormicose (BRUTON, LAZO & PARKER, 2007).

A atividade antifúngica das drogas azólicas se deve à redução da síntese do ergosterol, através da inibição das enzimas fúngicas do citocromo P450. A especificidade das drogas azólicas resulta da sua maior afinidade pelas enzimas fúngicas do citocromo P450 do que pelas enzimas humanas do citocromo P450. Os imidazóis apresentam menor grau de especificidade do que os triazólicos, o que explica sua maior incidência de interação de drogas e de efeitos adversos (SILVA, 2010).

A resistência aos azólicos é um problema com relação a *C. glabrata*, *C. krusei*, e outras espécies raras. A *C. guilliermondii* mostra suscetibilidade reduzida ao fluconazol (75% de sensibilidade), mas apresenta grande susceptibilidade ao voriconazol (91%) (a-PFALLER *et al.*, 2006). Em trabalho realizado por Pfaller *et al* (2006b) ele observou que 40,5% dos isolados de *C. rugosa* foram sensíveis ao fluconazol e 61,4% ao voriconazol. *C. dubliniensis* podem desenvolver resistência estável ao fluconazol, especialmente em pacientes com HIV/AIDS (MARTINEZ *et al.*, 2002). Isolados clínicos de *C. nivariensis* demonstraram resistência cruzada aos azólicos (BORMAN *et al.*, 2008). Outras estratégias para melhorar resultados em pacientes com infecções fúngicas invasivas incluem o uso de imunomoduladores e de terapias de combinação. O interferon γ , por exemplo, tem papel na candidíase invasiva e em outras infecções fúngicas emergentes (MICELI *et al.*, 2011).

A resistência aos azóis surge através de vários mecanismos. Apesar de rara antigamente, a resistência de diferentes cepas está aumentando devido ao uso crescente de fármacos na profilaxia e tratamento, o que pode condicionar a seleção da resistência clínica a essas drogas (SILVA, 2010). A resistência tem surgido gradualmente durante a terapia prolongada, causando fracassos clínicos em pacientes com infecção muito avançada pelo HIV e candidíase orofaríngea ou esofágica (BRUTON, LAZO & PARKER, 2007).

8. DIAGNÓSTICO

A partir de 1980, devido ao aumento do número de casos de candidemia em nível mundial, houve necessidade do aprimoramento das técnicas de diagnóstico laboratorial. Tendo em vista a gravidade das infecções fúngicas sistêmicas, bem como seu elevado custo socioeconômico, é importante um diagnóstico rápido e preciso para que a intervenção medicamentosa possa ser iniciada precocemente na tentativa de minimizar as elevadas taxas de mortalidade. O diagnóstico clínico, com base na sintomatologia e na anamnese do paciente, não é conclusivo, pois os sinais e sintomas são inespecíficos. Febre e leucocitose seriam os principais indícios de fungemia, porém 20% dos pacientes não desenvolvem hipertermia e apenas 50% apresentam leucocitose. Além disso, mesmo na presença desses sinais, não é

possível supor uma fungemia considerando-se a semelhança com os sinais de bacteremia (GIOLO & SVIDZINSKI, 2010).

8.1 Exame microscópico direto

A observação de um fungo na amostra biológica tem grande valor diagnóstico, pois demonstra a invasão do fungo no tecido e permite uma informação imediata ao médico, a qual pode ser crucial para determinar a terapia apropriada ao paciente. No entanto, se a quantidade da amostra biológica for insuficiente para o exame microscópico e cultura do material, a cultura, na maioria das amostras, tem prioridade sobre o exame microscópico, desde que é método mais específico e em muitos casos, mais sensível. O exame microscópico da amostra é realizado por várias técnicas, dependendo do tipo da amostra e suspeita clínica (ANVISA, 2004).

Recomenda-se exame microscópio direto na maioria das amostras clínicas enviadas para cultura de fungos. Esfregaços direto com tinta nanquim e KOH/calcoflúor, preparações com fita adesiva corada com azul anilina lactofenol e cortes congelados de biópsia de tecido são vários métodos pelos quais podem ser realizados exames microscópicos diretos rápidos. Para exame direto a partir de amostras sanguíneas, frascos para hemocultura comercializados, projetados para o isolamento de bactérias a partir do sangue, não são adequados para isolamento de muitas espécies de fungos. O Isolador System (Wampole Laboratories, Cranbury, NJ) - um tubo especial que contém saponina como agente lisante para células brancas e vermelhas, propilenoglicol com substância anti-espuma, polianetol sulfonato de sódio (SPS) e EDTA como anticoagulantes, e um líquido fluoroquímico inerte para concentrar os micro-organismos durante a centrifugação - mostrou-se muito mais promissor no isolamento direto de fungos de amostras de sangue obtidas de pacientes com sepse micótica. Na utilização desse sistema, é necessário cautela especial durante o estágio de subcultura para evitar contaminação com micro-organismos do ambiente, sendo recomendado o uso de capela de fluxo laminar (KONEMAN *et al.*, 2008).

- EXAME MICROSCÓPICO DIRETO COM HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO (KOH) A 20%

É usado para exame de pelos, pele, unha, tecido obtido por biópsia, exsudatos espessos e outros materiais densos. Colocar uma gota de KOH (aquoso a 20%) em uma lâmina de microscopia e sobre esta, uma porção da amostra a ser examinada. Cobrir a preparação com uma lamínula e, para intensificar a clarificação, aquecer ligeiramente, sobre a chama de um bico de Bunsen, sem deixar ferver a mistura. Examinar a preparação após 20 minutos, em microscópio óptico comum, inicialmente, com objetiva de 10x, seguida de 40x (ANVISA, 2004). Observa-se hifas delicadas ou grumos de esporos (dermatofitoses) e hifas e esporos similares semelhantes a espagete e almôndegas (Tinha versicolor) (KONEMAN *et al.*, 2008).

- EXAME MICROSCÓPICO DIRETO COM TINTA NANQUIM (TINTA DA CHINA)

Utilizada em amostras de líquor, urina, secreções ou exsudatos, para visualização de leveduras capsuladas do gênero *Cryptococcus*, que se tornam mais evidentes contra o fundo negro proporcionado pela tinta. Colocar uma gota de tinta nanquim e uma gota do sedimento da amostra centrifugada, sobre uma lâmina. Cobrir a preparação com lamínula e observar ao microscópio óptico (objetivas de 10x e 40 x). Nesta técnica, um erro bastante frequente é confundir linfócitos com células de leveduras. A diferenciação é feita pela refringência da parede celular e das inclusões no citoplasma das leveduras (Figs. 4 e 5), além da presença de brotamentos (ANVISA, 2004).

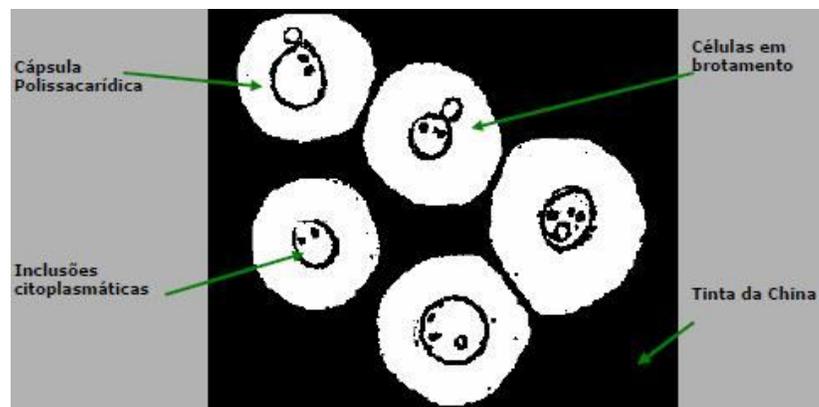


Fig. 4: *Cryptococcus sp.*: leveduras em brotamento rodeadas de halo transparente (cápsula polissacarídica), sobre fundo negro formado pela tinta nanquim. Fonte: ANVISA, 2004.

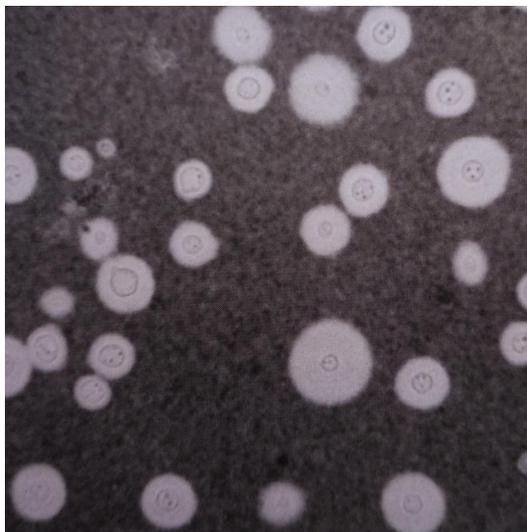


Fig. 5: Fotomicrografia de uma preparação com tinta nanquim, mostrando as células de leveduras esféricas, encapsuladas e de tamanho irregular de *C. neoformans*. Fonte: KONEMAN *et al.*, 2008.

- EXAME MICROSCÓPICO COM COLORAÇÃO PELO MÉTODO DE GRAM

A coloração de Gram, não visa a diferenciação dos fungos, mas possibilita discriminar elementos fúngicos de artefatos (Fig. 6) existentes em urina, secreções e fezes. A amostra é espalhada de modo homogêneo, em movimentos circulares, em uma lâmina de microscopia, fixada com calor e submetida à coloração (ANVISA, 2004).

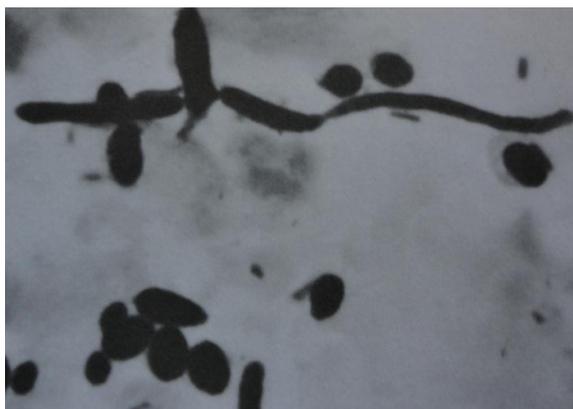


Fig. 6: Fotomicrografia de escarro com coloração de Gram, revelando pseudo-hifas e brotamento de blastoconídios característicos de espécie de *Candida* (em óleo de imersão). Fonte: KONEMAN *et al.*, 2008.

- EXAME MICROSCÓPICO COM COLORAÇÃO PANÓTICA (GIEMSA, LEISHMAN OU WRIGHT)

Estas colorações são usadas para pesquisa de *Histoplasma capsulatum* em diversas amostras biológicas: medula óssea, sangue, aspirados e secreção cutânea. Nestes casos, faz-se um esfregaço semelhante ao usado para coloração de Gram. Fixa-se com metanol e cora-se segundo o método escolhido. Podem ser usadas ainda, para corar “imprints” de tecidos obtidos por biópsia (ANVISA, 2004).

Na suspeita de colonização por *Malassezia spp.* por exemplo, o exame direto, realizado a partir de material colhido pela raspagem da lesão ou com fita adesiva (sinal de Porto), mostra células leveduriformes agrupadas, assemelhando-se a cachos de uvas, e fragmentos de pseudo-hifas, curtos e grossos. O material pode ser apenas clarificado por KOH ou corado com tinta lavável azul ou PAS (ZAITZ, RUIZ & SOUZA, 2000).

8.2 Cultivo

Dois tipos gerais de meios de cultura são essenciais para garantir o isolamento primário de todos os fungos clinicamente importantes a partir de amostras clínicas. Um meio deve ser não-seletivo (como ágar infusão cérebro-coração); isto é, aquele que permitirá o crescimento de praticamente todas as espécies de fungos clinicamente relevantes. O uso de ágar Sabouraud-dextrose como meio de isolamento primário é desencorajado porque não é rico suficiente para isolar espécies de patógenos exigentes, particularmente a maioria dos fungos dimórficos. Em vez disso, recomenda-se o uso de ágar com flocos de batata (PFA), ágar inibidor de mofo (IMA) ou uma combinação de ágar Sabouraud-dextrose e ágar infusão de coração (SABHI). O ágar Sabouraud-dextrose é suficiente para o isolamento de dermatófitos de amostras cutâneas ou de leveduras de culturas vaginais. O uso de ágar Mycosel ou Mycobiotic, que é basicamente Sabouraud-dextrose com adição de cicloheximida e cloranfenicol, pode ser considerado para o isolamento de dermatófitos. O Sabouraud-dextrose (2%) é mais útil como meio para subcultura de fungos isolados em meio enriquecido para aumentar a esporulação típica e fornecer a morfologia mais característica da colônia (KONEMAN *et al.*, 2008).

Um segundo meio, mais seletivo para o isolamento dos fungos, também deve ser utilizado. A adição de um ou mais antibióticos, incluindo penicilina (20 U/ml), estreptomicina (40 U/ml), gentamicina (5 µg/ml) ou cloranfenicol (16 µg/ml) pode ser utilizada para inibir o crescimento das bactérias. Ciclo-heximida em concentração de 5 µg/ml, também pode ser adicionada para evitar o crescimento excessivo de determinados mofo ambientais de crescimento rápido. Fungos patogênicos oportunistas, incluindo *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*, podem ser parcial ou totalmente inibidos pela cicloheximida; portanto, sempre é necessário utilizar simultaneamente um meio não-seletivo (KONEMAN *et al.*, 2008).

Um meio utilizado para diferenciação de *C. albicans* e *C. dubliniensis* é o ágar Sabouraud glicose hipertônica (AGS). Alves *et al.* (2002), relataram que esse meio com 6,5% de NaCl resume-se por ser um teste simples e barato para diferenciar essas duas espécies. Todas as 84 amostras teste de *C. albicans* apresentaram em seu estudo crescimento significativo no meio, enquanto todos os isolados de *C. dubliniensis* não apresentaram qualquer crescimento visualmente detectável.

8.2.1 Características em meios cromogênicos

O CHROMagar™ Candida é um meio comercial amplamente utilizado para a diferenciação de espécies de *Candida* em amostras clínicas mistas. Contém uma combinação de cromogênicos, incluindo o substrato b-hexosaminidase. A identificação é baseada em diferenças de cor produzida por diferentes espécies de *Candida* (Fig. 7) devido a presença de enzimas específicas após crescimento a 37° C por 48 h (ELLS *et al.*, 2009). Foi originalmente desenvolvido para isolamento e identificação presuntiva de algumas espécies de leveduras clinicamente importantes, tais como *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. glabrata*, com base em diferenças de cor e aparências superficiais das colônias (BEIGHTON *et al.*, 1995).

Colônias de *C. albicans* aparecem com uma coloração azul-esverdeada enquanto colônias de *C. dubliniensis* apresentam-se verde, sendo mais proeminente após 72 h de incubação (ELLS *et al.*, 2009).

Estudos realizados por Odds & Davidson (2000) comprovaram a influência da temperatura de incubação na formação da cor de certas espécies incluindo *C. albicans* e *C. dubliniensis*. A incubação a 30° C pode resultar na produção de

colônias com diferentes tons de verde por *C. dubliniensis* e alguns isolados de *C. albicans* produziram colônias verde.

Outros cromogênios contendo substrato hexosaminidase, como Albicans ID2 ágar e Biggy ágar, também são usadas frequentemente, porém 100% de exatidão não são garantidos, uma vez que não são suficientes para a diferenciação de confiança de leveduras ao nível de espécie (IIKIT *et al.*, 2007).

A redução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TCC) em ágar tem sido utilizado para identificar *C. tropicalis* (VELEGRAKI & LOGOTHETI, 1998). Este meio também pode ser utilizado para diferenciar *C. albicans* que não pode reduzir TTC e produz, à luz branca, colônias de coloração rosa, enquanto *C. dubliniensis* pode reduzir TTC e produz colônias vermelhas a marrom.

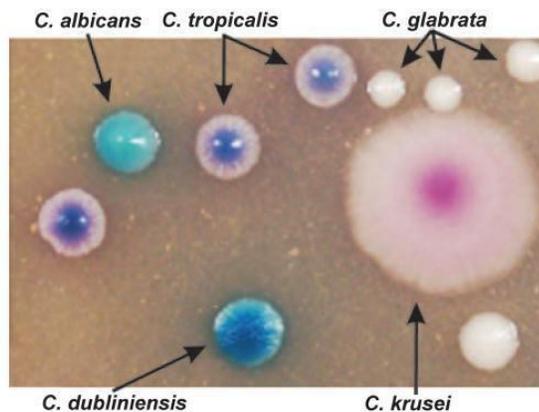


Fig. 7: Crescimento de diferentes espécies de *Candida* em CHROMagar™ *Candida*. Fonte: ELLS *et al.*, 2009.

8.2.2 Fluorescência em ágar azul- metil

Ágar Sabouraud azul- Metil também é relatado como útil para a diferenciação de espécies. A diferenciação é baseada na habilidade de *C. albicans* formar colônias fluorescentes sob a luz de Wood (comprimento de luz UV longa) enquanto *C. dubliniensis* não é capaz de formar. A reação exata entre azul metil e *C. albicans* é desconhecida, mas pode haver uma reação específica com polissacarídeos da parede celular que produz um metabólito fluorescente (YUCESYOY; ESEN; YULUG, 2001). No entanto, este meio também tem suas limitações. Os isolados *C. albicans* podem perder sua fluorescência e os de *C. dubliniensis* podem tornar-se fluorescente após subcultura e armazenamento

do isolado (SULLIVAN & COLEMAN, 1998). Isto indica que este meio só é útil após o isolamento inicial de uma cultura de *Candida*.

8.3 Micromorfologia

8.3.1 Características fenotípicas para a diferenciação de *Candida não-albicans*

Uma das características fenotípicas muito observadas em laboratório é a formação de tubo germinativo para identificação de *C. albicans*. Um tubo germinativo é definido uma extensão filamentosa de uma célula de levedura que tem cerca de metade da largura e três a quatro vezes o comprimento da célula-mãe. O tubo germinativo verdadeiro produzido por *C. albicans* não tem constrição no colo (Fig. 8), uma vez que o tubo germinativo é uma verdadeira estrutura de hifa. Porém, nem todos os isolados de *C. albicans* produzem tubos germinativos (KONEMAN *et al.*, 2008).

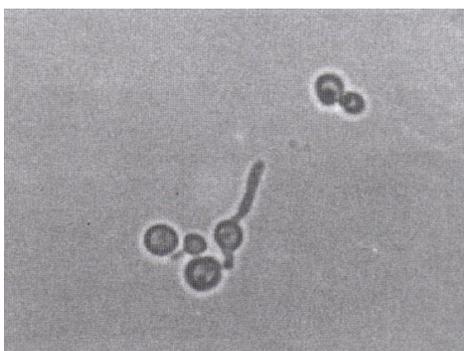


Fig. 8: Fotomicrografia de um tubo germinativo, característico de *Candida albicans* (com óleo de imersão). Fonte: KONEMAN *et al.*, 2008.

O teste com tubo germinativo é feito a partir da remoção de uma pequena porção de uma colônia da levedura isolada a ser testada e suspensão em um tubo de ensaio contendo 0,5 ml de soro humano, sendo posteriormente o tubo incubado a 35° C por não mais de 2 horas. Após esse procedimento, uma gota da suspensão soro-levedura é colocada em uma lâmina de microscópio e examinada microscopicamente quanto à presença de tubos germinativos (KONEMAN *et al.*, 2008).

A produção de tubos germinativos e clamidósporos foram considerados típicos de isolados de *C. albicans* sendo rotineiramente utilizado para identificação

dessa espécie (SULLIVAN *et al.*, 1995). Porém, outra desvantagem da utilização exclusiva desse teste para diagnóstico é a capacidade de outras espécies de leveduras do gênero *Candida* produzirem tubos germinativos em amostras clínicas, como por exemplo, *C. dubliniensis*, que além de tubos germinativos, forma clamidósporos e exibe perfis de assimilação de hidratos de carbono semelhante à *C. albicans* (CHOWDHARY *et al.*, 2011).

8.3.2 Produção de clamidósporos

Clamidósporos são formados a partir de células preexistentes nas hifas, que se tornam espessadas e, amiúde, aumentadas. Podem ser encontrados no interior das hifas (intercalares), ao longo das laterais (sésseis) ou na sua extremidade (terminais) (KONEMAN *et al.*, 2008). Conhecidamente, *C. dubliniensis* tende a formar pares, trigêmeos ou aglomerados de clamidósporos nas extremidades das hifas ramificadas (Fig.10a), enquanto *C. albicans* forma clamidósporos únicos na ponta de uma alongada célula suspensa (Fig.9) (SULLIVAN *et al.*, 1995). No entanto, cuidados devem ser tomados quando se utiliza a produção clamidósporos para diferenciar as espécies. Ellepola *et al.* (2003) demonstraram que em meio agar fubá, acrescido de tween 80 a diferenciação com base na formação de clamidósporos não é confiável, já que *C. dubliniensis* não mostrou padrão constante de formação de clamidósporos.

A presença de hifas hialinas, septadas e ramificadas, caracteriza o gênero *Candida* e se houver formação de clamidósporos indica *Candida albicans*. Formação exclusiva de artrósporos permite identificação de *Geotrichum*, mas quando são formados também blastoconídios trata-se de *Trichosporon* (ANVISA, 2004).

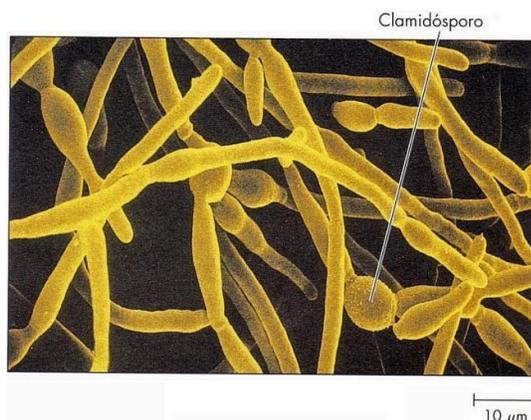


Fig. 9: Clamidósporos no interior das hifas de *C. albicans*. Fonte: TORTORA *et. al.*, 2005.

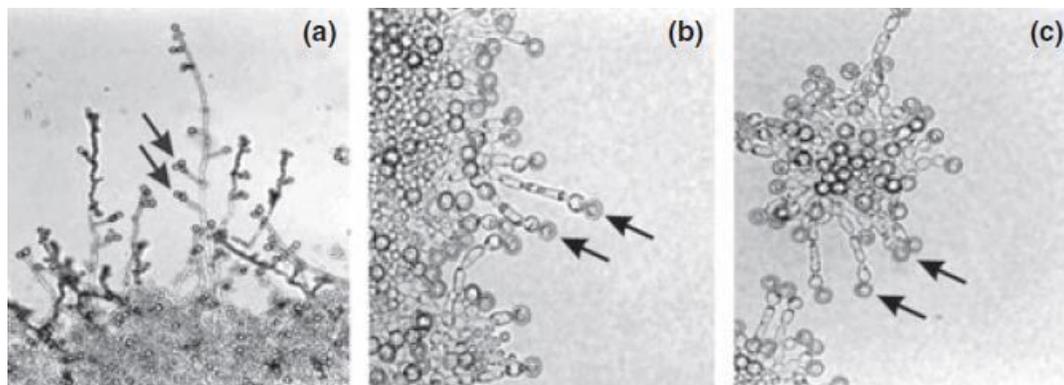


Fig. 10: *Candida dubliniensis* (a e c), *C. albicans* (b) Fonte: ELLS *et al.*, 2009.

(a) Exemplo de um isolado de *C. dubliniensis* demonstrando ocasional trios ou pares de clamidósporos (setas), nas extremidades de hifas. (b) Exemplo de um isolado de *C. albicans* demonstrando um único clamidósporo terminal decorrentes de uma célula suspensora (seta), (c) Exemplo de um isolado *C. dubliniensis* mostrando único clamidósporo terminal (seta) semelhante a (b).

8.4 Teste de assimilação de açúcares

- PROVA DE ASSIMILAÇÃO DE FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO OU AUXANOGRAMA

Nessa prova são usados dois meios, que podem ser adquiridos no comércio, na forma desidratada (Yeast Nitrogen Base e Yeast Carbon Base) ou formulados. A levedura é semeada "pour plate", homogeneizando-se 2 ml de uma suspensão das colônias, a cada meio fundido ou semeada na superfície de cada um dos meios, previamente, distribuídos em 2 placas de Petri. São então adicionadas pequenas alíquotas de diferentes carboidratos que servem de fonte de carbono, sobre a superfície do meio isento de carbono (Fig. 11). Várias substâncias, incluindo álcoois, proteínas e aminoácidos servem de fontes de nitrogênio e são colocadas sobre a superfície do meio isento de nitrogênio. Após incubação à temperatura ambiente ou 25°C, por período de uma semana, a levedura irá assimilar e crescer em volta de determinadas fontes, de acordo com o metabolismo característico de sua espécie. A leitura é feita pelo halo de turvação resultante do crescimento e indica prova de assimilação positiva para a respectiva fonte (ANVISA, 2004).

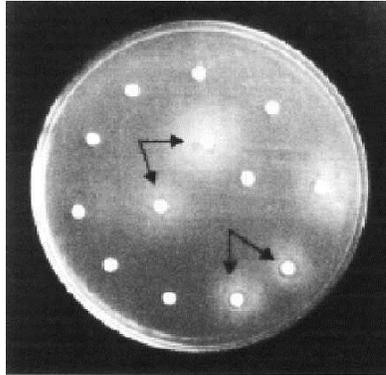


Fig. 11: Teste de assimilação de açúcares. As setas indicam o crescimento da levedura em torno do açúcar (teste positivo). *Fonte:* CHERUBINI, SÁNCHEZ & GARCÍA, 2003.

- Réplica: replica-plate

Lederberg e Lederberg (1952) descreveram um método de revestimento de réplica e demonstrou sua aplicação na seleção de bactérias mutantes. O plaqueamento em réplica é utilizado para facilitar ensaios de rotina que envolve inoculações repetitivas de muitos isolados em meios diferentes. Foi desenvolvido para permitir uma cópia padrão de crescimento microbiano (Fig. 12) a partir de uma placa de ágar inicial para uma série de outros. Tais testes são frequentemente necessários no trabalho de genética, mas o método deve ser aplicável à prática de rotina.

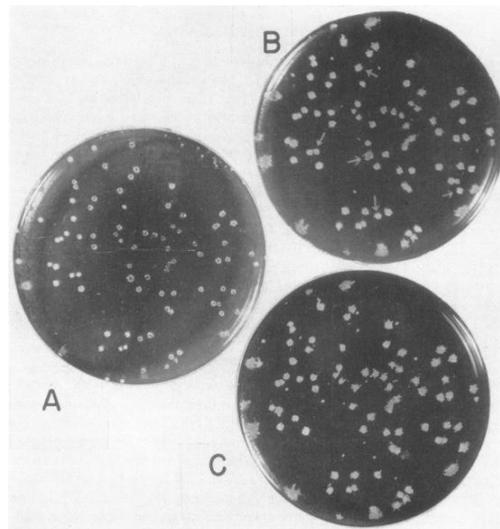


Fig. 12: Réplica plating para o isolamento de colônias de auxotrofia. A, placa inicial; B, réplica, em meio de ágar completo; C, segunda réplica com o meio mínimo de ágar. As setas designam as colônias auxotróficas que não conseguem crescer em meio mínimo. *Fonte:* JOSHUA LEDERBERG AND ESTHER M. LEDERBERG, 1952.

8.4.1 Assimilação de carboidratos e identificação por sistemas comerciais

A identificação rápida de isolados é de grande ajuda no diagnóstico e tratamento das infecções. Os seguintes carboidratos são utilizados para identificação de *Candida*: inulina, ramnose, L-arabinose, celobiose, dextrose, sacarose, rafinose, dulcitol, melibiose, trealose, galactose, maltose, xilose, inositol e lactose (BRITO *et al.*, 2009).

As espécies do gênero *Candida* apresentam um perfil de assimilação de carboidratos diferente, e a leitura é feita, durante 24 a 96 horas, mediante visualização de halos de crescimento que se formam em volta do carboidrato assimilado. Dessa forma, isolados de *C. albicans* apresentam resultado positivo para glicose, galactose, xilose, trealose e maltose e resultado variável para L-arabinose e sacarose. A *C. tropicalis* é capaz de assimilar glicose, galactose, xilose, trealose e maltose, podendo assimilar ou não sacarose. Quanto à *C. parapsilosis*, esta assimila glicose, galactose, sacarose, maltose, trealose, xilose, arabinose e rafinose, sendo esta última variável (HOOG *et al.*, 2000; SIDRIM & ROCHA, 2004).

As leveduras possuem a capacidade de assimilar uma gama de compostos de carboidratos como sua única fonte de carbono, e diferenças em seus perfis de assimilação é usada para diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis*. Essas diferenças incluem a incapacidade de *C. dubliniensis* para assimilar α -metil-D-glicosídeo (MDG), lactato (LAT) ou xilose (XYL) (SULLIVAN *et al.*, 1995).

Embora Sullivan *et al.* (1998) constataram em seu estudo que nem *C. dubliniensis* nem *C. albicans* podem assimilar o glicerol como uma única fonte de carbono, outros estudos indicaram que *C. dubliniensis* tem a capacidade de assimilar glicerol. Pincus *et al.* (1999), constataram que, dependendo do sistema de identificação utilizado, diferentes porcentagens de *C. dubliniensis* isoladas foram capazes de assimilar glicerol.

Vários *Kits* para identificação de leveduras são comercializados. O uso desse sistema exige habilidades técnicas e familiaridade suficiente com cada teste realizado para permitir interpretações precisas (KONEMAN *et al.*, 2008).

Kits comerciais utilizados para identificação como ID 32 C (bioMerieux) são bastante utilizados. Este kit fornece uma avaliação para assimilação de 30 fontes de carbono e o desenvolvimento de leveduras na presença de cicloheximida. Os ensaios são realizados de acordo com as instruções do fabricante. É composto por 32 cúpulas, cada uma contendo um substrato de carbono desidratado. Após a inoculação da suspensão da levedura a ser testada, incuba-se de 24-48 horas, e o crescimento em cada cúpula é detectada através da leitura visual. O resultado é obtido usando o software de identificação (bioMerieux) (ALVES *et al.*, 2005).

O estudo realizado por ALVES *et al.* (2005), realizou a identificação pelo perfil bioquímico de dezenove isolados de *C. dubliniensis* anteriormente identificados por métodos de genotipagem e utilizou o Kit da bioMerieux. Após 48 horas de incubação o sistema de ID 32 C foi capaz de identificar e classificar grande parte dos isolados como positivo (13) para *C. dubliniensis* em três níveis diferentes: excelente (sete), muito bom (cinco) e bom (um). Quase todos os demais (seis) foram considerados de perfil duvidoso, mas o software sugere que há 83,6 % de chances para que sejam *C. dubliniensis*.

O sistema de identificação Auxacolor baseia-se na utilização de carboidrato e o crescimento é visualizado por alteração na cor de um indicador de pH. A placa de microtitulação contém 16 poços, e as placas são lidas após 24-72 horas de incubação a 30° C. Além disso, várias outras características, como capacidade de crescimento a 37° C, formação de micélio, ou artrósporos e presença de uma cápsula, também são incluídas (KONEMAN *et al.*, 2008).

O sistema RapID Yeast Plus é baseado na utilização de substratos de carboidrato, na hidrólise de ácidos graxos e uréia e na hidrólise enzimática de substratos aril-amida e glicosídeo. Um painel com 18 cavidades é incubado por 4 horas a 30°C e lido após a adição de reagentes específicos (KONEMAN *et al.*, 2008).

8.5 Testes moleculares

A abordagem mais confiável na diferenciação entre os organismos é baseada em técnicas moleculares. Embora em desenvolvimento e pouco empregado na prática clínica, a maioria destes estudos dependem de testes fenotípicos para identificar a espécie da levedura, equipamentos especializados e conhecimento e alto custo na realização dessas técnicas moleculares (ELLS *et al.*, 2009).

O desenvolvimento e o aperfeiçoamento das técnicas de biologia molecular utilizando o DNA de agentes infecciosos têm-se mostrado uma estratégia clinicamente viável. A PCR é a técnica mais utilizada para este fim, pois permite rápida identificação de alguns fungos. Entretanto, para o diagnóstico da candidíase ainda não mostra razão positiva custo/eficácia em relação aos métodos clássicos (GIOLO & SVIDZINSKI, 2010).

Para fins epidemiológicos, a técnica derivada da PCR "amplificação aleatória de DNA polimórfico", conhecida pela sigla na língua inglesa RAPD, fornece bons resultados. Esse ensaio utiliza uma sequência pequena (nove a 10 pares de bases) como *primers* aleatórios para a amplificação do DNA. Essa variação da PCR permite avaliar a correlação genética entre isolados da mesma espécie. É uma das técnicas mais empregadas para esse propósito devido a sua facilidade de execução, muito utilizada para comparar isolados obtidos de amostras clínicas com os de fontes inanimadas, auxiliando na análise de inquéritos epidemiológicos de surtos hospitalares. Por esse método de genotipagem pode-se analisar a similaridade entre isolados clínicos e se micro-organismos da mesma espécie são iguais, similares ou diferentes, discriminando subpopulações intraespécies (GIOLO & SVIDZINSKI, 2010).

Essa metodologia também tem aplicação para se demonstrar a provável origem daquela infecção fúngica. Por meio da tipagem molecular de micro-organismos isolados em colonização (mãos, superfícies dispositivos), e em comparação com isolados infectantes, pode-se comprovar se as mesmas são ou não geneticamente idênticas (GIOLO & SVIDZINSKI, 2010).

As principais vantagens da RAPD-PCR em relação às demais técnicas moleculares são: rapidez de execução, baixo custo, facilidade de implantação em

laboratórios, facilidade de aplicação em estudos epidemiológicos, além de não haver necessidade de se conhecer previamente o DNA a ser analisado (ELLS *et al.*, 2009).

Além dessas técnicas, existem outras que também são utilizadas com frequência:

- Polimorfismo de comprimento do fragmento amplificado:

A técnica de impressão digital, mais recentemente desenvolvida é polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP). Esta técnica envolve o isolamento e restrição do DNA genômico, seguido por ligação de adaptadores e restrição parcialmente sítio-específico para as extremidades viscosas dos fragmentos (ELLS *et al.*, 2009).

- Cariotipagem eletroforética:

Envolve o isolamento de cromossomos através da criação de protoplastos, incorporando-os em plugs de agarose e remoção das membranas celulares e proteínas. As fichas de agarose são, então, submetidas a gel de eletroforese e as bandas cromossômicas são resolvidas visualizando-os através da coloração com brometo de etídio e transiluminação com UV. Existem diversas variações desta técnica de eletroforese em campo pulsátil incluindo gel (PFGE), que é capaz de separar moléculas maiores de DNA mudando a direção do campo elétrico. As moléculas maiores de DNA reorientadas são mais lentas do que moléculas menores, permitindo uma maior resolução (ELLS *et al.*, 2009).

- Sequenciamento:

As técnicas moleculares são ferramentas adequadas para a identificação adequada das leveduras. Um exemplo da importância é a diferenciação das novas espécies estreitamente relacionadas com *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, que foram recentemente segregados por métodos moleculares e também diferenciados por meio de abordagens moleculares, como análise da sequência de nucleotídeos, pela amplificação por PCR da região específica do íntron RPSO (VERCHER *et al.*, 2011).

A identificação com base em diferenças de sequências em regiões de rDNA tem sido bastante estudado. Uma região do rDNA 25 S que tem se mostrado

altamente conservada dentro dos isolados de *C. albicans* é a região V3 (ELLS *et al.*, 2009). Sullivan *et al.* (2005), amplificando aproximadamente 600 pb da região V3 e após sequenciamento, descobriram que as sequências dos isolados atípicos (*C. dubliniensis*) diferem cerca de 14 nucleotídeos dos isolados de *C. albicans*. Uma outra região do rDNA 25S usado para diferenciar as duas espécies é uma área que abrange o sítio do íntron transponível. A amplificação desta região gerou dois produtos diferentes para *C. albicans* (um com 450pb e um fragmento com 840 pb), dependendo do genótipo do isolado, enquanto todos os isolados de *C. dubliniensis* obtiveram produto com 1080 pb, permitindo assim a diferenciação entre as espécies (ELLS *et al.*, 2009).

Internos transcritos (ITS) dos genes ribossômicos das leveduras patogênicas como *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* entre outras são úteis para identificação correta e precoce em nível de espécie de organismos que apresentam problemas na identificação por métodos fenotípicos. Estas sequências são comparadas com sequências depositadas em bancos de dados genômicos para permitir reduzir o tempo necessário para identificação de espécies de leveduras, melhorar a acurácia na caracterização de patógenos emergentes e contribuir ainda para ampliar o número de sequências de leveduras depositadas em bancos genômicos. É importante ressaltar que a identificação por métodos moleculares é obrigatória para resolver inconsistências de métodos convencionais na identificação de leveduras emergentes (COLOMBO, 2012).

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho demonstrou que é crescente o número de leveduras emergindo como patógenos com potenciais invasivos e que a incidência de infecções nosocomiais é um fator preocupante, pois está diretamente relacionada, na maioria das vezes, ao surgimento de infecções resistentes. Micro-organismos antes comensais, estão cada vez mais se tornando potenciais patógenos. Além de encontrarem condições favoráveis do hospedeiro, estão adquirindo cada vez mais resistência às drogas antifúngicas devido à dificuldade na identificação correta, tendo como consequência tratamento ineficazes. Diante disso, os pesquisadores estão em busca de novos fármacos que sejam eficazes e promovam o mínimo de agressão aos pacientes acometidos.

Dentre as leveduras emergentes, é destaque há décadas o gênero *Candida*, que continua sendo o principal patógeno das UTI's. Além das dificuldades de tratamento devido aos diferentes fatores de virulência das leveduras, encontra-se também a necessidade de profissionais capacitados para um diagnóstico correto a fim de obter sucesso terapêutico com menos agressão possível ao paciente. Frente a tantas evoluções das técnicas de diagnóstico, ainda pesquisam-se métodos mais rápidos com um alto padrão de confiabilidade; as técnicas moleculares mostram-se bastante promissoras, apesar de pouco empregadas e com alto custo.

Deve-se haver uma conscientização dos profissionais de saúde, como elementos disseminadores de isolados, a fim de contribuir para reduzir o número de infecções fúngicas nosocomiais, caso contrário, pode-se tornar um problema de saúde pública.

10. REFERÊNCIAS

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica. Manual da Anvisa. Módulo VII, 2004.

ALVES, S.H.; HORTA, J.A.; MILÁN, E.P.; SCHEID, L.A.; VAINSTEIN, M.H.; SANTURIO, J.M. & COLOMBO, A.L. Carbohydrate assimilation profiles of Brazilian *Candida dubliniensis* isolates based on ID 32C system. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 47(2):109-111, 2005.

ALVES, S.H.; MILAN, E.P.; DE LAET, S.A.P.; OLIVEIRA, L.O.; SANTURIO, J.M.; COLOMBO, A.L. Hypertonic Sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. *Diagn Microbiol Infect Dis* 43:85–86, 2002.

ANATOLIOTAKI, M.; MANTADAKIS, E.; GALANAKIS, E.; SAMONIS, G. *Rhodotorula* species fungemia: a threat to the immunocompromised host. *Clin Lab*, 49:49-55, 2003.

ANGUS, D.C. & WAX, R.S.; - Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med*, 2001;29;(Suppl7):S109-S116.

a-PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; MENDEZ, M., *et al.* *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. *J Clin Microbiol* 44: 3551-56, 2006.

ASMUNDSO'TTIR, L.R.; ERLENDSDO'TTIR, H. & GOTTFREDSSON, M. Increasing incidence of candidemia: results from a 20-year nationwide study in Iceland. *J Clin Microbiol* 4: 3489–92, 2002.

BASSETTI, MATTEO *et al.* 2011- Epidemiology, Species Distribution, Antifungal Susceptibility and Outcome of Nosocomial Candidemia in a Tertiary Care Hospital in Italy. *PLoS ONE* 6(9): e24198. doi:10.1371/journal.pone.0024198.

BEALE, R.; REINHART, K.; DOBB, G.; SILVA, E.; LECLERC, J.; BASSON, B.; ANGUS, D.; PROGRESS Advisory Committee. PROGRESS (Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis): a preliminary report of an internet-based sepsis registry. *Chest*. 2003;124(4 Suppl):224.

BEHERA, B.; SINGH, R. I.; XESS, I.; MATHUR, P.; HASAN, F.; MISRA, M. C. *Candida rugosa*: a possible emerging cause of candidaemia in trauma patients. *Infection* 38:387–393, 2010.

BEIGHTON, D.; LUDFORD, R.; CLARK, D.; BRAILSFORD, S.U.R.; PANKHURST, C.L.; TINSLEY, G.F.; FISKE, J.; LEWIS, D.; DALY, B.; KHALIFA, N.; MARREN, V.; LYNC, E. Use of CHROMagar *Candida*, medium for isolation of yeasts from dental samples. *J. Clin. Microbiol.*, Nov., 3025–3027, 1995.

BORMAN, A.M.; PETCH, R.; LINTON, C.J.; PALMER, M.D.; BRIDGE, P.D.; JOHNSON, E.M. *Candida nivariensis* an emerging pathogenic fungus with multidrug resistance to antifungal agents. *J Clin Microbiol* 46:933-38, 2008.

b-PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; COLOMBO, A.L., *et al.* *Candida rugosa*, an emerging fungal pathogen with resistance to azoles: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. *J Clin Microbiol*; 44:3578-82, 2006.

BRANDAO, L.R.; MEDEIROS, A.O.; DUARTE, M.C.; BARBOSA, A.C.; ROSA, C.A. Diversity and antifungal susceptibility of yeasts isolated by multiple-tube fermentation from three freshwater lakes in Brazil. *J Water Health*. 2010 Jun;8(2):279-89. Epub 2009 Nov 9.

BRITO, E.H.S.; FONTENELLE, R.O.S.; BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Candidose na medicina veterinária: um enfoque micológico, clínico e terapêutico. *Rev. Cienc. Rural* vol.39 no.9 Santa Maria Dec. 2009.

BRUTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman e Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11. ed. Mc graw-Hill, 2007.

CABAÑES, F.J.; VEJA, S.; CASTELLÁ, G. *Malassezia cuniculi* sp. nov., a novel yeast species isolated from rabbit skin. *Med Mycol.* 2011 Jan;49(1):40-8. Epub 2010 Jun 21.

CANUTO, M. M.; RODERO, G. F. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *Lancet Infect. Dis.*, v. 2, p. 550-563, 2002.

CASSONE, M.; SERRA, P.; MONDELLO, F, *et al.* Outbreak of *Saccharomyces cerevisiae* subtype *boulardii* fungemia in patients neighboring those treated with a probiotic preparation of the organism. *J Clin Microbiol*; 41 (11): 5340-3, 2003.

CHERUBINI, B, SANCHEZ-MIRT, A y GARCIA, L. Candidosis vaginal en mujeres sexualmente activas habitantes de una zona rural del estado Falcón, Venezuela. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.*, ene. 2003, vol.23, no.1, p.47-50. ISSN 1315-2556.

CHOWDHARY, A.; HARBANS, S. R.; TUSHARANTAK, K.; SHALLU, K.; PRADIP, R.; MARY, E. B. Application of hypertonic Sabouraud glucose agar for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 69 (2011) 440–442.

CIOK-PATER, E., GOSPODAREK, E.: Zróżnicowanie gatunkowe grzybów *Candida* spp. w materiałach pobranych od pacjentów leczonych w wybranych klinikach Szpitala Uniwersyteckiego im. A. Jurasza w Bydgoszczy w latach 2003-2005. *Medical and Biological Sciences*; 21: 37-42, 2007.

COLOMBO, A. L.; MELO, A. S. A.; ROSAS, R. F. C.; SALOMÃO, R.; BRIONES, M.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A. & PFALLER, M. A. Outbreak of *Candida rugosa* candidemia: an emerging pathogen that may be refractory to amphotericin B therapy. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 46:253–257, 2003.

COLOMBO, A.L. Candidíase hematogênica: uma abordagem multidisciplinar para o aprimoramento de ferramentas diagnósticas e caracterização de biomarcadores relacionados ao seu prognóstico. Disponível em: <http://www.bv.fapesp.br/pt/projetos-tematico/2143/candidiase-hematogenica-abordagem-multidisciplinar-aprimoram/>. Acesso em: 03/02/2012.

CONCEIÇÃO, G.C.; COELHO, P.P.; JÚNIOR, M.A.S.; PEREIRA, M.L.; MIGUEL, D. SCG.; TORALLES, M. B. P. Avaliação do Tubo Germinativo em secreção vaginal a fresco para triagem de *Candida albicans*: Um teste rápido. *NewsLab*; 73:106-112, 2005.

COUTINHO, S.D.; PAULA, C.R. Proteinase, phospholipase, hyaluronidase and chondroitinsulphatase production by *Malassezia pachydermatis*. *Med. Mycol.*, v.38, p.73-76, 2000.

CUENCA-ESTRELLA, M.; GOMEZ-LOPEZ, A.; MELLADO, E.; BUITRAGO, M. J.; MONZON, A.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 Spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 50, n. 3, p. 917-921, mar. 2006.

CUEVAS, A.G.; ALAYETO, J.; JUNCOSA, T.; FRUCTOSO, M^a.T.G.; MORENO, J. & LATORRE, C. Sepsis neonatal por *Malassezia furfur*. *Rev Iberoam Micol*; 16: 157-160, 1999.

Da MATTA *et al.* Antifungal drug susceptibility profile of *Pichia anomala* isolates from patients presenting with nosocomial fungemia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Apr;51(4):1573-6. Epub 2007 Jan 29.

DE HOOG, G.S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M.J. Atlas of clinical fungi. 2nd ed. Utrecht (The Netherlands): Centralbureau voor Schimmelcultures/Reus (Spain): Universitat Rovira i Virgili; 2000.

DENNING, D.W. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet*; 362: 1142–51, 2003.

DUBE, M. P.; HESELTINE, P. N. R.; RINALDI, M. G.; EVANS, S. & ZAWACHI, B.. Fungemia and colonization with nystatin-resistant *Candida rugosa* in a burn unit. *Clin. Infect. Dis.* 18:77–82, 1994.

ELLEPOLA, A.N.B.; HURST, S.F.; ELIE C.M.; MORRISON, C.J.- Rapid and unequivocal differentiation of *Candida dubliniensis* from other *Candida* species using species-specific DNA probes: comparison with phenotypic identification methods. *Oral Microbiol Immunol*; 18: 379–88, 2003.

ELLS, R.; KOCK, J. L. F. & POHL, C. H. *Candida albicans* or *Candida dubliniensis*?. Review article- Blackwell Verlag GmbH • *Mycoses* 54, 1–16, 2009.

ELVERS, K.T.; LEEMING, K.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Binary and mixed population biofilms: time-lapse image analysis and disinfection with biocides. *J Ind Microbiol Biotechnol*; 29:331-8, 2002.

e-PFALLER, M. A. & DIEKEMA, D. J. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.* 42:4419–4431, 2004.

ERSOZ, G.; OTAG, F.; ERTURAN, Z.; ASLAN, G.; KAYA, A.; EMEKDAS, G, *et al.* An outbreak of *Dipodascus capitatus* infection in the ICU: three case reports and review of the literature. *Jpn J Infect Dis*; 57:248-252, 2004.

FALAGAS, M.E.; ROUSSOS, N. & VARDAKAS, K.Z. Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans* *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *J. Infect Dis* 14 (2010) e954–e966.

FIORE, N.F.; CONWAY, J.H.; WEST, K.W.; KLEIMAN, M.B. *Saccharomyces cerevisiae* infections in children. *Pediatr Infect Dis J*; 17 (12): 1177-9, 1998.

FLEMMING, R.V.; WALSH, T.J.; ANAISSIE, E.J.. Emerging and less common fungal pathogens. *Infect Dis Clin North Am*; 16: 915–33, 2002.

f-PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; COLOMBO, A. L.; KIBBLER, C.; Ng, K. P.; GIBBS, D. L.; NEWELL, V. A. and the Global Antifungal Surveillance Group *Candida rugosa*, an Emerging Fungal Pathogen with Resistance to Azoles: Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Oct. 2006, p. 3578–3582 Vol. 44, No. 10.

Fredlund E, Blank LM, Sauer U, Schnürer J & Passoth V. Oxygen and glucose dependent regulation of central carbon metabolism in *Pichia anomala*. Appl Environ Microbiol 70: 5905–5911, 2004.

Fredlund E, Druvefors U, Boysen ME, Lingsten K-J & Schnürer J. Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. FEMS Yeast Res 2: 395–402, 2002.

FURMAN, K.K.; NAUMNIK, B.; MYSLIWIEC, M. Fungaemia due to *Cryptococcus laurentii* as a complication of immunosuppressive therapy—a case report. *Adv Med Sci*; 54: 116–19, 2009.

GAITANIS, G.; MAGIATIS, P.; HANTSCHKE, M.; BASSUKAS, I.D.; VELEGRAKI, A. The malassezia genus in skin and systemic diseases. Clin Microbiol Rev. 2012 Jan; 25(1):106-41.

GARCÍA-SUÁREZ, J.; GÓMEZ-HERRUZ, P.; CUADROS, J.A.; BURGALETA, C. Epidemiology and outcome of *Rhodotorula* infection in haematological patients. Mycoses Epub, Mar 11, 2010.

GAZZONI, A. F.; SEVERO, C. B.; SALLES, E. F.; SEVERO, L. C. Histopathology, serology and cultures in the diagnosis of cryptococcosis. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo vol.51 no.5 São Paulo set./out. 2009.

GHANNOUM, M.A. & RICE, L.B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. Clin. Microbiol. Rev. 12: 501-517, 1999.

GIOLO, M.P. & SVIDZINSKI, T.I.E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. *J Bras Patol Med Lab* v. 46 n. 3 p. 225-234 junho 2010.

GIRMENIA, C.; PAGANO, L.; MARTINO, B.; *et al.* Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. *J Clin Microbiol*; 43: 1818–28, 2005.

GOMEZ-LOPEZ, A.; MELLADO, E.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA ESTRELLA, M.; Susceptibility profile of 29 clinical isolates of *Rhodotorula* spp. and literature review. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 55, n. 3, p. 312-6, mar. 2005.

g-PFALLER, M.A.; MESSER, S.A. & HOLLIS, R.J. Variations in DNA subtype, antifungal susceptibility, and slime production among clinical isolates of *Candida parapsilosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 21: 9-14. 1995.

GREENFIELD, R.A. Host defense system interactions with *Candida*. *J. Med. Vet. Mycol.*, 30: 89-104, 1992.

Grevesse C, Lepoivre P & Jijakli MH. Characterization of the exoglucanase-encoding gene PaEXG2 and study of its role in the biocontrol activity of *Pichia anomala* Strain K. *Phytopathology* 93: 1145–1152, 2003.

GUÉHO, E.; MIDGLEY, G. & GUILLOT, J. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69(4): 337-55, 1996.

GUERY, B.P.; ARENDRUP, M.C.; AUZINGER, G.; AZOULAY, E.; BORGES, Sá M.; JOHNSON, E.M.; MULLER, E.; PUTENSEN, C.; ROTSTEINS, C.; SGANGA, G.; VENDITTI, M.; ZARAGOZA, C.R.; KULLBERG, B.J. Management of invasive candidiasis and candidemia in adult nonneutropenic intensive care unit patients: Part II. Treatment. *Intensive Care Med* 35:206–214, 2009.

GUPTA, A.K.; KOHLI, Y.; LI, A. *et al.* In vitro susceptibility of the seven *Malassezia* species to ketoconazole, voriconazole, itraconazole and terbinafine. *Br J Dermatol* 2000 Apr; 142(4) :758-65.

GYANCHANDANI, A.; KHAN, Z.K.; PRASAD, R. Fungal infections in immunocompromised patients with pulmonary tuberculosis as a secondary disease. *Journal de Mycologie Medicale* 8: 147-152, 1998.

HARTUNG, C.C.; MATA-ESSAYAG, S.; PÉREZ, C.; COLELLA, M.T.; ROSELLÓ, A.; OLAIZOLA, C. et al. Detection of *Candida dubliniensis* in Venezuela. *Mycopathologia*;160:227-34, 2005.

HAZEN, K.C. New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev* 8: 462–478, 1995.

HOOG, G.S. *et al.* Atlas of clinical fungi. 2.ed. Baarn/Delft: Centraalbureau voor Schimmelculture/Universitat Rovira i Virgili, 2000. 1126p.

HORN, D.L.; NEOFYTOS, D. & ANAISSIE, E.J. *et al.* Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis*; 48: 1965-703, 2009.

IİKIT, M.; HILMIOĞLU, S.; TASBAKAN, M.; AYDEMİR, S. Evaluation of Albicans ID2 and Biggy agar for the isolation and direct identification of vaginal yeast isolates. *J Med Microbiol*; 56: 762–5, 2007.

JÚNIOR, J.A.L.S *et al.* - Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepsis em Unidades de Terapia Intensiva brasileiras. *Rev. bras. ter. intensiva* vol.18 no.1 São Paulo Jan./Mar. 2006.

KALATHENOS, P.; SUTHERLAND, J.P. & ROBERTS, T.A. Resistance of some wine spoilage yeasts to combinations of ethanol and acids present in wine. *J Appl Bacteriol* 78: 245–250, 1995.

KANTARCIOĞLU, A.S.; YUCEL, A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the source of strains. *Mycoses* 45: 160-165, 2002.

KHAWCHAROENPORN, T.; APISARNTHANARAK, A.; MUNDY, L.M.. Non-neoformans cryptococcal infections: a systematic review. *Infection*; 35: 51–58, 2007.

KIRKPATRICK, W.R.; REVANKAR, S.G.; MCATEE, R.K.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; FOTHERGILL, A.W.; MCCARTHY, D.I., et al. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in North America by primary CHROMagar Candida screening and susceptibility testing of isolates. *J Clin Microbiol.* 1998;36:3007-12.

KLEIMANN, D.A.; ANTONELLO, V.S.; SEVERO, L.C.; PASQUALOTTO, A.C. *Saccharomyces cerevisiae* oesophagitis in a patient with oesophageal carcinoma. *J Infect Dev Ctries* 2011; 5(6):493-495.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C. **Diagnóstico microbiológico.** 6. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2008.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. **The yeasts- A TAXONOMIC STUDY.** 6. Ed. Editora: Elsevier, 2011.

LAFAYETTE, T.C.S.; OLIVEIRA, L.T.O.; LANDELL, M.; VALENTE, P.; ALVES, S.H. & PEREIRA, W.V. Relato de Caso:Dipodascus capitatus (Geotrichum capitatum): infecção sistêmica fatal em paciente com leucemia mielocítica aguda. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 44(5):648-650, set-out, 2011.

LEDERBERG, J.; LEDERBERG, E.M. REPLICA PLATING AND INDIRECT SELECTION OF BACTERIAL MUTANTS. *J. Bacteriol.* 1952, 63(3):399.

LEUNG, A.Y.; CHIM, C.S.; HO, P.L., et al. *Candida tropicalis* fungaemia in adult patients with haematological malignancies: clinical features and risk factors. *J Hosp Infect*; 50: 316–19, 2002.

LEVIN, N.A. Beyond Spaghetti and Meatballs: Skin Diseases Associated With the Malassezia Yeasts. Posted: 06/11/2009; Dermatology Nursing. 2009;21(1) © 2009 Jannetti Publications, Inc.

LONG, J.G.; KEYSERLING, H.L. Catheter-related infection in infants due to an unusual lipophilic yeast - *Malassezia furfur*. *Pediatr*; 76:896-900, 1985.

MACEDO, D. P. C., *et al.* Infecções oportunistas por leveduras e perfil enzimático dos agentes etiológicos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 42(2):188-191, mar-abr, 2009.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock.** São Paulo, 10^o ed. 2004.

MAHMOUDABADI, A.Z.; ZARRIN, M.; MIRY, S. Phospholipase activity of *Candida albicans* isolated from vagina and urine samples. Jundishapur J Microbiol. 3(4): 169-73, 2010.

MANCIANTI, F.; RUM, A.; NARDONI, S.; CORAZZA, M. Extracellular enzymatic activity of *Malassezia* spp isolates. Mycopathologia, v.149, p.131-135, 2000.

MARCHETTI, O.; BILLE, J.; FLUCKIGER, U.; EGGIMANN, P.; RUEF, C. *et al.* Fungal Infection Network of Switzerland. Epidemiology of candidaemia in Swiss tertiary care Hospitals: secular trends 1991–2000. Clin Infect Dis 38: 311–20, 2004.

MARTIN, G.S.; MANNINO, D.M.; EATON, S. *et al* - Epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. N Engl J Med, 2003;348:1546-1554.

MARTINEZ, M.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; KIRKPATRICK, W.R.; COCO, B.J.; BACHMANN, S.P.; PATTERSON, T.F. Replacement of *Candida albicans* with *C. Dubliniensis* in human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis treated with fluconazole. J Clin Microbiol; 40:3135-39, 2002.

MASOUD, W.; CESAR, L.B.; JESPERSEN, L. & JAKOBSEN, M. Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. Yeast 21: 549–556, 2004.

MATSUMOTO, F.E.; GANDRA, R.F.; RUIZ, L.S.; AULER, M.E.; MARQUES, S.A.V.; PIRES, M.F.C.; GAMBALE, W. & PAULA C.R. Yeasts isolated from blood and catheter in children from a Public Hospital of São Paulo, Brazil. *Mycopathologia* 154: 63-69, 2001.

MEILLER, T.F.; JABRA-RIZK, M.A.; BAQUI, A.; KELLEY, J.I.; MEEKS, V.I.; MERZ, W.G., *et al.* Oral *Candida dubliniensis* as a clinically important species in HIV-seropositive patients in the United States. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*; 88:573-80, 1999.

MELCHER, G.P.; REED, K.D.; RINALDI, M.G.; LEE, J.W.; PIZZO, P.A.; WALSH, T.J. Demonstration of a cel wall antigen cross-reacting with cryptococcal polysaccharide in experimental disseminated trichosporonosis. *J Clin Microbiol*; 29: 192–96, 1991.

MICELI, M.H.; DÍAZ, J.A.; LEE, S.A. - Emerging opportunistic yeast infections- *Lancet Infect Dis* 11:142-51, 2011.

MILAN, E.P.; SANT'ANA, P.L.; MELO, A.S.A.; SULLIVAN, D.J.; COLEMAN, D.C.; LEWI, D., *et al.* Multicenter prospective surveillance of oral *Candida dubliniensis* among adult Brazilian human immunodeficiency virus-positive and AIDS patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.*;41:29-35, 2001.

MUÑOZ, P. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* Fungemia: An Emerging Infectious Disease. *Clinical Infectious Diseases* 2005; 40:1625–34

NAUMOV, G.I.; NAUMOVA, E.S. & SCHNÜRER, J. Genetic characterization of the nonconventional yeast *Hansenula anomala*. *Microbiol Res* 152: 551–562, 2001.

NEOFYTOS, D.; HORN, D. & DE SIMONE, J.A. Jr. *Rhodotorula mucilaginosa* catheter-related fungemia in a patient with sickle cell disease: case presentation and literature review. *South Med J.* ;100(2):198-200, Feb. 2007.

NIEWERTH, M.; KORTING, H.C. *Candida albicans* and the principle of opportunism. An essay. *Mycoses*; 45: 253–8, 2002.

NONAKA, C.F.W.; NASCIMENTO, G.J.F.; GOULART FILHO, J.A.V.; LIMA, K.C.; MILAN, E.P. *Candida dubliniensis* – levedura emergente associada à candidose oral. *Revista de Odontologia da UNESP*; 37(2): 125-132, 2008.

NUCCI, M. & MARR, K. A. Emerging fungal diseases. Clin. Infect. Dis. 41:521–526, 2005.

ODDS, F.C.; DAVIDSON, A. “Room temperature” use of CHROMagar™ Candida. Diagn Microbiol Infect Dis; 38: 147–50, 2000.

OLVER, W.J.; JAMES, S.A.; LENNARD, A. *et al.* Nosocomial transmission of *Saccharomyces cerevisiae* in bone marrow transplant patients. J. Hosp. Infect; 52: 268-672, 2002.

OZKAN, S.; KAYNAK, F.; KALKANCI, A.; ABBASOGLU, U. & KUSTIMUR, S. Slime production and proteinase activity of *Candida* species isolated from blood samples and the comparison of these activities with minimum inhibitory concentration values of antifungal agents. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 100(3): 319-324, May 2005.

PASQUALOTTO, A.C.; ANTUNES, A.G.V & SEVERO, L.C. *Candida guilliermondii* as the aetiology of candidosis. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo v.48 n.3 São Paulo maio/jun. 2006.

PASSOTH, V.; FREDLUND, E.; DRUVEFORS, U.A.; SCHNÜRER, J. Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. Department of Microbiology, Uppsala Genetic Center, Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), Uppsala, Sweden. FEMS Yeast Res 6 (2006) 3–13.

PELCZAR, Jr. & JOSEPH, M. **Microbiologia: conceitos e aplicações**, v. 1, 2. Ed. São Paulo: Pearson Makron Books, 1997.

PEREA, S. & PATTERSON, T. F. Antifungal resistance in pathogenic fungi. Clin. Infect. Dis., v. 35, p. 1073-1080, 2002.

PINCUS, D.H.; COLEMAN, D.C.; PRUITT, W.R. *et al.* Rapid identification of *Candida dubliniensis* with commercial yeast identification systems. J Clin Microbiol 1999; 37: 3533–39.

POTÓN, J.; RUCHEL, R.; CLEMONS, K.V.; COLEMAN, D.C.; GRILLOT, R.; GUARRO, J., et al. Emerging pathogens. *Med Mycol.* 2000;38:225-36.

PRICE, M.F.; WILKISON, I.D. & GENTRY, L.O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 1982; 20: 7-14, 1982.

RAMAGE, G.; VANDE, W.K.; WICKES, B.L.; LOPEZ-RIBOT, J.L. Standardised method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2475–9.

REINHARDT, J. F.; RUANE, P. J.; WALKER, L. J. & GEORGE W. L. Intravenous catheter-associated fungemia due to *Candida rugosa*. *J. Clin. Microbiol.* 22:1056–1057, 1985.

RIBEIRO, P.M.; BACAL, F.; KOGA-ITO, C.Y.; JUNQUEIRA, J.C.; JORGE, A.O.C.. Presence of *Candida spp.* in the oral cavity of heart transplantation patients. *J Appl Oral Sci.*;19(1):6-10, 2011.

RICIPUTO, R. M.; OLIVERI, S.; MICALI, G. *et al.* Phospholipase activity in *Malassezia furfur* pathogenic strains. *Mycoses*, v.39, p.233-235, 1996.

ROGERS, T. R. Antifungal drug resistance: limited data, dramatic impact? *Int. J. Antimicrob. Agents*, v. 27, Suppl. 1, p. 7-11, jun. 2006

ROSAS, R.; NUCCI, M.; CASTELO, A. & COLOMBO, A. L. Abstr. 44th Intersci. Conf. *Antimicrob. Agents Chemother.*, abstr. M-269, 2004.

RUAN, S.Y.; CHIEN, J.Y.; HSUEH, P.R.. Invasive trichosporonosis caused by *Trichosporon asahii* and other unusual *Trichosporon* species at a medical center in Taiwan. *Clin Infect Dis* 2009; 49: e11–17.

SANO, A.; VILELA, M.M.; TAKAHASHI, I.; FUKUSHIMA, K.; TAKIZAWA, K.; SILVA, M.T.; et al. Isolation of *Candida dubliniensis* from the oral cavity of an HIV-positive child in Brazil. *Nippon Ishikin Gakkai Zasshi.* 2000;41:177-81.

SCHEID, L.A.; MARIO, D.A.N.; LOPES, P.G.M.; LORETO, E.; LINARES, C.E.B.; SANTURIO, J.M. & ALVES, S.H. *Candida dubliniensis* does not show phospholipase activity: true or false? Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 43(2):205-206, mar-abr, 2010.

SCHLOTTFELD, F.S.; TRAMONTIN, S.W.; NAPPI, B.P. Reclassificação taxonômica de espécies do gênero *Malassezia*: revisão da literatura sobre as implicações clínico laboratoriais. J. Bras. Patol. Med. Lab. vol.38 no.3 Rio de Janeiro July 2002.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 338p.

SILVA, E.; PEDRO, Mde. A.; SOGAYAR, A.C. *et al.* Brazilian Sepsis Epidemiological Study. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). Crit Care. 2004;8(4):R251-60.

SILVA, J.O.; FERREIRA, J.C; Candido RC. Atividade enzimática, produção de slime e sensibilidade a antifúngicos de *Candida* sp. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 40: 354-355, 2007.

SILVA, P. **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2010.

SIZUN, J.; KARANGWA, A.; GIROUX, J.D., et al. *Malassezia furfur* - related colonization and infection of central venous catheters. A prospective study in a pediatric intensive care unit. Intensive Care Med 1994; 20: 496-499.

SUGAR, A. M. & STEVENS, D. A. *Candida rugosa* in immunocompromised infection. Case reports, drug susceptibility, and a review of the literature. Cancer 56:318–320, 1985.

SUJAYA, I.N.; ANTARA, N.S.; SONE, T.; TAMURA, Y.; ARYANTA, W.R.; YOKOTA, A.; ASANO, K. & TOMITA, F. Identification and characterization of yeasts in brem, a traditional Balinese rice wine. World J Microb Biotechnol 20: 143–150, 2004.

SULLIVAN, D.J.; COLEMAN, D.C.- *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 329–34.

SULLIVAN, D.J.; MORAN, G.P.; COLEMAN, D.C. *Candida dubliniensis*: ten years on. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;253:9-17.

SULLIVAN, D.J.; MORAN, G.P.; PINJON, E.; AL-MOSAID, A.; STOKES, C.; VAUGHAN, C., et al. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 2004;4:369-376.

SULLIVAN, D.J.; WESTERNENG, T.J.; HAYNES, K.A.; BENNETT, D.E.; COLEMAN, D.C. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterisation of a novel species associated with oral candidosis in HIV infected individuals. *Microbiology* 1995; 141: 1507–21.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia.** 8. ed. São Paulo: Editora Artmed, 2005.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia.** 5. Ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TRAGIANNIDIS, A.; BISPING, G.; KOEHLER, G. & GROLL, A.H. Minireview: *Malassezia* infecções em pacientes imunocomprometidos. *Micoses.* 2010 Maio; 53 (3) :187-95. Epub 2009 17 de dezembro.

TRIFILIO, S.; SINGHAL, S.; WILLIAMS, S., et al. Breakthrough fungal infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients on prophylactic voriconazole. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40: 451–56.

TUON, F.F.; COSTA, S.F. *Rhodotorula* infection. A systematic review of 128 cases from literature. *Rev Iberoam Micol* 2008; 25: 135-140.

VELEGRAKI, A. & LOGOTHETI, M. - Presumptive identification of a emerging yeast pathogen: *Candida dubliniensis* (sp. nov.) reduces 2,3,5,-triphenyltetrazolium chloride. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998; 20: 239–41.

VERCHER, M. del P.; MARTÍNEZ, J.M.G.; CANTÓN, E.; PEMÁN, J.; GARCÍA, M.M.G.; GÓMEZ, E.V.; AGUDO, L.del C. Differentiation of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* by specific PCR amplification of the RPS0 intron. *International Journal of Medical Microbiology* 301 (2011) 531– 535.

WALSH, T.J.; GROLL, A.; HIEMENZ, J.; FLEMING, R.; ROILIDES, E.; ANAISSIE, E. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10 (suppl 1): 48–66.

YUCESOY, M.; ESEN, N.; YULUG, N. Use of chromogenic tube and methyl blue-sabouraud agar for the identification of *Candida albicans* strains. *Kobe J Med Sci* 2001; 47: 161–167.

ZAITZ, C.; RUIZ, L.R.B.; SOUZA, V.M. Dermatoses associadas às leveduras do gênero *Malassezia* **An bras Dermatol, Rio de Janeiro*, 75(2):129-142, mar./abr. 2000.