



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

**INFECÇÕES FÚNGICAS EM UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA  
PEDIÁTRICA E AVALIAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS QUANTO AO  
PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA E ÀS TOXINAS *KILLER***

**GLEICIERE MAIA SILVA**

**RECIFE**

**2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

**INFECÇÕES FÚNGICAS EM UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA  
PEDIÁTRICA E AVALIAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS QUANTO AO  
PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA E ÀS TOXINAS *KILLER***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

**Área de Concentração: Micologia Aplicada**

**Aluna: Gleiciere Maia Silva**

**Orientador: Dra.Rejane Pereira Neves**

**RECIFE**

**2013**

Catálogo na fonte  
Elaine C Barroso  
(CRB4 1728)

Silva, Gleiciere Maia

Infecções fúngicas em unidades de terapia intensiva pediátrica e avaliação dos agentes etiológicos quanto ao perfil de sensibilidade antifúngica e às toxinas killer / Gleiciere Maia Silva – 2013.

74 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Rejane Pereira Neves

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, 2013.

Inclui referências e anexo

1. Fungos 2. Infecção hospitalar 3. Toxinas I. Neves, Rejane Pereira (orient.)  
II. Título

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2021-079

GLEICIERE MAIA SILVA

**INFECÇÕES FÚNGICAS EM UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA  
PEDIÁTRICA E AVALIAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS QUANTO AO  
PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA E ÀS TOXINAS *KILLER***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 21/02/2013

**BANCA EXAMINADORA**

Prof<sup>a</sup>. Dra. Rejane Pereira Neves (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof<sup>a</sup>. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Neiva Tinti de Oliveira (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof<sup>a</sup>.Dra. Danielle Cerqueira de Macêdo (Examinador Externo)

Programa Nacional de Pós Doutorado - CAPES/UFPE/UFPE

Prof<sup>o</sup>.Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto (Examinador Externo)

Programa Nacional de Pós Doutorado – CAPES

## AGRADECIMENTOS

Ao meu fiel e querido DEUS em primeiro lugar, por ter me dado forças para alcançar meus objetivos, sempre respondendo as minhas dúvidas e em todos os momentos me fazendo ter a certeza da sua presença em minha vida.

A Thiago Henrique por todo apoio dado ao longo desses anos tendo participado de todas as minhas vitórias.

Aos meus pais por ter me concedido o dom da vida em especial ao meu pai José Luiz pelo exemplo de superação, dedicação e profissionalismo sempre presente em meus pensamentos e a minha mãe Maria Glêcineide pela alegria e entusiasmo com que encara a vida.

A minha avó Maria Zizelda Alves Maia pela torcida diária e orações que sempre direcionava a mim com o intuito de eu sempre realizar meus objetivos com sucesso nunca se esquecendo de ser uma pessoa melhor.

Aos demais membros da minha família em especial a minha querida irmã Yara, Renata e meu primo Wanderley pelo carinho e pela certeza que posso contar sempre com eles em qualquer momento de minha vida.

A minha amiga Alice, pelo companheirismo, amizade, compreensão desde a ajuda nas coletas de amostras clínicas dos pacientes das UTI'S pediátricas até uma parceria de assuntos pessoais, sempre disposta a ajudar.

Aos integrantes do laboratório de Micologia Médica pela atenção e paciência, incluindo a queridíssima Professora Dra. Oliane Magalhães e ao Professor Dr. Armando Marsden ambos dando exemplo de profissionalismo e gratidão para com os alunos.

A equipe da UTI pediátrica do Hospital Oswaldo Cruz, sobretudo Dra. Cláudia Abreu pela disponibilidade das amostras e atenção que sempre foi disponibilizado a mim durante esse período de coleta.

A equipe da UTI pediátrica do Hospital Barão de Lucena, sobretudo a Dra. Ângela, chefe da UTI, pela solicitação das coletas e pela credibilidade e confiança que nos

depositaram durante o tempo desse estudo.

A minha Orientadora Professora Dra. Rejane Pereira Neves por ter me aceito como orientanda e por cada dia dessa caminhada me fazer sentir um imenso orgulho em estar perto e aprender com uma das melhores profissionais em Diagnóstico Micológico do país.

Ao auxílio financeiro concedida pela CNPq que nos ajudou muito na realização deste projeto.

Ao programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos pela oportunidade de eu ter feito parte desse grupo tão seleta que é a micologia.

## RESUMO GERAL

Infecções fúngicas oportunistas em pacientes críticos internados em unidades de terapia intensiva pediátrica (UTIP) são consideradas de alto risco, com potencial letal. Esta pesquisa teve como objetivo diagnosticar infecções fúngicas em crianças e avaliar a capacidade dos agentes etiológicos quanto à sensibilidade a antifúngicos e as toxinas *killer*. Foram avaliadas amostras biológicas de 85 crianças de três hospitais públicos da cidade do Recife-PE/Brasil internadas em UTIP com clínica sugestiva para tais infecções. Foram realizadas coletas para obtenção de amostras de sangue, urina, líquido cefalorraquidiano, escamas epidérmicas, ponta de cateter, líquido sinovial, secreção ocular e secreção traqueal. Dos pacientes avaliados, 23,5% foram diagnosticados com infecção fúngica, sendo 50% dos agentes etiológicos obtidos de amostras de sangue, seguido por 15% oriundos de escamas epidérmicas da região inguinal, 10% da região axilar, 15% de amostras de urina, 5% de líquido sinovial e 5% de secreção traqueal. Candidemia foi a infecção mais frequente e *Candida parapsilosis*, a espécie mais isolada. Em seguida *C. albicans*, em amostras de escamas epidérmicas, *C. tropicalis* em amostras de urina, *Fusarium oxysporum* no líquido sinovial e *C. albicans* em secreção traqueal. Quanto à sensibilidade antifúngica de todos os isolados, a resistência variou entre anidulafungina (12%), voriconazol (16%) e fluconazol (48%), entretanto não foi detectada resistência de nenhum isolado a anfotericina B. A sensibilidade às toxinas *killer*, 60 % dos isolados foram resistentes e 40% sensíveis. Estudos com pacientes pediátricos e infecção fúngica são essenciais para diagnóstico clínico e laboratorial, bem como conduta do tratamento para melhora clínica.

**Palavras-Chave:** Infecções Fúngicas. Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica. Sensibilidade Antifúngica. Toxina *killer*.

## ABSTRACT

Opportunistic fungal infections in critically ill patients admitted to intensive care units (PICU) are considered high-risk, potentially lethal. This research aimed to diagnose fungal infections in children and to evaluate the ability of the etiological agents for sensitivity to antifungal and toxins *killer*. We evaluated biological samples of 85 children from three public hospitals admitted to the PICU Recife-PE/Brasil with symptoms suggestive for such infections. Sampling was done to obtain samples of blood, urine, cerebrospinal fluid, epidermal scale, catheter tip, synovial fluid, ocular discharge and tracheal secretions. Among the patients, 23.5% were diagnosed with fungal infection, 50% of the etiological agents obtained from blood samples, followed by 15% from epidermal scale of the groin, axilla 10%, 15% of urine specimens, 5% and 5% synovial fluid of tracheal secretions. Candidemia was the most frequent infection and *Candida parapsilosis*, the most frequent species. Then *C. albicans* in samples of epidermal scale, *C. tropicalis* in urine samples, *Fusarium oxysporum* synovial fluid and *C. albicans* in tracheal secretions. As will antifungal sensitivity of all isolates, the resistance varied from anidulafungin (12%), voriconazole (16%) and fluconazole (48%), but was not detected no resistance isolated amphotericin B. Sensitivity to toxins *killer*, 60% of the isolates were resistant and 40% sensitive. Studies with pediatric patients and fungal infection are essential for clinical and laboratory diagnosis, and management of treatment for clinical improvement.

**Key-Words:** Fungal Infections. Pediatric Intensive Care Unit. Antifungal Susceptibility. Toxin *killer*.

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO 1. INFECÇÕES FÚNGICAS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA PEDIÁTRICA E AVALIAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS QUANTO AO PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA E ÀS TOXINAS *KILLER*

Figura 1— Microscopia do exame direto em amostra de escamas epidérmicas da região axilar clarificado com KOH a 20%, evidenciando filamentos micelianos hialinos.

.....43

### ARTIGO 2. RELATO DE CASO: FUSARIOSE DISSEMINADA SECUNDÁRIA A NEUROBLASTOMA COM CURSO FATAL

Figura 1— Exame micológico direto do líquido sinovial evidenciando hifas hialinas e septadas típicas de fungo filamentosso hialino.....53

Figura 2— Microscopia da cultura evidenciando microconídios curtos e fusiformes característicos de *Fusarium oxysporum*.....54

### ARTIGO 3. RELATO DE CASO: CANDIDEMIA EM CRIANÇA PORTADORA DE FIBROSE CÍSTICA COM CURSO FATAL

Figura 1— Microscopia do exame direto clarificado com KOH a 20%, evidenciando numerosas células de leveduras ovais, hialinas com pseudomicelio.....61

## LISTA DE TABELAS

### 2.6 TESTES DE SENSIBILIDADE ÀS TOXINAS *KILLER*

Tabela 1— Modelo do Biotipo *killer* segundo Polonelli *et* (1983).....34

### ARTIGO 1. INFECÇÕES FÚNGICA EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA PEDIÁTRICA E AVALIAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS QUANTO AO PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA E ÀS TOXINAS *KILLER*

Tabela 1— Agentes etiológicos e sítios de isolamento dos casos de infecções fúngicas diagnosticadas em crianças internadas em UTIP's.....44

## SÚMARIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>14</b>
2.1 UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA PEDIÁTRICA (UTIP) .....	14
2.2 CANDIDEMIA EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA PEDIÁTRICA (UTIP) .....	16
2.3 OUTRAS FORMAS CLÍNICAS DE CANDIDÍASE.....	21
2.4 FUSARIOSE.....	24
2.5 TESTES DE SENSIBILIDADE Á ANTIFÚNGICO.....	25
2.6 TESTES DE SENSIBILIDADE ÀS TOXINAS <i>KILLER</i> .....	32
<b>3 INFECÇÕES FÚNGICAS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA PEDIÁTRICA E AVALIAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS QUANTO AO PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA E TOXINAS <i>KILLER</i> .....</b>	<b>38</b>
<b>4 RELATO DE CASO: FUSARIOSE DISSEMINADA SECUNDÁRIA A NEUROBLASTOMA COM CURSO FATAL .....</b>	<b>48</b>
<b>5 RELATO DE CASO: CANDIDEMIA EM CRIANÇA PORTADORA DE FIBROSE CÍSTICA.....</b>	<b>56</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>63</b>
REFERENCIAS.....	64

## INTRODUÇÃO

Infecções fúngicas oportunistas estão comumente relacionadas a infecção hospitalar que por sua vez pode ser definida como qualquer infecção adquirida após a internação do paciente, ocorrendo pela exposição aos micro-organismos anemófilos, procedimentos invasivos e outras condições (MENEZES *et al.*, 2007).

Em 1998, Bertolini e colaboradores afirmaram a ocorrência de grande avanço no conhecimento médico referente ao atendimento de pacientes criticamente doentes ou mantidos em Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica (UTIP), acarretando uma série de modificações significativas na evolução e prognóstico dos pacientes incluindo redução nos índices de mortalidade por doenças específicas e alterações no tempo de permanência hospitalar.

Dados referentes as infecções fúngicas em UTIP mostram que estas, possuem características próprias, com índices distintos e com amplas variações de mortalidade variando de 3% a 30% dos pacientes (TILFORD *et al.*, 2001).

Infecções fúngicas, sobretudo as causadas pelo gênero *Candida* envolvem um amplo espectro de doenças, desde manifestações superficiais a invasivas, acometendo pacientes expostos a uma grande diversidade de fatores de risco. Infecções superficiais podem acometer pacientes saudáveis, mas com pequenas alterações locais de resposta do hospedeiro no sítio da infecção pela levedura (HOTA, 2004).

Por outro lado, infecções sistêmicas de caráter mais grave podem comprometer órgãos como resultado de disseminação hematogênica do fungo no organismo e complicações infecciosas são documentadas em pacientes críticos, portadores de doenças degenerativas e/ou neoplásicas (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Fungemia, infecção de difícil diagnóstico e tratamento, conduz a uma alta taxa de mortalidade em crianças e a incidência entre pacientes hospitalizados tem aumentado durante a década de 80, contudo estudos indicam que a incidência tende a estabilizar (GUDLAUGSSON *et al.*, 2003; MORGAN 2005).

Candidemia é a quarta causa mais comum de infecção na corrente sanguínea em hospitais terciários e sua ocorrência tem sido associada à longa permanência hospitalar e alta mortalidade (BARBERINO *et al.*, 2006).

Apesar de *C. albicans* ser a espécie mais frequente em pacientes de UTIP e Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN), outras espécies vem causando doenças nesse grupo, dentre as mais frequentes destacam-se *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (WALSH, 2004; ROCHA *et al.*, 2008).

No tratamento das infecções fúngicas tem se verificado alto índice de resistência dos agentes etiológicos a fármacos, sobretudo aos azólicos. A resistência entre as espécies de *Candida* tem sido um problema crescente, a qual caracteriza a importância da identificação das leveduras e a realização de testes de sensibilidade aos antifúngicos (COLOMBO *et al.*, 1999).

Desde a década de 70, além do estudo de enzimas participantes do processo infeccioso, vários estudos passaram a caracterizar as leveduras quanto ao fenômeno de produção de compostos protéicos denominados toxinas (proteínas) *killer*. Este fenômeno é útil na diferenciação de leveduras dentro da própria espécie, podendo ser usado como marcador patogênico (OLIVEIRA *et al.*, 1998).

A ação das toxinas *killer* se deve ao fato dessas atuarem formando poros na membrana citoplasmática do fungo exposto, alterando a permeabilidade, ocasionando perda de íons de potássio, inibição do transporte ativo de aminoácidos e acidificação do interior celular, induzindo a apoptose. A resistência a essas proteínas tóxicas caracteriza fenotipicamente o isolado fúngico como mais patogênico (RIBEIRO *et al.*, 2011).

A necessidade do desenvolvimento de pesquisas que busquem indicar fatores de risco para o agravamento dos quadros clínicos das infecções fúngicas, principalmente dos pacientes internados em UTI's pediátricas contribuem para minimizar e evitar recidivas, através do diagnóstico clínico e laboratorial, assim como instituir tratamento específico adequado ao perfil de sensibilidade antifúngica dos agentes etiológicos.

Assim, o presente estudo teve como objetivos verificar a ocorrência de infecções fúngicas em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva pediátrica (UTIP's) e avaliar o perfil de sensibilidade antifúngica e as toxinas *killer* dos agentes etiológicos.

## **2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1. UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA PEDIÁTRICA (UTIP)**

A Terapia Intensiva Pediátrica é uma especialidade médica relativamente jovem, tendo se consolidado há cerca de 50 anos, após a epidemia de poliomielite na Escandinávia. No Brasil, as primeiras (UTIP's) foram inauguradas na década de 70 no Hospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro em 1971 e na Universidade de São Paulo em 1974 (DE SOUZA *et al.*, 2004).

No Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, na década de 60, existia a sala de atendimento pediátrico intensivo, anexa ao Pronto-Socorro do Instituto Central do Hospital das Clínicas, onde as crianças mais graves eram atendidas pelos plantonistas e pediatras de diversas subespecialidades sem formação específica para atendimento intensivo (DE SOUZA *et al.*, 2004).

Em 1974, nascia a UTIP do Hospital das Clínicas de São Paulo com atenção dirigida à assistência intensiva onde foi integrada à Sala de Atendimento Pediátrico Intensivo. Hoje as UTIP's são reconhecidas e estão bastante difundidas, no entanto ainda se conhece pouco sobre a distribuição dessas unidades, sua estrutura e a forma como se presta assistência intensiva (DE SOUZA *et al.*, 2004).

Um dos aspectos que reflete a modernidade da medicina são as UTI's, sobretudo UTIP's, uma vez que essas têm um papel fundamental na redução da mortalidade. No Brasil, pouco se conhece da infra-estrutura disponível e a qualidade da assistência prestada por tais unidades (THOMPSON; KHOT, 1985; BURKE, 2003).

Por esse motivo a Associação de Medicina Intensiva Brasileira (AMIB) lançou o "1º Censo Brasileiro de UTIs", um projeto que visa conhecer melhor esta estrutura apesar de não ser obrigatório (AMIB, 1997).

Os pacientes de UTI's em virtude de apresentarem doenças ou condições clínicas predisponentes a infecções, quando admitidos nas unidades e submetidos a procedimentos invasivos ou imunossupressivos com finalidades diagnóstica ou terapêutica, aumentam os riscos de infecções fúngicas. Isso contribui para o agravamento do quadro clínico e

geralmente a resposta imunológica nesses pacientes é deficiente em virtude dos mecanismos de defesa estarem comprometidos (FILHO *et al.*, 2006).

Em crianças internadas em UTI's um dos fatores que aumentam a predisposição em desenvolverem infecções fúngicas são prematuridade, baixo peso, estrutura imatura da pele, tempo de internação, o uso prolongado de antibacterianos, inserção de cateter venoso central, nutrição parenteral, ventilação mecânica, uso de esteróides e colonização fúngica preexistente (BORGES *et al.*, 2009).

Segundo Celebi *et al.* (2007) dentre a população pediátrica um grupo de pacientes com maior risco de infecções fúngicas são os recém-nascidos e crianças submetidas a cirurgias de grande porte.

Estudos realizados em ambientes hospitalares por Lacaz *et al.* (1998) evidenciaram que fungos estão constantemente presentes na vida dos pacientes internados, sobretudo dos gêneros *Penicillium*, *Cladosporium* e *Chrysosporium*. O gênero mais frequentemente isolado no ambiente e que geralmente não é patogênico para o homem foi *Penicillium* spp. Entretanto algumas espécies desse gênero foram descritas como causadoras de reações alérgicas e infecções sistêmicas em imunodeprimidos, igualmente a *Cladosporium* spp, que é agente de lesões cerebrais, cutâneas e cromomicose e *Chrysosporium* spp que causa lesões ungueais.

A micota fúngica no ambiente de UTIP e UTIN foi avaliada em um estudo realizado por Melo *et al.* (2009), que identificaram a presença de fungos potencialmente patogênicos e oportunistas nesses ambientes, após realizarem coletas em aparelhos de ar condicionados, leitos, incubadoras, telefones, estetoscópios, portas e maçanetas. Na análise quantitativa das colônias identificaram 11 gêneros, 40% destas colônias foram do gênero *Penicillium* spp seguida por *Cladosporium* sp e *Chrysosporium* spp, *Aspergillus* spp, *Exserohilum* spp, *Aureobasidium* spp, *Curvularia* spp, *Alternaria* spp, *Scopulariopsis* spp, *Rhizopus* spp e *Bipolaris* spp.

As crianças que são internadas nas UTIP e/ou UTIN dos hospitais brasileiros provavelmente apresentam características próprias das de um país em desenvolvimento, incluindo taxas mais altas de desnutrição e diferença na prevalência de doenças, o que pode interferir no prognóstico e na mortalidade (EINLOFT *et al.*, 2002).

Infecções fúngicas em UTIP's podem acometer 2 a 10% dos pacientes e dependendo do estado geral e do agente etiológico envolvido no processo patológico, a taxa de mortalidade pode chegar até 60% dos pacientes (PASQUALOTTO *et al.*, 2007).

Estudo realizado por Alves *et al.* (2000) em UTIP de um hospital Terciário do Brasil por um período de janeiro de 1990 a junho de 1994. Verificaram que todos os pacientes eram lactantes com média de 11 meses e a taxa de mortalidade foi de 14,2%, considerada alta quando comparada com outros estudos.

Conforme relata Einloft e seus colaboradores (2002) dentre todas as infecções hematogênicas adquiridas em crianças internadas em UTIP, infecção fúngica ocupa o segundo lugar entre os agentes etiológicos isolados nos EUA e no Brasil. Esses índices tendem a aumentar com o tempo, sobretudo pelo uso indiscriminado de antifúngicos usados para profilaxia.

## **2.2. CANDIDEMIA EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA PEDIÁTRICA (UTIP)**

A primeira vez que foi documentada levedura do gênero *Candida* como patógeno em humanos foi em 1839, causando doença na cavidade oral. O pesquisador Langenbeck observou e isolou de um paciente com afta bucal a espécie que seria uma das mais conhecidas do gênero, *Candida albicans* (SIDRIM; ROCHA, 2004).

O gênero *Candida* é classificado taxonomicamente no reino *Fungi*, divisao *Eumycota*, subdivisao *Deuteromycotina*, classe *Blastomycetes*, família *Cryptococcacea*. Conforme informa Sidrim e Rocha (2004), este gênero destaca-se por ser o principal entre as leveduras patogênicas, compreendendo aproximadamente 200 espécies.

A levedura do gênero *Candida* pode ser facilmente encontrada em variados ecossistemas desde o solo, alimentos até a água. Essas leveduras fazem parte da microbiota de homens e animais e habitam primariamente o trato gastrointestinal, fazendo parte também da microbiota vaginal, da uretra e dos pulmões. Contudo, essas leveduras podem tornar-se patogênicas, caso ocorra um desequilíbrio em sua relação com o hospedeiro (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

A espécie mais comumente envolvida como patógeno de infecções fúngicas em pacientes de UTI's são espécies do gênero *Candida*, principalmente nos casos que o agente etiológico atinge a corrente sanguínea, no qual denominamos candidemia (ZEICHNER; PAPPAS, 2006; BLYTH *et al.*, 2011).

Atualmente, a candidemia é reconhecida como grave problema de saúde pública e afeta principalmente pessoas que residem em regiões subdesenvolvidas, sendo também problema nos países desenvolvidos. A candidemia apesar de ser uma doença grave, dependendo da escolha do tratamento tem grande índices de sucesso, entretanto a gravidade da doença associada às condições do paciente, leva a um aumento do tempo de internação hospitalar e acarreta elevação nos custos socioeconômicos (GIOLO; SVIDZISKI, 2010).

Na década de 70 a 80 nos Estados Unidos da América (EUA), espécies de *Candida* apresentavam-se como o sétimo patógeno mais frequente entre as infecções nosocomiais. No período de 1986 a 1990, se encontrava entre o quinto agente mais comumente identificado em hemoculturas de pacientes internados em hospitais americanos (PFALLER *et al.*, 1998).

A candidemia em pacientes de UTI's é muito comum por várias condições, dentre essas a gravidade da doença de base, uso de esteróides, múltiplas transfusões, nutrição parenteral, cirurgias de grande porte, hemodiálise, cateter venoso central, pancreatite, além do tempo de hospitalização e uso de antibióticos de amplo espectro (SURVEILLANCE, 1999; FRANÇA *et al.*, 2008).

Na Espanha aproximadamente 1/3 dos pacientes com diagnóstico de candidemia são alocados em UTI's e esses dados aumentam em se tratando de pacientes pediátricos (MONTERO *et al.*, 2012).

Infecções por *Candida* são causa frequentes de sepse em recém-nascidos (RN), esse número pode chegar a 20% das crianças com peso inferior a 1000 g. A incidência é inversamente proporcional à idade gestacional e ao peso de nascimento, variando entre 10% a 28% nos menores de 1000 g. O *National Epidemiology of Mycosis Study Group* realizou um estudo em seis unidades neonatais nos EUA no período de 2 anos e 1,2% dos RN apresentou candidemia, sendo que 82% destes eram RN de muito baixo peso ao nascer (NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS, 1999; SAIMAN *et al.*, 2000; CELEBI *et al.*, 2007).

Um estudo realizado nos EUA por Edmond *et al.* (1999) em 49 hospitais, no qual foi observada a taxa de prevalência de infecções da corrente sanguínea durante três anos, confirmaram a alta incidência de candidemia e concluíram que espécies de *Candida* foram a quarta causa mais comum de infecções de corrente sanguínea (7,6%) dos casos, superada apenas por *Staphylococcus* coagulase-negativa (ECN) (31,9%), *S. aureus* (15,7%) e *Enterococcus* spp (11,1%).

Apesar de o gênero *Candida* ser responsável por uma grande parte dos casos de fungemia, *C. albicans* tem emergido como um importante patógeno de infecções hospitalares ou nosocomiais, estando associado a 80% dos casos de infecções nosocomiais. Representando desta forma, a maior causa de fungemia (ZEICHNER; PAPPAS, 2006).

As principais espécies de *Candida* de interesse clínico são: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae*. Entretanto, outras espécies vêm causando micoses superficiais e invasivas dentre elas: *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. kefyr*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis*, *C. rugosa*, *C. utilis* entre outras (COLEMAN *et al.*, 1998; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Uma das espécies mais frequente isolada de infecções superficiais e invasivas em diferentes sítios anatômicos é a *C. albicans*. Uma levedura com potencial patogênico conhecido, apresentando como principais fatores de patogenicidade e virulência a capacidade de aderência a diferentes mucosas e epitélios, o dimorfismo com formação de estruturas filamentosas que auxiliam a invasão tissular, a termotolerância significativa e a produção de enzimas como proteinases e fosfolipases (FRANÇA *et al.*, 2008).

Segundo Colombo e Guimarães (2003) acredita-se que a maioria dos casos de candidemia seja adquirida por via endógena através da translocação de levedura através do trato gastrointestinal, contudo casos de candidemia também podem ser adquiridas por via exógena através do contato das mãos de profissionais de saúde com pacientes portadores de cateteres vasculares centrais, implante de próteses contaminadas, bem como pela administração parenteral de soluções contaminadas.

Matsumoto *et al.* (2002) em um estudo realizado com 80 cepas de leveduras obtidas de crianças de um hospital público de São Paulo, Brasil, isolaram 59 leveduras a partir de culturas de sangue e 21 de culturas de cateteres vasculares. Verificaram que as espécies prevalentes no sangue e cateter foram *C. parapsilosis* (32,2% e 48,9%, respectivamente),

seguida de *C. albicans* (16,9% e 28,6% respectivamente). As infecções por *C. parapsilosis* foram descritas tanto em RN de muito baixo peso ao nascer como em adultos. Em São Paulo, alguns autores relatam *C. parapsilosis* como a espécie mais frequentemente isolada em hemoculturas e cateteres intravasculares de crianças com candidemia.

Trabalho realizado por Pappas *et al.* (2003) com crianças e adultos com candidemia em centros de cuidados terciários nos EUA, constatou que *C. albicans* foi o agente mais comum na corrente sanguínea de adultos e crianças (45% e 49% respectivamente) com alta de mortalidade (47% entre os adultos e 29%, das crianças).

Na Arábia Saudita também foi realizado um levantamento por Jaffar, Tawfiq (2006) sobre candidemia, 23% dos pacientes estavam em UTIP e 11% na UTIN, entre as espécies mais frequentes, *C. albicans* corresponderam a 53% dos casos e o restante eram espécies não-*albicans*, *C. tropicalis* (19%), *C. parapsilosis* (17%), *C. glabrata* (7%), *C. krusei* (2%), *C. lusitaniae* (1%) e *C. guilliermondii* (1%).

O número de infecções invasivas causadas por espécies de *Candida* não-*albicans* vêm crescendo. Na América Latina há predomínio de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* entre as espécies não-*albicans* causadoras de candidemia. *C. glabrata* é pouco frequente, contudo nos EUA e em muitos países da Europa, predomina *C. glabrata* entre as não-*albicans* (WISPLINGHOFF *et al.*, 2004; COLOMBO *et al.*, 2006).

A importância do aumento de infecção por *C. parapsilosis*, sobretudo em crianças está nessa levedura ser considerada agente de infecções exógenas pela sua capacidade de colonizar a pele, principalmente as mãos de profissionais da saúde, assim como as soluções glicosiladas e cateter venoso central. Sua detecção é particularmente associada à nutrição parenteral e como essas crianças ainda não tem o sistema imunológico completamente desenvolvido, ficam desta forma mais vulneráveis a tais infecções (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; WINGARD, 2005).

Outros explicam que a incidência de *C. parapsilosis* em crianças, pode está associada ao uso de antibióticos, principalmente as cefalosporinas de terceira geração e à presença de cateter venoso central. Acredita-se que a perda da microbiota normal gastrointestinal pelo tratamento com cefalosporinas e a demora no início da alimentação parenteral se associam a uma maior colonização por *C. parapsilosis* (SAIMAN *et al.*, 2000; VALLE *et al.*, 2003).

Segundo França *et al.* (2008) vários estudos em crianças indicam que a espécie mais prevalente como causador de infecção fúngica é a *C. parapsilosis* principalmente em crianças prematuras e internadas em UTIP, destaca-se ainda a predominância de *C. tropicalis* entre as espécies não *albicans* e a pequena ocorrência de *C. glabrata*.

Um estudo realizado por Hinrichsen *et al.* (2008) com pacientes de UTIP e UTIN nos hospitais da cidade do Recife verificaram que a taxa de mortalidade foi de 61%, apesar da maioria (62%) ter recebido tratamento antifúngico. O agente etiológico mais comum foi *C. parapsilosis* (33%), seguida de *C. albicans* (29%), *C. tropicalis* (24%), *C. glabrata* (9%) e *C. guilliermondii* (5%).

Mondeli *et al.* (2012) em um estudo no hospital terciário de São Paulo, Brasil, identificaram 98 casos de candidemia, destes 33,67% foram causadas por *C. albicans* e 66,33% por outras espécies de *Candida* não *albicans*. Destas, *C. parapsilosis* apresentou a maior taxa percentual (37,7%), seguida de *C. tropicalis* (7,1%), *C. glabrata* (4,1%), *C. guilliermondii* (3,1%), *C. lusitaniae* (2,1%) e outras espécies que não foram identificadas por problemas técnicos (12,23%). Ao analisar as espécies de *Candida* em relação a idade dos pacientes, foram observados que outras espécies têm uma maior incidência em pacientes prematuros do que *C. albicans*. Apenas 11,36% dos pacientes com idade inferior a um ano apresentaram candidemia causadas por *C. albicans*. A espécie mais frequente de candidemia foi *C. parapsilosis* afetando 56,8% dos pacientes.

Segundo resultados de Mondeli e colaboradores (2012) a taxa de mortalidade dos pacientes internados em UTI's foi de 53,1%. E a relação da distribuição da mortalidade por espécies indicaram que *C. guilliermondii* apresentou-se como a única espécie com de taxa de mortalidade inferior a 50% e *C. glabrata* com a maior taxa de mortalidade (75%), entretanto ambas as espécies possuíam um pequeno número de casos. Entretanto, espécies de *C. albicans* e *C. parapsilosis* com o maior número de casos, a taxa de mortalidade foram de 54,2% e 58,4%, respectivamente. Nos pacientes da UTIN, a taxa de mortalidade verificada foi de 50%.

Candidemia é uma das principais causas de morte provocada por infecções em UTIN, variando de 15 a 59% e a terceira causa mais comum de sepse tardia (BLYTH *et al.*, 2011).

Segundo Pfaller e Diekema (2007), a alta taxa de mortalidade entre pacientes com candidemia pode estar relacionada ao diagnóstico tardio, terapia antifúngica inadequada

incluído doses errôneas e terapia com período de tempo reduzido (PFALLER; DIEKEMA, 2007).

Segundo Gudlaugsson *et al.* (2003) as taxas de mortalidade dos pacientes pediátricos que adquirem infecção fúngica por *Candida* ainda permanece elevada, maiores que os motivos os quais levaram a estarem nas UTI's.

No decurso da última década, as hemoculturas tornaram-se um dos procedimentos diagnósticos mais importantes e mais frequentemente realizados nos laboratórios de microbiologia (BORGES *et al.*, 2009).

Vários têm sido os avanços relacionados com a capacidade de cultivar fungos a partir de amostras de sangue. Assim, vários sistemas automatizados, recorreram ao uso de meios líquido, no qual a amostra possa ser inoculada diretamente no recipiente, minimizando o risco de contaminação, aumentando a sensibilidade e a rapidez de detecção de crescimento dos agentes microbianos responsáveis por fungemia (MUNHOZ *et al.*, 2006).

O diagnóstico da candidemia é um grande desafio, para realização do diagnóstico são necessárias amostras de sangue e a hemocultura não tem uma grande sensibilidade, uma vez que só é positiva em aproximadamente 50% dos casos, por esse motivo torna-se o diagnóstico difícil (CLARCK; HAJJEH, 2002).

### **2.3. OUTRAS FORMAS CLÍNICAS DE CANDIDÍASE**

A candidíase é uma infecção que pode ser aguda ou crônica, com lesões superficiais ou profundas. Embora esteja relacionada à ocorrência de processos patológicos, pode ainda ser encontrada apenas colonizando pele, mucosas e trato gastrointestinal por fazer parte da microbiota humana. Contudo, alterações orgânicas favorecem a mudança do estado de colonização para infecção (CARVALHO *et al.*, 2003).

A candidíase é a principal infecção fúngica oportunista, expressando a variedade de relações que ocorrem entre o hospedeiro e a microbiota normal, podendo variar desde comensalismo a doença sistêmica fatal (FURLANETO-MAIA *et al.*, 2007).

De acordo com Trick *et al.* (2002) em pacientes internados em UTIs, a candidíase assume um papel de destaque devido à sua frequência causando quadros clínicos graves, principalmente após procedimentos cirúrgicos e durante quadros de imunossupressão.

As manifestações clínicas da candidíase são basicamente de três tipos: mucocutânea, cutânea e sistêmica (MENEZES *et al.*, 2004; PÉNAN *et al.*, 2011).

A candidíase mucocutânea acomete a cavidade oral e o canal vaginal. A candidíase cutânea caracteriza-se pelo envolvimento de áreas úmidas do corpo tais como espaços interdigitais, região axilar, inguinal e infra-mamária (MENEZES *et al.*, 2004).

A forma disseminada da candidíase ou candidíase sistêmica é comum em pacientes graves e podem acometer diferentes órgãos e tecidos, tais como meninges, fígado, rins, bexiga, coração, dentre outros. Os isolados provenientes de amostras clínicas consideradas estéreis como sangue, líquido cefalorraquidiano (LCR), líquido sinovial, secreção de abscesso coletado esterilmente ou qualquer outro espécime cirúrgico, são consideradas representativas para o diagnóstico de candidíase sistêmica (PATEL *et al.*, 2005).

Pesquisas realizadas por Carrillo-Esper, Carrillo-Córdova e Carrilo-Córdova (2009) em pacientes com sepses internados em UTIs, 10% foram ocasionados por fungos, o agente envolvido em 76% dos casos foi *C. albicans* e os demais eram espécies não-*albicans*.

Embora *C. albicans* seja a espécie mais frequentemente isolada em infecções superficiais e invasivas em diferentes sítios anatômicos, estudos ressaltam a importância de *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* como patógenos oportunistas (HAHN *et al.*, 2008; KAUFFMAN *et al.*, 2011)

*C. guilliermondii* é outra espécie de *Candida* não-*albicans* que está sendo detectada em vários casos de candidíases e como causa de fungemia em pacientes de diversas doenças de base incluindo portadores de leucemia (PASQUALOTTO; ANTUNES; SEVERO, 2006).

*C. guilliermondii* é componente da microbiota humana e geralmente não é encontrada como patógeno, por esse motivo, infecções causadas por essa espécie são menos estudadas quando comparadas a outras espécies de *Candida* (PASQUALOTTO; ANTUNES; SEVERO, 2006).

Estudos realizados por Borges e colaboradores (2009) em 114 neonatos internados em UTIN no hospital de Uberlândia no período de 2007 a 2008, evidenciaram 45 amostras positivas para o gênero *Candida*, oriundas de mucosa oral e perianal. Foram caracterizadas como *C. albicans* (51,1%), *C. krusei* (22,2%), *C. glabrata* (15,6%), *C. parapsilosis* (8,9%) e *C. tropicalis* (2,2%).

Outra infecção altamente incidente em pacientes internados em UTI's é a candidúria, ocasionada por espécies de *Candida* que acometem o trato urinário. Esse termo, não necessariamente envolve a presença de sinais e/ou sintomas de infecção urinária, pode ser definido como o crescimento de espécies de *Candida* em culturas de urina, estando presente em até 20% dos pacientes hospitalizados por longos períodos (NUCCI, 2000).

Segundo Colombo e Guimarães (2007) é importante distinguir a diferença entre contaminação e doença, uma vez que a cultura de urina quantitativa tem valor limitado, outros parâmetros têm sido utilizados para auxiliar o diagnóstico. Na presença de infecção por *Candida*, o sedimento urinário usualmente contém hemácias e leucócitos, assim como leveduras, pseudo-hifas e debris necróticos. Entretanto, a ausência de alteração no sedimento urinário não elimina a possibilidade de infecção fúngica, sendo algo frequente nos casos que a candidúria é secundária a infecção sistêmica.

De acordo com Kauffman *et al.* (2000) a candidúria é comum em pacientes de UTI's, ocorrendo em 33% destes. O cateterismo urinário está comumente associado a ocorrência dessa levedurose, possibilitando a infecção através da introdução de microrganismos durante o procedimento, permitindo a migração para a bexiga (LUNDSTRON; SOBEL, 2001).

Em pacientes críticos internados em UTI's por longos períodos e com síndrome infecciosa persistente, a candidúria deve ser confirmada, podendo ser secundária à doença fúngica sistêmica (FISHER, 2000).

Para o diagnóstico da candidíase e outras formas clínicas, torna-se relevante o conhecimento da epidemiologia da doença, uma vez que varia de acordo com a região demográfica, características do grupo de indivíduos estudado, sítio anatômico acometido e causas da infecção. Conhecer a origem da infecção pode contribuir para prevenção da propagação clonal de microrganismos resistentes e instituição da profilaxia antifúngica adequada (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

## 2.4. FUSARIOSE

Espécies de *Fusarium* são amplamente distribuídas na natureza, devido à sua capacidade de crescer em diversos substratos e capacidade potente para a dispersão. O *Fusarium spp* é fungo de caráter oportunista, encontrado como saprófito no solo ou patógeno de plantas, raramente acometendo indivíduos imunocompetentes (JENSEN *et al.*, 2004).

Neste contexto, fusariose é uma infecção causada por espécies de *Fusarium*, que incluem desde lesões de superfície que pode ser localizada, como ceratite e onicomicose, à disseminada (JENSEN *et al.*, 2004).

As manifestações clínicas da fusariose incluem febre prolongada superior a 10 dias e neutropenia severa, com taxa de leucócitos inferior a  $100/\text{mm}^3$ . As lesões de pele podem ser potencialmente graves e no caso de ruptura da lesão ocasionada por um trauma, pode ocasionar uma infecção disseminada e agravamento do quadro clínico, com curso fatal em alguns casos (NUCCI; ANAISSE, 2007).

Fusariose disseminada é a forma clínica mais frequente e desafiadora de fusariose correspondendo a 70% dos casos. O grupo de risco inclui pacientes com leucemia aguda, neutropenia prolongada e pacientes submetidos a transplantes. O padrão mais frequente de doença disseminada é uma combinação de lesões cutâneas e culturas de sangue positivas, com ou sem envolvimento em outros locais tais como seios, pulmões e outros (NUCCI; ANAISSE, 2007).

Doze espécies de *Fusarium* são associadas à infecção em humanos. *F. solani* é a espécie mais frequente com 50% dos casos, seguidos por *F. oxysporum* (20%), *F. moniliforme* (10%) e *F. verticillioidis* (10%). Outras espécies estão associadas a ceratite como *F. dimerum*, *F. proliferatum*, *F. chlamidosporum*, *F. sacchari*, *F. nygamai*, *F. napiforme*, *F. antophilum* e *F. vasinfectum*. Entretanto *F. solani* é a espécie com maior número de casos de ceratite e *F. oxysporum* de onicomicoses (BRILHANTE *et al.*, 2005).

*F. oxysporum* é um fungo filamentosos que se encontra disseminado no ambiente na forma saprófita. Em condições normais não causa doenças, entretanto em indivíduos imunocomprometidos podem causar manifestações agressivas e sistêmicas (PAYA *et al.*, 2000).

Estudos indicam que isolados de *F. oxysporum* geralmente tem uma resistência a antifúngicos convencionais. Estudos *in vitro* sugerem ineficácia ao itraconazol, cetoconazol, miconazol e fluconazol (BOUTATI; ANAISSIE, 1997; GUARRO; GENE, 1995; SPEELEVELD *et al.*, 1996).

Como a fusariose é uma doença que geralmente acomete pacientes imunodeprimidos, a alta taxa de mortalidade ocorre pela associação da gravidade da infecção e a doença de base do indivíduo. Entretanto, existem evidências que a neutrofilia seja o principal fator associado a melhora do prognóstico desses pacientes (CONSIGNY *et al.*, 2003).

## 2.5. TESTES DE SENSIBILIDADE À ANTIFÚNGICOS

As micoses não são enfermidades que curam espontaneamente, necessitando instituir-se tratamento adequado para que haja diminuição da resistência dos agentes às drogas antifúngicas. A resistência às drogas, sobretudo entre as espécies de *Candida* tem sido um problema crescente, o que reforça a importância da identificação das leveduras e dos testes de sensibilidade a antifúngicos (EVANS, 1999).

Existem disponíveis no mercado, vários métodos para avaliar a sensibilidade dos fungos a diferentes quimioterápicos. As técnicas disponíveis consistem em adaptações executadas a partir dos métodos antibacterianos e normalmente não são utilizados como rotina nos laboratórios de micologia (BARCHIESI *et al.*, 1994).

As técnicas mais utilizadas são diluição em caldo e difusão em ágar, que são usadas nos laboratórios para fornecer informações sobre a sensibilidade do micro-organismo às drogas. Nestes métodos utilizam-se vários parâmetros como tamanho do inóculo, concentrações definidas de agentes antifúngicos e diferentes condições que permitam o crescimento do microrganismo sem que haja interferência da atuação da droga (COLOMBO *et al.*, 1995).

Segundo Evans (1999) o aumento de infecções causadas por *Candida* está relacionado à imunodepressão, além do uso indiscriminado de antifúngicos, que por um processo de seleção, tornaram alguns fungos menos sensíveis a determinadas drogas. Para iniciar qualquer medicação, a duração e a via do tratamento depende do diagnóstico correto através do exame micológico, e preferivelmente, do teste de sensibilidade antifúngica.

De acordo com Rex, Sobel (2001) o que vem facilitando a abordagem terapêutica é a identificação das espécies de *Candida*, uma vez que algumas espécies não são sensíveis ao fluconazol, como *C. krusei* e *C. glabrata*, e *C. lusitaniae* pode ser resistente a anfotericina B. Os pacientes expostos previamente a este medicamento, portadores de doenças malignas, neutropênicos, expostos a transplantes de órgãos, portadores da síndrome da imunodeficiência humana (AIDS/SIDA), bem com antecedentes de internação prévia, podem ter maior risco para o desenvolvimento de fungemias por cepas resistentes ao fluconazol.

Os antifúngicos têm características especiais quanto ao mecanismo de ação, via de administração e atuação em micoses superficiais e/ou sistêmicas, podendo ser classificados com base no sítio-alvo e estrutura química, sendo que estes atuam em sua maioria na membrana celular (azóis, anfotericina e nistatina), exceto a fluocitosina e a griseofulvina, que atuam na síntese do ácido nucleico (LACAZ; DEL NEGRO, 1994).

Dentre os antifúngicos, o grupo dos poliênicos agem ligando-se aos esteróis, em particular, o ergosterol (principal esteroide da membrana celular dos fungos) que ao se ligarem, estes agentes antifúngicos produzem poros ou canais, que aumentam a permeabilidade da membrana, gerando uma grande perda de eletrólitos, especialmente potássio, determinando assim a lise e morte celular. Como principais representantes temos a nistatina isolada em 1949 por Hazen e Brown (1950) a partir de *Streptomyces noursei*, e a anfotericina B, descoberta por Gold (1956) e isolada de *Streptomyces nodosus* (SIDRIM; ROCHA, 2004).

A Anfotericina B atua como um importante imunomodulador que pode aumentar a função de macrófagos, sendo o antifúngico mais usado no tratamento das micoses primárias sistêmicas e oportunistas, podendo ser administrado associado a outros agentes terapêuticos. A via intravenosa é normalmente utilizada, no entanto, em determinadas situações com comprometimento do sistema nervoso central, recomenda-se via intratecal (STEVENS, 1998).

A desvantagem do uso da Anfotericina B é que quando administrado possuem vários efeitos colaterais, incluindo febre, vômitos, dores musculares e nas articulações sendo um antifúngico considerado nefrotóxico (LACAZ *et al.*, 2002).

As equinocandinas é outra classe de moléculas antifúngicas que agem inibindo a 1,3- $\beta$ -D-glucan, precursor responsável pela formação de 1,3- $\beta$ -glucan-D, um componente

essencial da parede da célula fúngica. Isso conduz a um comprometimento da integridade da parede celular fúngica, levando a célula fúngica à morte. Dentre as equinocandinas podemos citar anidulafungina que foi aprovada em 2006, sendo ativa contra a maioria das espécies de *Candida* incluindo espécies com maior concentração inibitória mínima (CIMs) ao fluconazol (PFALLER; DEIKMAN, 2007).

Como classe, as equinocandinas têm baixa biodisponibilidade e alta propriedade de se ligarem às proteínas. Essas se distribuem bem nos tecidos, incluindo pulmão, fígado e baço, mas demonstram penetração mínima para o sistema nervoso central (SNC) e olho (PFALLER; BOYKEN; HOLLIS, 2008).

Atualmente, a anidulafungina é a droga de escolha para os pacientes graves que desenvolveram candidemia invasiva e que fizeram uso do fluconazol. As equinocandinas apresentam a mesma eficácia clínica da anfotericina B, com a vantagem de não apresentar tantos efeitos colaterais (MONTERO *et al.*, 2012).

Um dos mais novos antifúngicos triazólico com potente ação e largo espectro é o voriconazol, atua como outros antifúngicos azólicos inibindo a enzima 14 alfa-desmetilase, dependente do citocromo P-450, essencial para a biossíntese de ergosterol. O voriconazol é ativo *in vivo* frente a uma série de infecções fúngicas, incluindo infecções sistêmicas por espécies do gênero *Aspergillus*, *Candida* e *C. neoformans*, menos sensíveis a outros azólicos (FICA, 2004).

O voriconazol apresenta-se sobre as formas oral e endovenosa, requer uma dose de carga inicial para obter concentrações plasmáticas estáveis em menor tempo possível, tanto para adultos quanto para crianças. Se o paciente estiver com insuficiência hepática de grau leve a moderada deverá ser reduzida a dose de manutenção, entretanto em pacientes com insuficiência renal com *clearance* de creatinina menor que 50 mL/min é contraindicado o uso deste composto em formulações endovenosas, apenas uso oral por ser menos tóxico (FICA, 2004).

De acordo com Ghannoum, Kuhn (2002) o voriconazol tem um espectro de atividade mais amplo que o fluconazol e o itraconazol, sendo superado apenas pela anfotecina B. Seu espectro de atividade inclui isolados de *Candida* com resistência adquirida ou natural (*C. krusei*) pelo fluconazol e outras leveduras tais como *C. neoforms*, *Saccharomyces cerevisiae* e até mesmo a fungos dimorficos como *Histoplasma capsulatum* e do gênero do *Aspergillus*.

O voriconazol apresenta efeitos adversos em 30% dos pacientes, esses efeitos são fotopsias (clarões na visão) e reação alérgica de pele, segunda manifestação mais frequente, contudo geralmente é de grau leve. Cerca de 10 a 15% dos pacientes apresentam aumentos nas enzimas hepáticas (FICA, 2004).

Conforme Herbrecht *et al.* (2002) o voriconazol também está sendo usado no tratamento de aspergilose invasiva, entretanto seus resultados são inferiores aos obtidos com a anfotericina B em relação a eficácia clínica, entretanto ainda assim possui menos efeitos colaterais que a anfotericina B.

Os derivados azólicos têm como mecanismo de ação a inibição da biossíntese do ergosterol, que é importante para a integridade e a manutenção da função da membrana celular dos fungos. Os imidazóis inibem a incorporação do acetato de ergosterol, inibindo a lanosterol desmetilase, por interferência no citocromo P-450 da levedura, ocasionando alterações na fluidez e permeabilidade da membrana citoplasmática do fungo, conduzindo um prejuízo na captação dos nutrientes e uma diminuição no crescimento (RICHARDSON; WARNOCK, 1993).

Um dos antifúngicos mais conhecidos e usados rotineiramente é da classe dos triazólicos, conhecido como fluconazol, lançado no mercado em 1990, com administração oral e venosa e importante contra vários tipos de infecções fúngicas, desde micoses superficiais (dermatofitose, candidose, malasseziose) a sistêmicas (candidose sistêmica, aspergilose, histoplasmose, esporotricose e cromomicose). As vantagens são em relação à facilidade de administração oral e menor potencial de toxicidade quando comparados a anfotericina B (TERREL, 1999).

O fluconazol é menos tóxico e melhor absorvido que os outros azóis. Este antifúngico tem sido utilizado rotineiramente em pacientes com micoses superficiais e sistêmicas, levando a problemas de resistência de cepas fúngicas, principalmente em indivíduos imunossuprimidos, portadores de candidose principalmente por *C. glabrata*, *C. krusei*, e *C. tropicalis* (FAVEL *et al.*, 1995; WALSH *et al.*, 1997).

As principais desvantagens do uso do fluconazol são referidos a falta de atividade contra os fungos filamentosos, a resistência natural pela *C. krusei* e a resistência adquirida, por certas espécies de *Candida* ou *Cryptococcus neoformans* (FICA, 2004).

Em pacientes com insuficiência renal, as doses do fluconazol devem ser ajustadas, uma vez que o mesmo é excretado principalmente pelos rins. As doses deverão ser reduzidas pela metade e *clearance* de creatinina < 50 ml/min. Caso o paciente esteja realizando diálise as doses deverão ser administradas após o procedimento (MUHL *et al.*, 2000; FICA, 2004).

O fluconazol por ter uma excelente biodisponibilidade oral é o fármaco de escolha em casos que o paciente está estabilizado, respondendo favoravelmente ao uso de medicações orais. É o antifúngico de escolha em casos de quimioprofilaxia, como por exemplo, em pacientes recuperados de meningite criptocócica, no qual uma dose diária de 200 mg permite o controle sobre os riscos de recaídas em mais de 90% dos pacientes (POWDERLY; SAAG; CLOUD, 1992; FICA, 2004).

O fluconazol também é a de escolha em infecções fúngicas disseminadas associadas a doenças como endocardite, osteomielite, infecção urinária dentre outras, sobretudo se o paciente estiver alguma lesão renal, no qual é contraindicado o uso de anfotericina B (REX; WALSH; SOBEL, 2000).

Segundo Terrel (1999) o fluconazol apresenta boa absorção por via oral, elevada solubilidade na água, além de extensa distribuição pelos tecidos e fluídos orgânicos como urina, escarro, saliva e líquido cérebro espinhal, entretanto não possuem nenhuma atividade sobre o sistema endócrino.

Um dos motivos dos efeitos colaterais mais comuns dos azólicos serem náuseas e vômitos está no fato da metabolização ser principalmente por via hepática, quando utilizados por via sistêmica, além de eritema, ardência, descamação, edema, prurido, urticária e formação de vesículas em uso tópico (SANDE; MANDELL, 1987)..

No estudo realizado por Aquino *et al.* (2005) no qual verificaram a prevalência de espécies de *Candida* no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil e o perfil de sensibilidade para fluconazol. A distribuição de espécies em 131 episódios foi de *C. albicans* (45%), *C. parapsilosis* (24,4%), *C. tropicalis* (15,3%), *C. glabrata* (6,9%), *C. krusei* (4,6%) e 3,8% de outras espécies (*C. pelliculosa*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* e *C. kefyr*). A grande maioria das amostras (92,4%) foram sensíveis ao fluconazol, as amostras dose-dependente incluíram apenas *C. krusei* e *C. glabrata*. Do total de 128 (97,7%) pacientes que fizeram uso de uma terapia prévia com antibióticos, com três ou mais antibióticos antes do episódio de candidemia. A espécie mais prevalente foi *C. albicans*, embora as espécies não-

*albicans* predominaram no estudo. A resistência *in vitro* ao fluconazol foi detectada somente entre as espécies (*C. glabrata* e *C. krusei*) que tendem resistência a compostos azólicos. Uso prévio de antibióticos e uso de um cateter venoso central foram os principais fatores de riscos entre os pacientes com candidemia.

Colombo *et al.* (2006) realizaram um estudo em 11 centros terciários médicos acadêmicos sobre candidemia em pacientes pediátricos e adultos localizados em nove cidades do sul, sudeste e regiões centrais do Brasil. Todas as espécies das culturas de *Candida* proveniente de amostras de sangue foram enviadas ao Laboratório de Micologia Especial da Universidade Federal de São Paulo para autenticação da identificação das espécies e submetidas a testes de sensibilidade.

No estudo de Colombo e colaboradores (2006) foram detectados 712 casos de candidemia com incidência total de 2,49 casos por 1.000 admissões. No momento da candidemia, 122 (17%) pacientes estavam recebendo um agente antifúngico sistêmico, 80 pacientes fazendo uso de fluconazol, 36 pacientes anfotericina B, um paciente usando itraconazol, um paciente usando voriconazol e quatro pacientes usando outros antifúngicos. Entre casos pediátricos, as espécies mais comuns foram *C. albicans* com 89 (40%) casos, seguido por *C. parapsilosis* com 47 (21%), *C. tropicalis* 34 (15 %) e *C. pelliculosa* com 34 (15 %), além de outras espécies menos significantes.

Colombo e colaboradores (2006) realizaram testes de sensibilidade antifúngica no qual foram avaliadas cinco drogas, dentre essas anfotericina B, fluconazol, itraconazol, flucitosina e voriconazol. Resistência ao fluconazol ocorreram em seis (0,8%) isolados incluindo um isolado de *C. albicans*, dois de *C. glabrata* e três de *C. krusei*. Os pacientes que receberam fluconazol previamente a candidemia apresentaram CIM um pouco mais elevados do voriconazol do que aqueles sem exposição prévia, desta forma concluíram que a maior CIM do voriconazol tende a estar associada com a exposição prévia ao fluconazol, dado preocupante e ilustra o potencial problema de resistência cruzada entre os azóis.

França *et al.* (2008) em um estudo realizado no hospital das clínicas da Universidade Federal do Paraná no qual analisaram 100 episódios de candidemia e *C. albicans* (59%) foi a espécie mais frequente, seguida de *C. tropicalis* (15%), *C. parapsilosis* (9%), *C. glabrata* (7%), *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. pelliculosa*, *C. lusitaniae* todos com 1% dos casos, as demais não puderam ser identificadas. Observaram uma predominância de *C. parapsilosis*

entre as crianças e de *C. glabrata* entre os adultos. Quanto a sensibilidade antifúngica, três isolados de *C. glabrata* apresentaram sensibilidade dose-dependente ao fluconazol, e resistência ao itraconazol, um isolado de *C. krusei* apresentou sensibilidade dose-dependente ao fluconazol, um isolado de *C. pelliculosa* sensibilidade dose dependente ao itraconazol.

*Candida glabrata* e *C. krusei* naturalmente apresentam sensibilidade reduzida ao fluconazol. No entanto, tem-se observado taxas de resistência para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (HAZEN *et al.*, 2003).

Horn *et al.* (2009) realizaram um estudo a partir dos dados clínicos dos pacientes com candidemia e a terapia antifúngica utilizada em 23 centros norte americanos com pacientes pediátricos e adultos. Dentre os agentes etiológicos, 45,6% foram de *C. albicans* e 54,4% foram espécies não *albicans*, incluindo *C. glabrata* (26,0%), *C. parapsilosis* (16,7%), *C. tropicalis* (9,1%) e *C. krusei* (2,6%). Em 43% dos pacientes foi administrado agentes antifúngicos como profilaxia ou terapêutica empírica, 30 dias antes do diagnóstico de candidemia. Fluconazol foi o fármaco mais utilizado nos pacientes seguido por caspofungina, micafungina, anfotericina B e voriconazol.

Segundo Horn *et al.* (2009) 77,5% dos pacientes com candidemia por *C. albicans*, foram tratados com fluconazol, 19,6% dos pacientes com candidemia por *C. krusei* foram mais propensos a receber tratamento com voriconazol ou formulações lipídicas de anfotericina B (27,4%). Equinocandinas (caspofungina e micafungina) foram utilizados para a maioria dos pacientes com *C. glabrata* (66,3%), *C. krusei* (74,5%) e 43,7% dos pacientes com *C. parapsilosis*.

Conforme Cruz, Piontelli (2011) em um estudo que realizam em cinco hospitais em Valparaíso, Chile, analisou-se infecções fúngicas invasoras em crianças e adultos. As espécies envolvidas foram identificadas e realizadas testes de sensibilidade antifúngica. As crianças com infecções fúngica foram 39 e os adultos 12. Dos 51 pacientes com micoses, 34 (66,6%) foram causadas por leveduras, 15 (29,4%) por fungos filamentosos e 2 (4%) casos por *Histoplasma capsulatum*. As leveduras foram isoladas em amostras de sangue e os fungos filamentosos de lavado broncoalveolar. Entre as leveduras as espécies com maior frequência foram *C. albicans* seguida de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*.

Segundo Cruz, Piontelli (2011) quase todas as espécies foram sensíveis ao fluconazol e ao voriconazol, com exceção de *C. glabrata* resistente ao fluconazol. As espécies de fungos filamentosas isoladas de amostras de lavado bronquioalveolar (86,6%) foram espécies do gênero *Aspergillus*, sendo *A. fumigatus* a mais frequente e não foi realizado testes de sensibilidade aos fungos filamentosos.

As drogas antifúngicas exercem ações fungistáticas ou fungicidas, entretanto o número de drogas antifúngicas quando comparadas com antibacterianas ainda é muito restrita. Por isso, ainda há muito que estudar com a finalidade de desenvolverem novas drogas e que os antifúngicos tenham aplicação clínica adequada e com um número mínimo de efeitos colaterais para os pacientes (NOBRE *et al.*, 2002).

## 2.6. TESTES DE SENSIBILIDADE ÀS TOXINAS *KILLER*

Toxinas *killer* ou proteínas *killer* são substâncias proteicas secretadas por algumas cepas de leveduras que tem efeitos letais sobre outros fungos e uma variedade de bactérias. As leveduras que produzem essas toxinas são conhecidas como leveduras *killer* que são imunes à ação das suas próprias toxinas, mas podem ser sensíveis às proteínas *killer* produzidas por outros organismos (POLONELLI *et al.*, 1983).

O fenômeno *killer* foi descrito pela primeira vez em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* por Bevan e Makower em 1963, e então proposto que algumas cepas de *S. cerevisiae* podiam ser classificadas em três fenótipos: *killer*, sensível e neutra. Quando células *killer* e sensíveis cresciam em um mesmo meio de cultura, uma grande proporção das células sensíveis era destruída. As células neutras não matavam células sensíveis, nem eram mortas por células *killer*. As toxinas produzidas pelas leveduras *killer* são sensíveis ao calor e a protease e dependentes das condições do pH e oxigênio (WOODS, BEVAN, 1968; VAZ *et al.*, 2002).

As principais linhagens *killer* de *S. cerevisiae* pertencem as classes K1 e K2, a atividade *killer* de K1 permanece estável dentro de uma faixa estreita de pH ácido, é instável a temperaturas acima de 25°C, e pode ser inativada por meio de agitação. Pouco depois da descoberta deste fenômeno verificou-se que cepas com esse potencial além de não se limitar a *Saccharomyces*, pode ser encontrado em outros gêneros incluindo *Candida*, *Cryptococcus*,

*Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Sporidiobolus*, *Tilletiopsis* e *Zygosaccharomyces* (MARQUINA; SANTOS; PEINADO, 2002).

A atividade *killer*, de acordo com Somers, Bevan (1969), corresponde á produção de proteínas de baixo peso molecular que são letais às leveduras sensíveis. Suas toxinas *killer* possuem massa molecular que varia de 18 a 300 kDa, dependendo da espécie de levedura.

Segundo Kandel, Stern (1979), desde a década de 70 começou-se a estudar as enzimas que participavam do processo infeccioso, incluindo as leveduras quanto ao fenômeno de produção de toxinas *killer*, observado em espécies dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Torulopsis* e *Trichosporon*.

O fenômeno *killer* é útil na diferenciação de leveduras dentro da própria espécie, podendo ser usado como marcador epidemiológico. A capacidade de produção de toxina *killer* pode representar uma vantagem seletiva entre espécies competidoras em um mesmo habitat (POLONELLI; CONTI; GERLONI, 1991).

Polonelli *et al.* (1983) preconizaram um método de biotipagem de leveduras do gênero *Candida* codificado em três dígitos baseados na sensibilidade da cepa testada frente as toxinas produzidas (Tabela 1). De acordo com a sensibilidade exibida na amostra forma-se um código no qual é capaz de distinguir até 512 tipos “*killer*” para isolados de *C. albicans*. O teste da biotipagem é realizado com nove leveduras pertencentes ao gênero *Hansenula* e *Pichia*.

Tabela 1- Modelo do Biotipo *killer* segundo Polonelli *et al* (1983)

Atividade do 1° “triplet”				Atividade do 2° “triplet”				Atividade do 3° “triplet”			
leveduras				leveduras				leveduras			
k1	k2	k3	Código	k4	k5	k6	Código	k7	k8	k9	Código
+	+	+	1	+	+	+	1*	+	+	+	1*
+	+	-	2*	+	+	-	2	+	+	-	2
+	-	+	3	+	-	+	3	+	-	+	3
-	+	+	4	-	+	+	4	-	+	+	4
+	-	-	5	+	-	-	5	+	-	-	5
-	+	-	6	-	+	-	6	-	+	-	6
-	-	+	7	-	-	+	7	-	-	+	7
-	-	-	8	-	-	-	8	-	-	-	8

Morace *et al.* (1983) sugerem o emprego do método de fenotipagem das toxinas *killer* para uma melhor compreensão da epidemiologia das leveduras quanto à variabilidade de isolados envolvidos na colonização de um sítio anatômico e/ou no estabelecimento de uma infecção por fungo, inclusive do gênero *Candida*.

Estudos com uma variedade de toxinas mostraram que as características das toxinas *killer* tendem a ser semelhantes. Toxinas *killer* de todas as cepas estudadas são protease-sensíveis e macromoléculas termolábeis. A maioria delas são estáveis e agem apenas em pH ácido. Este é o caso do *Cryptococcus humicola* (toxina *killer* ativa em pH 3 a 5,5), *Pichia kluyveri* (toxina *killer* ativa em pH 2,5 a 4,7), *Pichia inositovora* (toxina *killer* ativa em pH 3,4 a 4,2) dentre outras (POLONELLI; CONTI; GERLONI, 1991; GOLUBEV; SHABALIN, 1994; MARQUINA; SANTOS; PEINADO, 2002).

Pesquisas realizadas por Oliveira *et al.* (1998) analisaram amostras provenientes da mucosa bucal de 44 pacientes com câncer internados nas enfermarias de Pediatria, Cabeça e Pescoço e UTI do Hospital Araújo Jorge, em Goiânia, GO. Conforme seus resultados, as leveduras isoladas foram identificadas e realizadas a sensibilidade as toxinas *killer* e avaliação do biótipo segundo Polonelli *et al.* (1983). Leveduras do gênero *Candida* foram isoladas em 25 (56,8%) dos 44 pacientes examinados. *C. albicans* correspondeu a 24 (96%) isolados e *C. krusei* a um (4%) isolado. A sensibilidade das amostras de *C. albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com câncer, às nove toxinas *killer*, verificou-se que dois biotipos: 811 e 511, que ocorreram em 95,8% e 4,2% dos isolados, respectivamente.

Oliveira *et al.* (1998) realizaram o teste de sensibilidade às toxinas *killer* e mostraram que isolados de mucosa bucal de pacientes com câncer são capazes de expressar na sua maioria

apenas um biotipo. Entre os 24 isolados de *C. albicans*, 23 (95,8%) mostraram-se com o biotipo 811, caracterizando resistência às toxinas K1, K2 e K3.

Estudo realizado por Chunchanur *et al.* (2009) entre isolados fúngicos de portadores do vírus HIV e de não portadores do vírus, verificou-se que os isolados obtidos dos pacientes soro positivo foram resistentes a K2 e K3 e os demais foram todos sensíveis as demais toxinas.

Conforme pesquisas realizadas por Jorge *et al.* (2000) em espécies de *Candida* provenientes da cavidade bucal de indivíduos saudáveis e de pacientes com candidose eritematosa crônica. Foram realizadas identificação dessas leveduras pelas provas de formação de tubo germinativo em soro estéril de coelho, produção de clamidósporos, pseudo-hifas em ágar fubá Tween 80, fermentação e assimilação de açúcares, e realizada a sensibilidade as toxinas *killer* e biotipagem segundo Polonelli *et al.* (1983).

Segundo Jorge *et al.* (2000), a presença de leveduras foi observada em 260 indivíduos sadios, dos quais 100 (38,46%) apresentavam *Candida* na saliva. A espécie predominante foi *C. albicans*, seguida de *C. tropicalis* e *C. guilliermondii*. Todos os isolados foram sensíveis a pelo menos uma cepa produtora de toxina *killer* e nas amostras isoladas de pacientes com candidose, foi detectado número estatisticamente significativo de biotipos *killer*. O emprego do sistema *killer* possibilitou diferenciar 11 biotipos de *C. albicans* encontrados na cavidade bucal. Na verificação do fenômeno *killer* entre as amostras de diferentes espécies de *Candida*, o biotipo mais encontrado foi o 111 (47,79%), indicando que a maior parte das espécies de *Candida* testadas foram sensíveis a todas as toxinas *killer* produzidas pelas cepas padrão estudadas.

O uso do sistema *killer* para observação da sensibilidade das amostras de *Candida* isoladas da cavidade bucal mostrou-se de grande utilidade para determinação da origem e disseminação de amostras de *Candida* ou mesmo como marcador epidemiológico de leveduras. Salienta-se que, o método *killer* é de fácil execução e interpretação, uma vez que a leitura deste se torna evidente pela formação ou não de halo ao redor da amostra semeada (JORGE *et al.*, 2000).

Estudo feito por Lusvarghi (2002) em amostras isoladas de cavidade bucal de pacientes com HIV sob tratamento com drogas inibidoras de proteinases, mostrou que 75,82% dos

isolados de candidose apresentaram resistência a no mínimo sete toxinas. O biotipo 111 (sensível a todas as toxinas) foi encontrado em oito (12,90%) dos pacientes sem lesão e em apenas 1(3,75%) paciente com a candidose. O biotipo 888 (resistente as toxinas) ocorreu em 25% dos isolados de pacientes portadores da candidose.

Matsumoto *et al.* (2002) em um estudo com crianças de hospital publico de São Paulo, Brasil, isolaram 80 cepas de leveduras, 59 a partir de culturas de sangue e 21 das culturas de cateteres vasculares. Verificaram que as espécies prevalentes no sangue e cateter foi *C. parapsilosis* (32,2% e 48,9%, respectivamente), seguida de *C. albicans* e *C. tropicalis* (16,9% e 28,6%, respectivamente). O teste de sensibilidade com as nove cepas produtoras de toxinas *killer* revelaram seis diferentes biotipos. As mais frequentes foram o biótipo 888 (resistente a todas as toxinas) com 48,8% dos isolados, destes 64,1% foram espécies de *C. parapsilosis*.

Estudo realizado por Silva (2006) avaliou a sensibilidade as toxinas *killer* de cepas de *C. dubliniensis* isoladas de pacientes HIV positivos. Foram realizados testes com quatro isolados de *C. dubliniensis* cedidas pela seção de micologia da USP (Universidade de São Paulo) e cinco isolados de cavidade bucal de pacientes com HIV. Após os testes de sensibilidade as toxinas *killer*, mostraram dois biotipos diferentes, 688 e 888, sendo três amostras de *C. dubliniensis* e cinco isolados presuntivos do biótipo 888 (resistente a todas as toxinas).

Trabalhos recentes como o realizado por Scheid *et al.* (2010) no qual o objetivo foi avaliar as diferenças de *C. dubliniensis* e *C. albicans* pelo uso do teste de sensibilidade as toxinas *killer* segundo método de proposto por Polonelli *et al.* (1983), revelaram que a sensibilidade de *C. albicans* às toxinas *killer* variou de 33,3% a 93,3% e de *C. dubliniensis* de 6,67% a 93,3%. Foram biotipados 21 registros e os números de códigos mais frequentes foram 111, 611 e 211, observados em ambas as espécies. Nenhum biotipo ocorreu como particularmente característica de *C. dubliniensis* e assim a sensibilidade as toxinas *killer* foram incapazes de diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis*.

Ribeiro *et al.* (2011) realizaram estudo com sessenta isolados bucais de *C. albicans* provenientes de pacientes atendidos na Clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás, Brasil, nos quais 37 foram provenientes da mucosa oral de crianças com síndrome de down, 14 de crianças sem a síndrome de down e

nove dos pais ou responsáveis. Esses indivíduos apresentavam mucosa bucal íntegra, não faziam uso de nenhuma medicação e possuíam uma faixa etária de zero a 11 anos de idade para as crianças e os pais ou responsáveis de 30 a 55 anos. Nos testes de sensibilidade foi verificado, segundo Polonelli *et al.* (1983), a biotipagem das *C. albicans* da boca frente às leveduras produtoras de toxinas *killer*, permitiu a detecção de cinco tipos *killer* (111, 112, 121, 186 e 888) em todos os grupos estudados. Os isolados de *C. albicans* da boca das crianças com síndrome de down apresentaram maior diversidade desses tipos *killer*. Os isolados resistentes a todas as proteínas *killer* (biótipo 888) foram evidenciadas apenas no grupo com crianças com a síndrome (2,7%) destes.

O estudo das toxinas *killer* tem várias aplicações, desde marcadores epidemiológicos a avaliadores de patogenicidade. Atualmente, essas leveduras tem sido utilizadas para estudar mecanismos de processamento e interação da toxina com células sensíveis. Além de estudos da expressão do vírus em organismos eucariótico, aplicações biotecnológicas e na medicina.

**3. INFECÇÕES FÚNGICAS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA PEDIÁTRICA E AVALIAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS QUANTO AO PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA E ÀS TOXINAS *KILLER*<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> A ser submetido para publicação a Medical Mycology

**INFECÇÕES FÚNGICAS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA  
PEDIÁTRICA E AVALIAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS QUANTO AO  
PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA E ÀS TOXINAS *KILLER***

Gleiciere Maia Silva\*, Alice Cristiane Rangel Silveira\*, Carolina Maria da Silva\*, Luciana Resende Bandeira de Mello<sup>+</sup>, Claudia Betânia Rodrigues de Abreu<sup>†</sup>, Rejane Pereira Neves\*

\*Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil, <sup>+</sup> Lacen (Laboratório Central do Estado de Pernambuco) and <sup>†</sup>Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brazil

Correspondência: Rejane Pereira Neves. Micologia Departamento, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof Nelson Chaves, s / n ° - Cidade Universitária, Recife-PE, 50670-420, Brasil. Telefone: +55 81 2126 8570. Fax: +55 81 2126 8480, E-mail: rejadel@yahoo.com.br

## RESUMO

Infecções fúngicas oportunistas em pacientes críticos internados em Unidades de Terapia Intensiva Pediátrica (UTIP) são consideradas de alto risco, com potencial letal. Esta pesquisa teve como objetivo diagnosticar infecções fúngicas em crianças e avaliar a capacidade dos agentes etiológicos quanto à sensibilidade a antifúngicos e as toxinas *killer*. Foram avaliadas amostras biológicas de 85 crianças de três hospitais públicos da cidade do Recife-PE/Brasil internadas em UTIP com clínica sugestiva para tais infecções. Foram realizadas coletas para obtenção de amostras de sangue, urina, líquido cefalorraquidiano, escamas epidérmicas, ponta de cateter, líquido sinovial, secreção ocular e secreção traqueal. Do total de pacientes avaliados, 23,5% foram diagnosticados com infecção fúngica, sendo 50% dos agentes etiológicos obtidos de amostras de sangue, seguido por 15% oriundos de escamas epidérmicas da região inguinal, 10% da região axilar, 15% de amostras de urina, 5% de líquido sinovial e 5% de secreção traqueal. Candidemia foi a infecção mais frequente e *Candida parapsilosis*, a espécie mais isolada. Em seguida *C. albicans*, em amostras de escamas epidérmicas, *C. tropicalis* em amostras de urina, *Fusarium oxysporum* no líquido sinovial e *C. albicans* em secreção traqueal. Quanto à sensibilidade antifúngica de todos os isolados, a resistência variou entre anidulafungina (12%), voriconazol (16%) e fluconazol (48%), entretanto não foi detectada resistência de nenhum isolado a anfotericina B. A sensibilidade às toxinas *killer*, 60% dos isolados foram resistentes e 40% sensíveis. Estudos com pacientes pediátricos e infecção fúngica são essenciais para diagnóstico clínico e laboratorial, bem como conduta do tratamento para melhora clínica.

Palavras-Chave: Infecções fúngicas, pacientes pediátricos, sensibilidade antifúngica; toxina *killer*

## INTRODUÇÃO

A frequência de infecções fúngicas vem aumentando nas últimas décadas devido a diversos fatores considerados predisponentes a estas infecções. Contudo, esse número tende a ser ainda maior nos pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva Pediátrica (UTIP's), os quais são submetidos a procedimentos invasivos e tratamentos com ação imunossupressora (HOTA, 2004).

Nas crianças internadas em Unidades de Terapia Intensiva Pediátrica (UTIP's) um dos fatores que favorecem às infecções fúngicas são prematuridade, estrutura imatura da pele, baixo peso ao nascer, tempo de internação, o uso prolongado de antibacterianos, inserção de cateter venoso central, nutrição parenteral, ventilação mecânica, uso de esteróides, dentre outros (BORGES *et al.*, 2009).

Além dos recém-nascidos, as crianças submetidas a cirurgias de grande porte também compõem esta população mais vulneráveis (CELEBI *et al.*, 2007).

Infecções fúngicas em UTIP's podem acometer de 2 a 10% dos pacientes internados, com taxa de mortalidade de até 60%, dependendo do estado geral e do agente etiológico envolvido no processo patológico (PASQUALOTTO *et al.*, 2007).

Nesse contexto, infecções causadas por fungos podem agravar o quadro clínico dos pacientes, uma vez que devido ao uso profilático de drogas antifúngicas, numerosos casos de resistência clínica tem sido constatados. Tal fato, reforça a importância da identificação das leveduras e dos fungos filamentosos, agentes dessas infecções e da realização de testes de sensibilidade antifúngica, para uma conduta terapêutica mais adequada (EVANS, 1999).

Diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com leveduras produtoras de toxinas conhecidas como toxinas *killer* ou proteínas *killer*, que apresentam efeitos letais sobre outros fungos e uma variedade de bactérias, tem sido alvo de intensas pesquisas. As leveduras que produzem essas toxinas são imunes à ação das suas próprias toxinas, mas podem ser sensíveis às proteínas *killer* produzidas por outros organismos. A capacidade de produção de toxinas *killer* deve representar uma vantagem seletiva entre espécies competidoras em um mesmo habitat, isso torna a cepa produtora mais patogênica e resistente a ação terapêutica (POLONELLI *et al.*, 1983).

Diante do exposto, os objetivos deste estudo foram verificar a ocorrência de infecções fúngicas em pacientes internados em UTIP e avaliar os agentes etiológicos quanto ao perfil de sensibilidade a fármacos antimicóticos comerciais e as toxinas *killer*.

## MATERIAIS E METODOS

Foram realizadas coletadas de 85 pacientes de três hospitais públicos da cidade do Recife, internados em UTIP's, totalizando 114 amostras clínicas obtidas durante o período de agosto de 2011 a Setembro de 2012. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos sob registro n 0366.0.172.106-11 do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, e está de acordo com a Resolução do CNS n 196/96.

Após a obtenção de amostras de sangue, urina, escamas epidérmicas da região axilar e inguinal, ponta de cateter, líquido sinovial, secreção ocular, secreção traqueal e líquido cefalorraquidiano (LCR) foram realizadas lâminas sem adição de corante ou clarificante (KOH a 20%) e, quando necessário, coradas com Giemsa para realização do exame direto (Figura 1). Concomitantemente, as amostras clínicas foram semeadas em duplicata na superfície do meio ágar Sabouraud (DIFCO) adicionado de 50 mg/L de cloranfenicol contido em placas de Petri, mantidas à temperatura de 30° C e 37° C por até 15 dias. Após o surgimento das colônias purificadas foi realizada a identificação segundo taxonomia clássica (BARNETT *et al.*, 2000; HOOG; GUARRO, 2000) e automatizada pelo Vitek 120.

Os testes de sensibilidade *in vitro* a drogas antifúngicas foram realizados segundo o método de microdiluição em caldo, de acordo com a padronização publicada no documento M27-A3 (CLSI, 2008b). As drogas antifúngicas testadas foram anfotericina B (UnitedMedical) (0.03-16µg/mL), anidulafungina (Pfizer) (0.015-8µg/mL), voriconazol (Pfizer) (0.03-16µg/mL e fluconazol (Pfizer) (0.125-64µg/mL). Nos ensaios foram incluídas linhagens do American Type Culture Collection (ATCC), de *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *Aspergillus flavus* ATCC 204304.

Para o teste de sensibilidade às toxinas *killer* foi realizado em leveduras semeadas em ágar Sabouraud modificado de acordo com Oliveira *et al.* (1998) e preparadas suspensão de levedura correspondente à escala 3 de McFarland. Posteriormente, a suspensão foi vertida em placas de Petri esterilizadas e sobre esta adicionado meio ágar Sabouraud modificado acrescido de azul de metileno. Após solidificação da preparação, foram realizados inóculos

na superfície do meio com as toxinas *killer* (K1, K2 e K3). A leitura foi realizada após 72 horas. As leveduras que apresentaram halo incolor foram consideradas sensíveis e as que apresentaram crescimento foram resistentes.

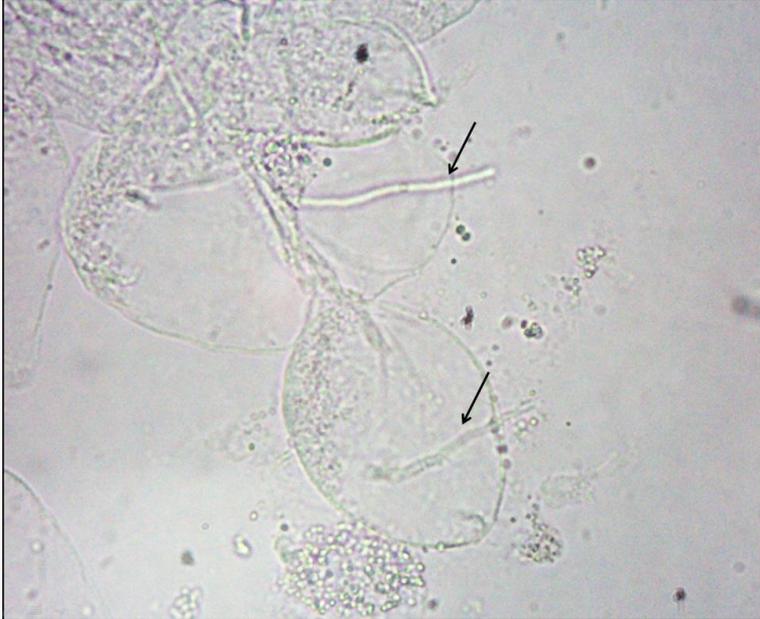


Figura 1. Microscopia do exame direto em amostra de escamas epidérmicas da região axilar clarificado com KOH a 20%, evidenciando filamentos micelianos hialinos.

## RESULTADOS

Dos 85 pacientes com clínica sugestiva para infecção fúngica em UTIP's, 20 (23,5%) desenvolveram infecção por fungos, dessas, micoses invasivas e superficiais acometeram ambos os sexos. A idade dos pacientes variou entre 1 mês a 15 anos com mediana de 2 anos de idade.

A origem das amostras clínicas coletadas foi variável, incluindo amostras de sangue, urina, líquido cefalorraquidiano (LCR), escamas epidérmicas da região axilar e inguinal, ponta de catéter, líquido sinovial, secreção ocular e secreção traqueal.

Do total de pacientes com micoses, 10 (50%) pacientes desenvolveram candidemia, dois (10%) pacientes com micoses superficiais em amostras de escamas epidérmicas da região axilar, três (15%) desenvolveram micoses superficiais em amostras de escamas epidérmicas oriundas da região inguinal, três (15%) pacientes com infecção no trato urinário, um (5%) com infecção no líquido sinovial e um (5%) em amostra de secreção traqueal.

Entre os agentes isolados de hemoculturas, 80% foram espécies do gênero *Candida* e 20% do gênero *Fusarium*. As espécies de *Candida* mais frequentes foram às espécies não *albicans*. *C. parapsilosis* (46,6%) foi a principal seguida de *C. albicans* (20%), *C. tropicalis* (13,3%) e *F. oxysporum* com (20%) dos casos.

Em amostras de escamas epidérmicas da região axilar e inguinal, duas espécies foram patógenas, *C.albicans* e *C.tropicalis*. Os isolados obtidos de escamas epidérmicas da região axilar todos foram identificados como *C. albicans*, os isolados obtidos da região inguinal 66,6% foram *C. albicans* e 33,3% *C. tropicalis*. Em amostras de urina foram isolados dois agentes, *C. tropicalis* (66,6%) e *C. guilliermondii* (33,3%). No líquido sinovial, um caso de infecção fúngica foi contatado por *F. oxysporum* e em secreção traqueal identificou-se *C. albicans*. Os agentes etiológicos bem como os números de isolados obtidos a partir das amostras biológicas e os sítios de isolamento estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Agentes etiológicos e sítios de isolamento dos casos de infecções fúngicas diagnosticadas em crianças internadas em UTIP's.

Agentes etiológicos	Sítios de isolamento									
	Sangue		Escamas epidérmicas (Total)		Urina		Líquido sinovial		Secreção traqueal	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>C. albicans</i>	3	20	4	80					1	100
<i>C. parapsilosis</i>	7	46,6								
<i>C. guilliermondii</i>					1	33,3				
<i>C. tropicalis</i>	2	13,3	1	20	2	66,6				
<i>F. oxysporum</i>	3	20					1	100		
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>100</b>	<b>5</b>	<b>100</b>	<b>3</b>	<b>100</b>	<b>1</b>	<b>100</b>	<b>1</b>	<b>100</b>

Quanto aos isolados obtidos em amostras de sangue e submetidos a testes de sensibilidade antifúngica, não houve resistência a anfotericina B, dois (13,3%) foram resistentes a

anidulafungina com CIM de 8 µg/mL, 10 (66,6%) foram resistentes ao fluconazol com CIM de 64 µg/mL e três (20%) foram resistentes ao voriconazol com CIM de 2 µg/mL.

Dos isolados provenientes de escamas epidérmicas da região axilar, não foi constatado resistência a nenhum das drogas testadas. Aos obtidos de escamas epidérmicas da região inguinal, não houve resistência a anfotericina B e anidulafungina, um (33,3%) foi resistente ao fluconazol com CIM de 64 µg/mL e ao voriconazol com CIM de 2 µg/mL.

As culturas isoladas de urina foram sensíveis a todas as drogas. Na amostra de líquido sinovial, no qual o agente etiológico foi *F. oxysporum*, foi sensível a anfotericina B (CIM de 0,03 µg/mL), anidulafungina (CIM de 0,03 µg/mL), voriconazol (CIM de 0,12 µg/mL) e resistente ao fluconazol com CIM de 64 µg/mL. O isolado de *C. albicans* obtido em amostra de secreção traqueal foi sensível a todas as drogas utilizadas.

Para os testes de sensibilidade as toxinas *killer*, os isolados foram testados para verificar o perfil de sensibilidade frente as três toxinas (k1, k2 e k3). Verificaram-se que 15 (60%) dos isolados foram resistentes as toxinas testadas e 10 (40%) foram sensíveis. A resistência foi identificada em 12 (80%) isolados obtidos de amostras de sangue, um (100%) de líquido sinovial e dois (66,6%) dos isolados provenientes de amostras de urina.

## DISCUSSÃO

A incidência de infecções fúngicas em pacientes das UTIP's avaliadas demonstrou-se elevada quando comparada a outros trabalhos. Nesse estudo, 23,5% dos pacientes apresentaram micoses, estudos relatam a incidência de 4,65% de infecção em pacientes de UTIP, entretanto alguns artigos apontam estudos com dados superiores (FILHO *et al.*, 2006).

Nesse estudo as amostras clínicas mais frequentes foram amostras de sangue (67%). Dentre os pacientes pediátricos que desenvolveram candidemia, *C. parapsilosis* (46,6%) foi a espécie mais isolada seguida de *C. albicans* (20%), *F. oxysporum* (20%) e *C. tropicalis* (13,3%). Estudos confirmaram a incidência de *C. parapsilosis* como agente mais frequente em pacientes de UTIP (SARVIKIVI *et al.*, 2005)

Dados semelhantes foram verificados em um hospital público de São Paulo, Brasil, nos quais as espécies prevalentes no sangue e cateteres de crianças foram *C. parapsilosis* (32,2% e 48,9%, respectivamente) seguida de *C. albicans* (16,9% e 28,6%) (MATSUMOTO *et al.*, 2002).

No Brasil *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* são as espécies de *Candida* não-*albicans* mais frequentemente isoladas. A vulnerabilidade ocasionada por *C. parapsilosis* em crianças, estão no fato dessas leveduras colonizarem a pele, principalmente as mãos de profissionais da saúde, soluções de uso hospitalares e cateter venoso central, como crianças não possuem o sistema imunológico bem desenvolvido aumentam o risco a infecções por este agente (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; WINGARD, 2005).

Outra forma clínica disseminada de infecção fúngica em pacientes graves é a fusariose, no presente estudo identificou-se *F. oxysporum* como agente de fungemia. Por ser um fungo filamentososapróbio, em condições normais não é considerado patogênico, entretanto em indivíduos graves e leucopênicos ocorrem esporadicamente (PAYA *et al.*, 2000; ROMANO *et al.*, 2010).

Em amostras de pele os isolados mais frequentes foram *C. albicans* (80%) e *C. tropicalis* (20%). *C. albicans* é a espécie mais isolada de infecções superficiais. Como causador de infecções no trato urinário identificou-se *C. tropicalis* e *C. quilliermondii*, bastante comum nesse grupo de pacientes.

Em relação à sensibilidade á antifúngicos todos os isolados foram sensíveis a anfotericina B, que é uma droga do grupo dos poliênicos que atuam ligando-se ao ergosterol, alterando a permeabilidade determinando assim a lise e morte celular (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Nesse estudo a resistencia a anidulafungina foi detectada em três isolados de *C. parapsilosis*, com média de 12% de resistência. Resistencia ao fluconazol foi detectada em quatro isolados de *C. parapsilosis*, três isolados de *C. albicans*, quatro isolados de *F. oxysporum*, um isolado de *C. tropicalis*, totalizando 48% de resistência e ao voriconazol dois isolados de *C. parapsilosis*, um isolado de *C. tropicalis* e um isolado de *C. albicans*, totalizando 16% de resistência. O alto índice de resistência ao fluconazol pode ser explicado porque todos os pacientes na pesquisa tiveram uma exposição prévia a esse antifúngico, usado como terapêutica profilática.

O uso empírico excessivo de antifúngicos no tratamento da candidíase, principalmente o fluconazol tem conduzido a resistência, sobretudo, em pacientes internados em UTIs. (ROILIDES *et al.*, 2004; FERREIRA; RAGAZZINI; ANDRADE, 2012).

O uso do voriconazol deve ser moderado em pacientes expostos previamente a outros azóis, devido ao potencial de resistência cruzada. Embora a maioria dos isolados resistentes sejam de *C. glabrata*, a ocorrência de resistência cruzada em isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* já foi verificada (ALEXANDER *et al.*, 2005; PANACKAL *et al.*, 2006).

Nesse estudo, quanto a sensibilidade as toxinas *killer*, 60 % dos isolados foram resistentes a todas as cepas utilizadas (k1, k2 e k3), estudos similares apresentam índices altos de resistência como em amostras isoladas de sangue e cateteres de crianças no Hospital de São Paulo, foram encontradas 48,8% dos isolados resistência as toxinas *killer* (MATSUMOTO *et al.*, 2002).

O estudo em pacientes de UTIP tem grande importância, pois fornece informações sobre os agentes etiológicos contribuindo para medidas de diminuição do agravamento do quadro clínico desses pacientes. Testes complementares como, sensibilidade a drogas antifúngicas e as toxinas *killer*, além de fornecer dados a respeito da terapia e a patogenicidade do agente causador auxilia na diminuição no índice de resistência as drogas disponíveis.

#### AGRADECIMENTOS

A equipe do laboratório de Micologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco, aos médicos pela credibilidade e confiança e ao CNPq pelo apoio financeiro para desenvolvimento deste trabalho.

**4. RELATO DE CASO: FUSARIOSE DISSEMIADA SECUNDÁRIA À  
NEUROBLASTOMA COM CURSO FATAL<sup>2</sup>**

<sup>2</sup>Submetido para publicação na Mycopathologia.

**RELATO DE CASO: FUSARIOSE DISSEMIANDA SECUNDÁRIA À  
NEUROBLASTOMA COM CURSO FATAL**

Gleiciere Maia Silva \*, Alice Rangel Cristiane Silveira \*, Claudia Abreu Rodrigues Betânia †, Danielle Cerqueira de Macêdo \*, Rejane Pereira Neves \*

\* Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, e † Unidades de Terapia Intensiva Pediátrica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brasil.

Correspondência: Rejane Pereira Neves. Micologia Departamento, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof Nelson Chaves, s / n ° - Cidade Universitária, Recife-PE, 50670-420, Brasil. Telefone: +55 81 2126 8570. Fax: +55 81 2126 8480, E-mail: rejadel@yahoo.com.br

## RESUMO

Fusariose disseminada é uma condição clínica que ocorre principalmente em pacientes imunodeprimidos. Neste trabalho, relatamos um caso fatal de fusariose disseminada secundária à neuroblastoma em paciente do sexo masculino com 15 anos, submetido a transplante de medula óssea. O paciente foi internado na Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica (UTIP) de um hospital público da cidade do Recife-PE, Brasil com aplasia medular, leucopenia e plaquetopenia severa. Após 15 dias, o paciente apresentou edema no joelho direito, sendo evidenciado derrame. Após coleta do líquido sinovial, a amostra clínica foi encaminhada ao Laboratório de Micologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco. Ao exame direto foram visualizadas hifas septadas e hialinas, e em cultura foi identificado *Fusarium oxysporum*. Após este diagnóstico, três amostras de sangue foram analisadas e positivas para o mesmo agente, confirmando o caso de fusariose disseminada. Ao teste de sensibilidade a antifúngicos, os isolados foram sensíveis a anfotericina B com concentração inibitória mínima (CIM) de 0,03 µg/mL, anidulafungina com CIM de 0,03 µg/mL e ao voriconazol com CIM de 0,12 µg/mL, sendo resistente ao fluconazol com CIM de 64 µg/mL. O paciente foi tratado com anfotericina B lipossomal associado ao voriconazol, apresentando melhora no edema e regressão da febre. Entretanto, por complicações da doença de base o paciente evoluiu ao óbito.

Palavras-chave: Fusariose disseminada, neuroblastoma e paciente pediátrico.

## INTRODUÇÃO

Fusariose é uma infecção causada por espécies de *Fusarium*, fungo de caráter oportunista, sapróbios do solo e importante patógeno de plantas, que acometem principalmente pacientes imunodeprimidos (JENSEN *et al.*, 2004). Essas infecções incluem desde lesões de superfície localizadas, focalmente invasivas ou disseminadas, neste último caso quando dois ou mais órgãos ou tecidos são afetados pelo patógeno invasor (SEKHON *et al.*, 1994; NUCCI; ANAISSE, 2007).

A fusariose representa uma complicação de alta morbidade e mortalidade em imunocomprometidos, sendo uma condição cada vez mais frequente nos portadores de neoplasias hematológicas. A incidência de infecções invasivas, por fungos filamentos, particularmente do gênero *Aspergillus*, *Zygomycetes* e *Fusarium*, tem aumentado; sobretudo em pacientes portadores dessa condição clínica, os quais recebem quimioterapia intensiva com drogas imunossupressoras potentes (NUCCI; ANAISSE, 2007).

O agravamento dos casos de fusariose neste grupo de pacientes é devido ao elevado número de cepas de *Fusarium* resistentes aos antifúngicos. As opções terapêuticas são limitadas e geralmente, para um sucesso terapêutico, é necessária administração de altas dosagens de anfotericina B (KARAM *et al.*, 2005). Por esse motivo, a mortalidade dessas infecções em pacientes submetidos à quimioterapia ou transplante de medula óssea varia entre 50-70% (JENSEN *et al.*, 2004).

O presente trabalho relata caso de fusariose disseminada com curso fatal em paciente com diagnóstico de neuroblastoma e transplantado de medula óssea.

## RELATO DE CASO

Paciente com 15 anos do sexo masculino foi diagnosticado com neuroblastoma (NB), neoplasia maligna, responsável por 97% de todos os tumores neuroblásticos em crianças. Diante da gravidade do neuroblastoma, houve acometimento da medula óssea sendo submetido em junho de 2011 a um transplante em hospital público do Rio Grande do Sul, Brasil. Após quatro meses deste procedimento, o paciente foi admitido em hospital terciário de Recife-PE, Brasil, apresentando fortes dores de cabeça, vômitos, seguido por diminuição do nível de consciência. Diante do quadro grave, foi transferido para a Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica (UTIP) do referido hospital em novembro do mesmo ano, onde

constatarem aplasia medular e plaquetopenia grave, além dos mesmos sintomas do momento da admissão e insuficiência respiratória.

O paciente foi submetido a uma intubação orotraqueal e coletas de sangue. Os achados laboratoriais mostraram leucopenia de  $305/\text{mm}^3$  e plaquetopenia com  $20.000/\text{mm}^3$ . O quadro clínico do paciente se agravou com falência da medula óssea, trombocitopenia grave, seguida de midríase anisocória, evoluindo para o coma e não respondendo a estímulos. Após 15 dias na UTIP o paciente apresentou edema no joelho direito sendo solicitada uma ultrassonografia, através da qual foi evidenciada derrame articular na face merval, atrial e fossas supra-artelar.

Ainda em novembro de 2011, o paciente fez uso empírico de sulfametoxazol e trimetoprim, persistindo com leucopenia, plaquetopenia e febre, além do edema no joelho. Foi solicitada coleta do líquido sinovial para exame micológico no Laboratório de Micologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco<sup>3</sup>. Foram confeccionadas lâminas para exame direto, sem adição de corante e clarificante, sendo observadas hifas hialinas e septadas (Figura 1).

A cultura do material foi realizada em meio ágar Sabouraud (Difco) com antibiótico, em duplicata, e as placas foram mantidas a  $28^\circ$  e  $37^\circ\text{C}$ , exibindo crescimento rápido (5 a 8 cm em dez dias), com esporulação após três dias. Em meio Ágar Batata Dextrose (Difco) foram observadas colônias algodonosas, com coloração que variou de branco, rósea a violeta e reverso escuro e à microscopia foram evidenciados microconídios curtos e fusiformes (Figura 2). Assim, com base nas características macroscópicas e microscópicas, o agente etiológico foi identificado como *Fusarium oxysporum*, segundo Leslie e Brett (2006)

Após o diagnóstico da infecção fúngica articular e devido às condições clínicas do paciente que se agravavam, foi solicitada hemocultura a partir de três amostras de sangue coletadas em dias alternados por punção venosa. Posteriormente, *F. oxysporum* foi isolado de todas as amostras de sangue, sugerindo uma fusariose disseminada.

Foi realizado o teste de sensibilidade a antifúngicos pelo método de microdiluição em caldo, segundo documento M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2008) e usados os antifúngicos: anfotericina B, anidulafungina, voriconazol e fluconazol. Os isolados de *F. oxysporum* exibiram mesmo padrão de sensibilidade, com concentração

inibitória mínima (CIM) de 0,03 para anfotericina B, 0,03 para anidulafungina e 0,12 para voriconazol. Os isolados exibiram perfil de resistência com CIM de 64 frente ao fluconazol.

Diante dos resultados dos testes de sensibilidade aos antifúngicos, foi administrado ao paciente anfotericina B lipossomal (Ambisome®) por 30 dias (300mg/dia), seguido por voriconazol intravenoso por duas semanas (200mg/dia) com melhora da febre e do edema no joelho. Entretanto o mesmo desenvolveu diversas complicações como hipocalcemia severa, tubulopatia, diarreia e diabetes *insipidus* nefrogênico.

Devido a sintomas neurológicos, foi submetido à tomografia computadorizada de crânio que apresentou grande hematoma intraparenquimatoso no tronco com inundação intraventricular e dilatação do terceiro e quarto ventrículo. O paciente foi mantido sedado, evoluindo com sangramento nas vias respiratórias e parada cardiorrespiratória em assistolia. Assim, devido ao agravamento do quadro clínico, o paciente foi a óbito.



Figura1. Exame micológico direto do líquido sinovial evidenciando hifas hialinas e septadas típicas de fungo filamentosos hialino.

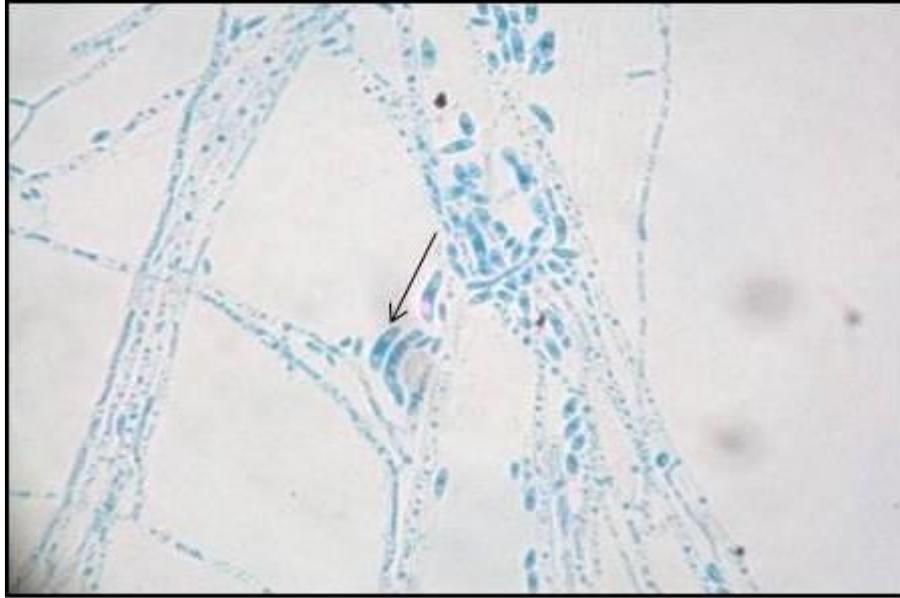


Figura 2. Microscopia da cultura evidenciando microconídios curtos e fusiformes característicos de *Fusarium oxysporum*.

## DISCUSSÃO

Fusariose disseminada é a forma clínica mais desafiadora de infecção fúngica em pacientes imunocomprometidos, com tumores sólidos, neoplasias hematológicas como leucemia aguda, transplantados, bem como pacientes graves com neutropenia prolongada. O padrão clínico-laboratorial mais frequente na fusariose disseminada é uma combinação de lesões cutâneas e culturas de sangue positivas, com ou sem envolvimento de outros órgãos (NUCCI; ANAISSE, 2007; EVEN *et al.*, 2011; MARTINO; KERGUÉLEN; VALCARCEL, 2011).

Neste estudo, o paciente possuía um NB, um tumor sólido extracraniano que acomete mais frequentemente crianças. Devido a sua gravidade, podem ocorrer metástases, afetando diversos órgãos, como linfonodos distantes, ossos, fígado e medula óssea neste caso relatado, o acometimento da medula óssea, o estado de neutropenia severo, as drogas imunossupressoras e o uso de cateter predispueram o paciente à aquisição desta infecção fúngica (EVANS; D'ANGIO; RANDOLPH, 1971; MATTHAY *et al.*, 1998).

*F. oxysporum*, por ser um fungo filamentoso sapróbio, não é considerado patogênico em pacientes imunocompetentes, entretanto em indivíduos imunocomprometidos podem causar manifestações agressivas de difícil resposta clínica aos antifúngicos disponíveis comercialmente (PAYA; ZUBIETA; PIONTELLI, 2000).

Uma revisão sistemática mostrou que as infecções sanguíneas por *F. oxysporum* ocorrem esporadicamente e os casos publicados são estritamente relacionados com as condições de imunossupressão, como tumores sólidos e doenças malignas hematológicas. Além disso, a leucopenia e a utilização de produtos químicos e radioterapia aumentam a incidência destas infecções (GIANNI; CERRI; CROSTI, 1997; PAYA; ZUBIETA; PIONTELLI, 2000; JOLY *et al.*, 2003; ROTHE *et al.*, 2004; ROMANO *et al.*, 2010).

Estudos indicam que nos indivíduos neutropênicos, anfotericina B e sua formulação lipossomal são as drogas sistêmicas mais eficientes e consideradas de escolha para o tratamento da fusariose, apesar de falhas terapêuticas terem sido reportadas (CONSIGNY *et al.*, 2003). Contudo, mais recentemente, a terapia de combinação antifúngica tem exibido melhores resultados nos casos de infecção disseminada por *F. oxysporum*, especialmente a combinação entre polienos e azoles de segunda geração como voriconazol (GUARRO; GENE, 1995; SPEELEVELD *et al.*, 1996; BOUTATI; ANAISSIE, 1997; PINCELLI *et al.*, 2008).

Pacientes com doenças hemato-oncológicas merecem atenção especial. Estas ocorrem principalmente durante neutropenia ou na fase de pós-transplantação imediata, em pacientes com neoplasias hematológicas ou após o transplante de medula óssea. Neste último caso, muitas vezes o tratamento antifúngico pode ser ineficaz (WALSH; GROLL, 1999). Assim, a alta taxa de mortalidade na fusariose disseminada ocorre tanto pela gravidade da infecção como pela doença de base do indivíduo. Existem evidências de que a neutropenia seja o principal fator associado à piora no estado clínico do paciente (CONSIGNY *et al.*, 2003) sendo considerado de extrema importância o monitoramento do número de leucócitos para se obter sucesso terapêutico.

#### AGRADECIMENTOS

A equipe do laboratório de Micologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco, aos médicos pela credibilidade e confiança e ao CNPq pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

**5. RELATO DE CASO: CANDIDEMIA EM CRIANÇA PORTADORA DE FIBROSE CÍSTICA COM CURSO FATAL<sup>3</sup>**

<sup>3</sup> A ser submetido para publicação na Brazilian Journal of Microbiology.

**RELATO DE CASO: CANDIDEMIA EM CRIANÇA PORTADORA DE FIBROSE CÍSTICA COM CURSO FATAL**

Gleiciere Maia Silva \*, Alice Rangel Cristiane Silveira \*, Reginaldo Gonçalves de Lima Neto\*, Cláudia Abreu Rodrigues Betânia †, Rejane Pereira Neves \*

\* Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, e † Unidades de Terapia Intensiva Pediátrica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brasil.

Correspondência: Rejane Pereira Neves. Micologia Departamento, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof Nelson Chaves, s / n ° - Cidade Universitária, Recife-PE, 50670-420, Brasil. Telefone: +55 81 2126 8570. Fax: +55 81 2126 8480, E-mail: rejadel@yahoo.com.br

## RESUMO

Candidemia é um grave problema de saúde pública. Nesse trabalho relatamos um caso de candidemia em lactente portador de fibrose cística internado em Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica (UTIP) com curso fatal. Paciente com seis meses de idade, do sexo masculino com histórico de tosse produtiva e febre persistente. Foi admitido na UTIP de um hospital público da cidade do Recife, PE, Brasil, com diagnóstico de dispneia e fibrose cística, apresentando um quadro infeccioso respiratório. Foi administrado antibióticos, entretanto sem sucesso, foi solicitada hemocultura de sangue periférico e de transcateter, os agentes isolados foram *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente. Após sete dias o paciente apresentou lesão na genitália e febre persistente. Foi realizada coleta de sangue e da lesão da genitália, as amostras foram encaminhadas ao laboratório de Micologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco para realização do exame direto e das culturas. *Candida albicans* foi identificada como agente etiológico da lesão da genitália e do sangue através da taxonomia clássica e do sistema automatizado VITEK 120. O teste de sensibilidade a antifúngicos seguiu protocolo pelo método de microdiluição em caldo, M27-A3 (CLSI- *Clinical and Laboratory Standard Institute*, 2008b). Os isolados de amostras de sangue foram sensíveis a anfotericina B com Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 0,03 µg/mL, 0,12 µg/mL para anidulafungina e ao 0,25 µg/mL para voriconazol, exibindo resistência ao fluconazol com CIM de 64 µg/mL. *C. albicans* isolada da lesão da genitália foi sensível a todas as drogas utilizadas. Foi administrado ao paciente nistatina 4 vezes ao dia e anfotericina B. O paciente obteve melhora da lesão da genitália e da febre. Contudo, após três dias o paciente apresentou déficit cardíaco e respiratório que conduziu a parada cardíaca, indo ao óbito.

Palavras- Chave: Candidemia, paciente pediátrico, fibrose cística.

## INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas exibem apresentações clínicas variáveis com envolvimento desde a camada mais externa da epiderme a infecções graves e disseminadas (CAPONE *et al.*, 2001; BLYTH *et al.*, 2011).

Fatores de risco tais como prematuridade, baixo peso ao nascer, a estrutura da pele imatura, tempo de internação, uso prolongado de antibióticos, inserção de cateteres venosos centrais, nutrição parenteral, ventilação mecânica e uso de esteróides aumentam a frequência das infecções em crianças (BORGES *et al.*, 2009).

A espécie mais comumente encontrada como agente etiológico em crianças é *Candida albicans*, embora outras espécies de leveduras tenham emergido nos últimos anos, como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (ROCHA *et al.*, 2008).

A complexidade de pacientes pediátricos e as mais variadas doenças de base aumentam os riscos para infecções fúngicas. Assim, micoses oportunistas se apresentam como desafios consideráveis para diagnóstico e terapia desse grupo de pacientes. Neste sentido, a fibrose cística pode contribuir para o desenvolvimento de infecções, em particular do trato respiratório (WALSH, 2004; O'BRIEN; HARDEN; COM G, 2012).

No presente estudo descrevemos um caso de candidemia em criança com fibrose cística com curso fatal.

## RELATO DE CASO

Um bebê do sexo masculino, com seis meses de idade e com uma história de tosse produtiva, congestão nasal e febre por 15 dias foi encaminhado a um hospital público de Recife, Brasil, com o diagnóstico de fibrose cística (FC), dispnéia, infecção respiratória e desidratação. Diante do quadro clínico foi admitido na Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica (UTIP). Foi tratado inicialmente com ampicilina e eritromicina e desenvolveu diarreia, vômitos com piora dos sintomas.

Para elucidar a infecção, foram solicitadas culturas de sangue periférico e transcateter para o diagnóstico laboratorial. Na cultura identificou-se *Staphylococcus epidermidis* resistente à azitromicina, ciprofloxacina, gentamicina, oxacilina, penicilina G, trimetoprim

e sulfametoxazol e no material do transcateter foi identificado *Pseudomonas aeruginosa* resistentes ao imipenem e meropenem.

Após sete dias, o paciente apresentou lesão na genitália e foram solicitadas amostras clínicas da lesão e cultura de sangue. As amostras coletas foram encaminhadas para o Laboratório de Micologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco. O exame direto das escamas epidérmicas foi clarificado com hidróxido de potássio (KOH) a 20%, facilitando a observação por meio de microscopia direta de estruturas fúngicas. Foram visualizadas numerosas células de leveduras ovais e hialinas com formação de pseudo-micélio (Figura 1).

As amostras de sangue e escamas epidérmicas foram semeadas em meio de Sabouraud Dextrose ágar (Difco), suplementado com cloranfenicol (50 mg/L) em placas de Petri, incubadas a 28°C e 35°C durante até 15 dias. A identificação foi realizada de acordo com critérios morfofisiológicos, descritos por Barnett *et al.* (2000) e através do sistema automatizado VITEK 120. *C. albicans* foi identificado como agente das lesões na genitália e hemoculturas, por todos os métodos utilizados.

O perfil de sensibilidade antifúngica dos isolados de *C. albicans* foram realizados pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com a padronização publicada nos documentos M27-A3 (CLSI 2008b). As drogas antifúngicas testadas foram anfotericina B (UnitedMedical) (0,03-16µg/mL), anidulafungin (Pfizer) (0,015-8µg/mL), voriconazol (Pfizer) (0,03-16µg/mL) e fluconazol (Pfizer) (0,125-64µg/mL). Nos ensaios foram incluídas linhagens do American Type Culture Collection (ATCC), de *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. albicans* ATCC 200955.

A partir das amostras de pele os isolados exibiram o mesmo padrão de sensibilidade, sendo sensíveis a todos os fármacos testados. As culturas obtidas a partir de sangue foram sensíveis à anfotericina B com concentração inibitória mínima (CIM) de 0,03 µg/mL, para a anidulafungina 0,12 µg/mL e para o voriconazol 0,25 µg/mL, no entanto, os isolados exibiram perfil de resistência com CIM de 64 µg/mL frente ao fluconazol.

O tratamento foi realizado com nistatina (4 vezes ao dia) e anfotericina B lipossomal (Ambisome®) por 30 dias (300mg/dia). O paciente apresentou melhora das lesões genitais e do quadro febril.

No entanto, depois de três dias, desenvolveu déficit cardíaco e respiratório, conduzindo ao óbito.



Figura 1. Microscopia do exame direto clarificado com KOH a 20%, evidenciando numerosas células de leveduras ovais, hialinas com pseudomicelio.

## DISCUSSÃO

A incidência de fungemia aumentou consideravelmente em pacientes hospitalizados. Os fungos mais comumente isolados a partir de amostras de sangue são espécies do gênero *Candida*, destes 50% dos episódios de candidemia são devido a *C. albicans* (WENZEL; PFALLER, 1991; STAMOS; ROWLEY, 1995).

Pacientes com doença de base grave são mais susceptíveis a desenvolverem candidemia, sobretudo em pacientes pediátricos. O caso relatado trata-se de um paciente com FC, que é uma doença autossômica recessiva letal associada a infecções respiratórias crônicas e o seu diagnóstico é sugerido pelas características clínicas de doença pulmonar obstrutiva crônica, colonização pulmonar persistente (REIS; DAMASCENO, 1998).

A FC não tem cura, entretanto quando o paciente é tratado, apresenta melhora significativa com o tratamento sintomático. Estudos indicam que o diagnóstico precoce diminui a morbidade. As principais manifestações clínicas são insuficiência pancreática, respiratória e desnutrição (WANG *et al.*, 2002; WAGENER; HEADLEY, 2003).

Quando o paciente com FC adquire além de infecções por bactérias associadas com fungos, o quadro clínico agrava-se e geralmente tem um curso fatal. Embora nesse grupo

exista predisposição para colonização por *P. aeruginosa*, a colonização crônica por este agente indica prognóstico ruim.

Pacientes com FC sofrem infecções repetidas por bactérias, inicialmente *S. aureus*, *Haemophilus influenzae* e posteriormente *P. aeruginosa* (REIS; DAMASCENO, 1998). Com repetidos ciclos de antibióticos, os pacientes tornam-se vulneráveis a infecções fúngicas.

Uma revisão sistemática mostrou que as infecções sanguíneas por *C. albicans* em pacientes com FC é muito raro, e os casos publicados são relacionada com as condições de imunossupressão no qual o paciente fibrocístico desenvolve infecção mais comumente por um fungo *Pneumocystis jirovecii* (PEDERIVA, 2010).

Neste estudo o paciente desenvolveu infecção superficial e candidemia por *C. albicans*, um dos agentes mais comuns de candidemia em crianças internadas em UTIP (PAPPAS *et al.*, 2003).

Candidemia é uma das principais causas de morte provocada por infecções, sobretudo em pacientes pediátricos e com uma doença de base grave. Acredita-se que esses índices podem estar relacionados ao diagnóstico tardio além do tratamento antifúngico tardio ou ineficaz (MONDELI *et al.*, 2012).

A junção de candidemia e a doença de base grave de um paciente pediátrico, geralmente tem um curso clínico desfavorável, a fungemia quando não tratada adequadamente sem um diagnóstico precoce, agrava o quadro clínico e pode ser causa da mortalidade. É imprescindível um maior cuidado dos pacientes pediátricos com historio grave a fim de que não desenvolva a fungemia, agravando ainda mais a situação.

## AGRADECIMENTOS

A equipe do laboratório de Micologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco, aos médicos pela credibilidade e confiança e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro ao desenvolvimento deste trabalho.

## 6. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os resultados obtidos permitem concluir:

- Espécies de *Candida* predominam como agentes de micoses em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva Pediátrica.
- A micose mais frequente foi fungemia seguida de infecções de pele.
- Fungemia em pacientes de Unidades de Terapia Intensiva Pediátrica teve como agente etiológico espécies de *Candida* e *Fusarium oxysporum*.
- *Fusarium oxysporum* foi causador de micose invasiva em paciente de Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica.
- Infecções fúngicas em pacientes de Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica acometem ambos os sexos.
- Entre as espécies de fungos causadores de fungemia, *Candida parapsilosis* foi a espécie mais frequente.
- *Candida albicans* é a espécie mais frequente causadora de micoses superficiais em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva Pediátrica.
- *Candida tropicalis* é a espécie mais frequente causadora de infecção do trato urinário em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva Pediátrica.
- Anfotericina B foi o antifúngico mais potente, sendo todos os isolados de fungos avaliados sensíveis a este fármaco.
- Fluconazol foi o antifúngico menos eficiente nos isolados obtidos de pacientes de Unidades de Terapia Intensiva Pediátrica.
- Não houve casos de resistência às drogas utilizadas aos isolados obtidos de amostras de urina.
- A maior parte dos isolados obtidos de amostras de pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva Pediátrica foram resistentes às toxinas *killer*, caracterizando-os como mais patogênicos.

## REFERÊNCIAS

- Alexander, B.D., Schell, W.A., Miller, J.L., Long, G.D., Perfect, J.R. 2005. *Candida glabrata* fungemia in transplant patients receiving voriconazole after fluconazole. *Transplantation* 80: 868-871.
- Alves M.J.F, Alves M.V.M.F.F., Bastos H.D. 2000. Validação do uso de escores preditivos em uma unidade de terapia intensiva pediátrica do Brasil. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva* 1: 36-43.
- Associação de Medicina Intensiva Brasileira. 1997. Projeto AMIB do Tamanho do Brasil: *1º Censo Brasileiro de UTI's*. São Paulo.
- Aquino V.R., Lunardi L.W., Goldani L.Z., Barth A.L. 2005. Prevalence, susceptibility Profile for Fluconazole and Risk Factors for Candidemia in a Tertiary Care Hospital in Southern Brazil. *Microbiology Unit - Section of Clinical Pathology* 9: 412-420.
- Barberino M.G., Silva N., Rebouças C., Barreiro K., Alcântara A.P, Netto E.M, Albuquerque L., Brites C. 2006. Evaluation of blood stream infections by *Candida* in three tertiary hospitals in Salvador, Brazil: a case-control study. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 10: 36-40.
- Barchiesi F., Colombo A.L., MCGough D.A., Rinaldi M.G. 1994. Comparative study of broth macrodilution and microdilution techniques for in vitro antifungal susceptibility testing of yeasts by using the National Committee for Clinical Laboratory Standards proposed standard. *Journal of Clinical Microbiology* 32: 2494-2500.
- Bertolini G., Ripamonti D., Cattaneo A., Apolone G. 1998. Pediatric risk of mortality: an assessment of its performance in a sample of 26 Italian intensive care units. *Critical Care Medicine* 26: 1427-32.
- Blyth M.B., Christopher B.C., Palasanthiran P., Tracey A. 2011. Antifungal Therapy in Children With Invasive Fungal Infections: A Systematic Review. *Pediatrics.aappublications.org*. August 2.
- Borges M. R., Soares L.R., Brito C.S., Brito D.V.D., Abdallah V.O.S., Filho P.P.G. 2009. Fatores de risco associados à colonização por *Candida* spp em neonatos internados em uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal brasileira. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42: 431-435.
- Boutati E.I., Anaissie E.J. 1997. *Fusarium*, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: ten years' experience at a cancer center and implications for management. *Blood* 90: 999-1008.
- Brilhante R.S., Cordeiro R.A., Medrano D.J., Rocha M.F., Monteiro A.J., Cavalcante C.S., Meireles T.E., Sidrim J.J. 2005. Onychomycosis in Ceara (Northeast Brazil):

epidemiological and laboratory aspects. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 100:131–135.

Burke J.P. 2003. Infection control - a problem for patient safety. *The New England Journal of Medicine* 348: 651-656.

Capone D., Jansen J.M., Lopes A.J., Siqueira H.R., Costa A.A., Capone R.B. 2001. Micose Pulmonares. *Revista Científica do Hospital Universitário Pedro Ernesto* 14: 28-39.

Carvalho L.P., Bacellar O., Neves N.A., Carvalho E.M., Jesus A.R. 2003. Avaliação da resposta imune celular em pacientes com candidíase recorrente. *Revista Brasileira de Medicina Tropical* 36: 571-576.

Carrillo-Esper R., Carrillo-Córdova J.R., Carrillo-Córdova L.D. 2009. Estudio epidemiológico de la sepsis en unidades de terapia intensiva mexicanas. *Cirugía y Cirujanos* 77: 301-308.

Celibi S., Hacmustafaoglu M., Ozdemir O., Ozkaya G. 2007. Nosocomial candidaemia in children: results of a 9 years study. *Mycoses* 51: 248-57.

Chunchanur S.K., Nadgir S.D., Halesh L.H., Patil B.S., Kausar Y., Chandrasekhar M.R. 2009. Detection and antifungal susceptibility testing of oral *Candida dubliniensis* from human immunodeficiency virus-infected patients. *Indian Journal of Pathology and Microbiology* 52: 501-4.

CLSI. 2008. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada-Segunda Edição. Norma M27-A3. Estados Unidos.

CLSI. 2008. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada-Segunda Edição. Norma M38-A2. Estados Unidos.

Clark T.A., Hajjeh H.A. 2002. Recent Trends in The Epidemiology of Invasive Mycoses. *Current Opinion in Infectious Diseases* 15: 569-574.

Coleman D.C., Rinaldi M.G., Haynes K.A., Rex J.H., Summerbell R.C., Anaissie E.J., Li A., Sullivan D.J. 1998. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. *Medical Mycology* 36: 156-165.

Colombo A. L., Barchiesi F., Mcgough. A., Rinaldi G. 1995. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 535-540.

Colombo A.L., Guimarães T. 2003. Epidemiology of Hematogenous Infections due to *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36: 599-607.

Colombo A.L., Nucci M., Park B.J., Nouer A.S., Arthington-Skaggs B., Matta D.A., Warnock D., Morgan J. 2006. Brazilian Network Candidemia Study. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 2816-2823.

Colombo A.L., Nucci M., Salomão R., Branchini M.L., Richtmann R., Derossi A. 1999. High rate of non-albicans candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease Journal* 34: 281-6.

Colombo A.L., Guimarães T. 2007. Candidúria: Uma abordagem clínica e terapêutica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40: 332-337.

Consigny S., Dhedin N., Datry A., Choquet S., Leblond V., Chosidow O. 2003. Successful voriconazole treatment of disseminated fusarium infection in an immunocompromised patient. *Clinical infectious diseases* 37: 311-3.

Cruz R., Piontelli E. 2011. Enfermedad fungica invasora em pacientes de cinco hospitales de la region de valparaiso, Chile 2004 a 2009. *Rev chil infect* 28: 123-129.

De Souza D.C., Troster E.J., de Carvalho W.B., Shin S.H., Cordeiro A.M.G. 2004. Disponibilidade de unidades de terapia intensiva pediátrica e neonatal no município de São Paulo. *Jornal de Pediatria* 80: 453-60.

Edmond M.B., Wallace S.E., McClish D.K., Pfaller M.A., Jones R.N., Wenzel, R.P. 1999. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clinical Infectious Diseases* 29: 239-244.

Einloft P.R., Garcia P.C., Runo P.F., Kipper D.J., Fiori R.M. 2002. Perfil epidemiológico de dezesseis anos de uma unidade de terapia intensiva pediátrica. *Revista de Saúde Pública* 36: 728-33.

Evans E.G. 1999. Resistance of *Candida* species to antifungal agents used in the treatment of onychomycosis: a review of current problems. *Brazilian Journal of Dermatology* 141: 33-5.

Evans A.E., D'Angio G.J., Randolph J., 1971. A proposed staging for children with neuroblastoma. A children's cancer study group. *Cancer* 2: 374-378.

Even C., Bastuji-Garin S., Hicheri Y., Pautas C., Botterel F., Maury S., Cabanne L., Bretagne S., Cordonnier C. 2011. Impact of invasive fungal disease on the chemotherapy schedule and event-free survival in acute leukemia patients who survived fungal disease: a case control study. *Haematologica* 96: 337-341.

Favel A., Liebermann M., Michel-Ngyen A. 1995. Fluconazole susceptibility testing of *Candida* species: a comparative study of RPMI, high resolution and casitone media. *Journal of Mycology Medical* 5: 7-12.

Ferreira B.F.F., Ragazzini L.J., Andrade M.C. 2012. Investigação da Sensibilidade ao Fluconazol e Produção de Enzimas Hidrolíticas por *Candida* sp. Isoladas do Trato Respiratório de Pacientes Internados em um Hospital no Sul de Minas Gerais. *Rev Ciências Saúde* 2: 1-9.

Fica C.A. 2004. Tratamiento de infecciones fúngicas sistêmicas primera parte: fluconazol, itraconazol y voriconazol. *Revista Chilena de Infectología* 21: 26-38.

Fisher J.F. 2000. Candiduria: when and how to treat it. *Current Infectious Diseases Report* 2: 523-530

Filho V.C., Reschke C.R., Hörner R. 2006. Perfil Epidemiológico das Infecções hospitalares na Unidade de Terapia Intensiva Infantil do Hospital de Caridade e Beneficência de Cachoeira do Sul, RS, Brasil. *Revista Brasileira de Análises Clínicas* 38: 267-270.

França J.C.B., Ribeiro C.E.L., Queiroz-Telles F. 2008. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41: 23-28.

Furlaneto-Maia, L., Specian, A.F.L., Wilnerzon, D.S.T., Oliveira, M.T., Furlaneto, M.C. 2007. Estudo da incidência de amostras clínicas do gênero *Candida* isoladas de diversos sítios anatômicos. *Acta Scientiarum Health Science* 29: 33-37.

Ghannoum M.A., Kuhn D.M. 2002. Voriconazole. Better chances for patients with invasive mycosis. *European Journal of Medical Research* 7: 242-56.

Giolo M. P., Svidzinski T.I.E. 2010. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 46: 225-234.

Golubev W., Shabalin Y. 1994. Microcin production by the yeast *Cryptococcus humicola*. *FEMS Microbiology Letters* 119: 105–110.

Guarro J., Gene J. 1995. Opportunistic fusarial infections in humans. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 14: 741–754.

Gianni G., Cerri A., Crosti C. 1997. Unusual clinical features of fingernail infection by *Fusarium oxysporum*. *Mycoses* 40: 455–459.

Gudlaugsson O., Gillespie S., Lee K., Vande B. J., Hu J., Messer S., Herwaldt L., Pfaller M., Diekema D. 2003. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clinical Infectious Diseases* 37: 1172–1177.

Hahn R.C., Prado K.S., Dias L.B., Braga H.R., Rezende S.B., Monteiro C.N., Silva P.H. 2008. Candidíase em um hospital universitário mato-grossense: Incidência, frequência das diferentes espécies e susceptibilidade aos antifúngicos. *Prática Hospitalar* 69-72.

Hazen K.C., Baron E.J., Colombo A.L., Girmenia C., Sanches-Souza A., Palacio A., Bedout C., Gibbs D.L. 2003. Comparison of Susceptibility of *Candida* spp. To Fluconazole and Voriconazole in a 4-Yara Global Evaluation Using Disk Diffusion. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 5623-5632.

Herbrecht R., Denning D.W., Patterson T.F., Bennett J.E., Greene R.E., Oestmann J.W., Kern W.V., Marr K.A., Ribaud P., Lortholary O., Sylvester R., Rubin R.H, Wingard J.R, Stark P., Durand C., Caillot D., Thiel E., Chandrasekar P.H, Hodges M.R, Schlamm H.T, Troke P.F., Pauw B. 2002. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *The New England Journal of Medicine* 347: 408-15.

Hinrichsen S.L., Falcão E., Vilella T.A.S., Colombo A.L., Nucci M., Moura L., Rêgo L., Lira C., Almeida L. 2008. Candidemia em hospital terciário do nordeste do Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41: 394-398.

Horn D.L., Neofytos D., Anaissie E.J., Fishman J.A., Steinbach W.J., Olyaei A.J., Marr K.A., Pfaller M.A., Chang C.H., Webster K.M. 2009. Epidemiology and Outcomes of Candidemia in 2019 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy Alliance Registry. *Clinical Infectious Diseases* 48: 1695–703.

Hota B. 2004. Contamination, disinfection, and cross-colonization: are the hospital surface reservoirs for nosocomial infection. *Clinical Infectious Diseases* 39: 1182-1189.

Jaffar A., Tawfiq A.L. 2006. Distribution and epidemiology of *Candida* species causing fungemia at a Saudi Arabian hospital, 1996-2004. *International Society for Infectious Diseases* 11: 239-244.

Jensen T.G., Gahrn-Hansen B., Arendrup M., Bruun B. 2004. *Fusarium* fungaemia in immunocompromised patients. *Clinical Microbiology and Infection* 10: 499-501.

Joly I.D., Alfandari S., Benchikh Z.D., Rodrigue M., Ingroff A.E., Catteau B. Cordevant C., Camus D., Dei-Cas E., Bauters F., Delhaes L. 2003. Successful Outcome of Disseminated *Fusarium* Infection with Skin Localization Treated with Voriconazole and Amphotericin B-Lipid Complex in a Patient with Acute Leukemia. *Journal of clinical microbiology*. 4898–4900.

Jorge A.O.C., Junqueira J.C., Romero M.M., Martins C.A.P. 2000. Sensibilidade as toxinas killer de espécies de *Candida* isoladas da cavidade bucal de pacientes com candidose e de indivíduos normais. *Revista de Odontologia* 29: 71-80.

Kandel J.S., Stern T.A. 1979. Killer phenomenon in pathogenic yeasts. Antimicrobiology Agents. *Chemotherapy* 15: 568-571.

Kauffman C.A., Fisher J.F., Sobel J.D., Newman C.A. 2011. Candida Urinary Tract Infection-Diagnosis. *Clinical Infectious Diseases* 52: 452-456.

Kauffman C.A., Vazquez J.A., Sobel J.D., Gallis H.A., McKinsey D.S., Karchmer A.W., Sugar A.M., Sharkey P.K., Wise G.J., Mangi R., Mosher A., Lee J.Y., Dismukes W.E. 2000. Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. The National Institute for Allergy and Infectious Diseases (NIAID) Mycoses Study Group. *Clinical Infectious Diseases* 30: 14-18.

Karam A., Eveillard J.R., Ianoto J.C., Quinio D., Le Flohic A.M., Le Roy J.P., 2005. Disseminated cutaneous and visceral fusariosis in an aplastic patient: an unusual digestive entry. *Annals Dermatology Venereol* 8: 132:155.

Lacaz C.S., Porto E., Heins-Vaccari E.M. 1998. Guia para identificação: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. São Paulo: Sarvier.

Lacaz C.S., Del negro. 1994. Drogas antifúngicas; terapêutica das micoses. In.SILVA P. Farmacologia. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1156-1190.

Lacaz C.S., Porto E., Martins, J.E.C., Heins-vaccari, E.M., Melo N.T. 2002. Tratado de Micologia Médica. 9 ed. São Paulo. Sarvier.

Leslie J. F., Brett A. S. The Fusarium Laboratory Manual. 2006. First edition. Pages 388.

Luvasghi A.S. 2002. Estudo *in vitro* da atividade de exoenzimas, sensibilidade as toxinas *killer* e morfotipagem de *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal de pacientes HIV+ sob tratamentos com drogas inibidoras de proteases-Tese de Mestrado. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Lundstron T., Sobel J. 2001. Nosocomial candiduria: A review. *Clinical Infectious Diseases* 32: 1602-1607.

Marquina D., Santos E.A., Peinado E.J.M. 2002. Biology of killer yeasts. *International Microbiology* 5: 65-71.

Martino R., Kerguelen A., Valcarcel D. 2011. Reduction of infection related mortality after allogeneic PBSCT from HLA-identical siblings: longitudinal analysis from 1994 to 2008 at a single institution. *Bone Marrow Transplant* 46: 690-701.

Matsumoto F.E., Gandra R.F, Ruiz L.S., Auler M.E., Marques S.A., Pires M.F. 2002. Yeasts isolated from blood and catheter in children from a public hospital of São Paulo, Brazil. *Mycopathologia* 154: 63-9.

Matthay K.K, Perez C, Seeger R.C, Brodeur G.M, Shimada H, Atkinson J.B, Black C.T., Gerbing R., Haase G.M., Stram D.O., Swift P., Lukens J.N. 1998. Successful treatment of stage III neuroblastoma based on prospective biologic staging: a Children's Cancer Group study. *Journal Clinical Oncology* 16 (4): 1256-64.

Melo L.L.S., Lima A.M.C., Damasceno C.A.V.,Vieira A.L.P. 2009. Flora fúngica no ambiente da Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica e Neonatal em hospital terciário. *Revista Paulista de Pediatria* 27: 303-8.

Menezes E.A., Guerra A.C.P., Rodrigues R.C.B., Peixoto M.L.R.V., Lima L.S., Cunha F.A. 2004. Isolamento de *Candida* spp no mamilo de lactentes do Banco de Leite Humano da Universidade Federal do Ceará e Teste de Suscetibilidade a Antifúngico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 40: 299-305.

Menezes E.A., Sá M.K., Cunha F.A., Ângelo M.R.F., Oliveira I. R.N., Salviano M.N.C. 2007. Frequência e percentual de suscetibilidade de bactérias isoladas em pacientes atendidos na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Geral de Fortaleza. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 43: 149-155.

Mondelli A.L., Niéro-Melo L., Bagagli E., Camargo C.H , Bruder-Nascimento A., Sugizaki M.F., Carneiro M.V., Villas Boas P.J.F . 2012. Candidemia in a Brazilian tertiary hospital: microbiological and clinical features over a six-year period. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 18: 244-252.

Montero J.G., Martina A.D., Piapponb M.R.P., Cabrerac E.G. 2012. Infeccion fungica invasiva en los pacientes ingresados en las areas de críticos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 30: 338–343.

Morace G., Archibusacci C., Sestito M., Polonelli L. 1983. Strain differentiation of pathogenic yeasts by the *killer* system. *Mycopathologia* 84: 81-85.

Morgan J. 2005. Global trends in candidemia: review of reports from 1995-2005. *Clinical and Infectious Diseases* 7: 429–439.

Munhoz A. M., Aldrighi C.M.S., Aldrighi J.M. 2006. Emergência e Medicina Intensiva: Novos agentes para infecções fúngicas invasivas em pediatria. *Revista da Associação Médica Brasileira* 52: 1-16.

National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1990–May 1999. 1999. *American Journal of Infection and Control* 27: 520–32.

Nobre M.O., Nascente P.S., Meireles M.C., Ferreira L. 2002. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. *Ciência Rural* 32: 175-184.

Nucci, M. 2000. Candiduria in hospitalized patients: a review. *Brazilian Journal Of Infectious Diseases* 4: 168-172.

Nucci M., Anaissie E. 2007. Infecções por *Fusarium* em pacientes imunocomprometidos. *Microbiologia Clínica* 20: 695-704.

2., Harden H., Com G. 2012. A Survey of Nutrition Practices for Patients With Cystic Fibrosis. *Nutr Clin Pract.*

- Oliveira E.E., Silva S.C., Soares A.J., Attux C., Cruvinel B., Silva M.R.R. 1998. Toxinas *killer* e produção de enzimas por *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com câncer. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 31: 523-527.
- Panackal A.A., Gribskov J.L., Staab J.F., Kirby K.A., Rinaldi M., Marr K.A. 2006. Clinical significance of azole antifungal drug cross-resistance in *Candida glabrata*. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 1740-1743.
- Pappas P.G., Rex J.H., Lee J., Hamill R.J., Larsen R.A., Powderly W., Kauffman C.A., Hyslop N., Mangino J.E., Chapman S., Horowitz H.W., Edwards J.W., Dismukes W.E. 2003. A Prospective Observational Study of Candidemia: Epidemiology, Therapy, and Influences on Mortality in Hospitalized Adult and pediatric Patients. *Clinical Infectious Diseases* 37: 634-43.
- Pasqualotto A.C., De Moraes A.B., Zanini R.R., Severo L.C. 2007. Analises of independent risk factors for death among pediatric patients with candidemia and central venous catheter in place. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 28: 799-804.
- Pasqualotto A.C., Antunes A.G.V., Severo L.C. 2006. *Candida guilliermondii* as the aetiology of candidosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 48(3): 123-127.
- Patel M., Kunz D.F., Trivedi V.M., Jones M.G., Moser S.A., Baddley J.W. 2005. Initial management of candidemia at an academic medical center: evaluation of the IDSA guidelines. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 52: 29-34.
- Paya E., Zubieta M., Dias C., Piontelli E. 2000. Fungemia associada a colonização de cateter venoso permanente por *Fusarium oxysporum* em un paciente pediátrico com cancer. *Rev Chil Inf* 17: 34-38.
- Pederiva M.A. 2010. A colonização por *Pneumocystis jirovecii* em pacientes com fibrose cística *Dissertação de Mestrado*.
- Pemán E., Zaragoza R., Quindós G., Alkorta M., Cuétara M.S., Camarena J.J., Ramírez P., Giménez M.J., Martín- Mazuelos E., Linares-Sicilia M.J., Pontón J. 2011. Clinical factors associated with a *Candida albicans* Germ Tube Antibody positive test in Intensive Care Unit patients. *BMC Infectious Diseases* 11: 1-7.
- Pfaller M. A., Diekema D. J. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews* 20: 133-163.
- Pfaller M.A, Jones R.N, Messer S.A, Edmond M.B, Wenzel R.P. 1998. National surveillance of nosocomial bloodstream infection due to *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 31: 327-332.

Pfaller M.S., Boyken L., Hollis R.J. 2008. In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungi: six years of global surveillance. *Journal clinical of Microbiology* 46: 150-6.

Pincelli T.P.H., Brandt H.R.C., Motta A.L., Maciel F.V.R., Criado P.R. 2008. Fusariose em paciente imunocomprometido: sucesso terapêutico com voriconazol. *Anais Brasileiro de Dermatologia* 83: 331-4.

Polonelli L., Conti S., Gerloni M. 1991. Antibodies: antibiotic-like antiidiotypic antibodies. *Journal of medical and veterinary mycology* 9: 235-242.

Polonelli L., Archibusacci C., Sestito M., Morace G. 1983. *killer* system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. *Journal of clinical Microbiology* 17: 774-80.

Powderly W.G., Saag M.S., Cloud G.A. 1992. A controlled trial of fluconazole or amphotericin B to prevent relapse of cryptococcal meningitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *The New England Journal of Medicine* 326: 793-8.

Reis F.J. C., Damaceno N. 1998. Fibrose cística: Artigo de Revisão. *Jornal de Pediatria* 74: S76-S93.

Rex J.H., Sobel J.D. 2001. Prophylactic antifungal therapy in the intensive care unit. *Clinical Infectious Diseases* 32: 1191-1200.

Rex J.H., Walsh T.J., Sobel J. D. 2000. Practice guidelines for the treatment of candidiasis. *Clinical Infectious Diseases* 30: 662-78.

Ribeiro E.L., Cardoso C.G., Campos C.C., Carvalhaes M.S., Toledo O.A., Pimenta F.C. 2011. Comportamento dos isolados bucais de *Candida albicans* de crianças com Síndrome de Down e pais e/ou responsáveis às toxinas *killer*. *Clipe Odonto* 3: 28-31.

Richardson M.D., Warnock D.W. 1993. Fungal infection-Diagnosis and management. London. Antifungal drugs 3 : 17-43.

Rocha B.A., Del negro G.M.B., Yamamoto L., Souza M.V., Roberto A., Okay T. S. 2008. Identification and differentiation of *Candida* species from pediatric patients by random amplified polymorphic DNA. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41: 1-5.

Roilides E., Farmaki E., Evdoridou J., Dotis J., Hatziionnidis E., Tsivitanidou M. 2004. Neonatal candidiasis: analysis of epidemiology, drug susceptibility, and molecular typing of causative isolates. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 23: 745-750.

- Romano C., Caposciutti P., Ghilardi A., Miracco C., Fimiani M. 2010. A case of primary localized cutaneous infection due to *Fusarium oxysporum*. *Mycopathologia* 170: 39-46.
- Rothe A., Seibold M., Hoppe T.H., Seifert H., Engert A., Caspar C., Karthaus M., Kenheuer G.F., Bethe U., Tintelnot K., Cornely OA. 2004. Combination therapy of disseminated *Fusarium oxysporum* infection with terbinafine and amphotericin B. *Annals of Hematology* 83: 394–397.
- Saiman L., Ludington E., Pfaller M. 2000. Risk factors for candidemia in Neonatal Intensive Care Unit patients. The National Epidemiology of Mycosis Survey Study Group. *The Pediatric Infectious Diseases Journal* 19: 319-24.
- Sande M.A., Mandell G.L. 1987. Drogas antimicrobianas – Drogas antimicóticas e antivirais. As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro: Guanabara 54: 799-807.
- Sarvikivi E., Lyytikäinen O., Soll D.R., Pujol C., Pfaller M.A., Richardson M., Koukila-Kahkola P., Luukkainen P., Saxén H. 2005. Emergence of Fluconazole Resistance in a *Candida parapsilosis* Strain That Caused Infections in a Neonatal Intensive Care Unit. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 2729-2735.
- Scheid L.A., Mario D.A.N., Heins E.M.V., Santurio J.M., Alves S.H. 2010. Differentiation of *Candida dubliniensis* From *Candida albicans* with the use of killer toxin. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 52: 161-162.
- Sekhona A.S., Padhye A.A., Garg A.K., Ahmad H., Moledina N. 1994. In vitro sensitivity of medically significant *Fusarium* species to various antimycotics. *Chemotherapy* 40: 239-44.
- Sidrim J.L.C., Rocha M.F.G. 2004. Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos. Único. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 388.
- Silva G.M. 2006. Adesão, produção de exoenzimas, sensibilidade a toxinas killer e a antifúngicos de cepas de *Candida dubliniensis* isoladas de pacientes HIV positivos. Dissertação. São Paulo.
- Somers J. M., Bevan E.A. 1969. The inheritance of killer character in yeast. *Genetic Researches* 13: 71-73.
- Speelveld E., Gordts B., Van Landuyt H.W., De Vroey C., Raes- Wuytack C. 1996. Susceptibility of clinical isolates of *Fusarium* to antifungal drugs. *Mycoses* 39: 37–40.
- Stamos J.K., Rowley A.H. 1995. Candidemia in a pediatric population. *Clinical Infectious Diseases* 20: 571-5.
- Stevens D.A. 1998. Combination immunotherapy and antifungal chemotherapy. *Clinical Infectious Diseases* 26: 1266-1269.

Thompson M.H., Khot A.S. 1985. Impact of neonatal intensive care. *Archives of Disease in Childhood* 60: 213-4.

Tilford J.M., Simpson P.M., Yeh T.S., Lensing S, Aitken M.E., Green J.W. 2001. Variation in therapy and outcome for pediatric head trauma patients. *Critical Care Medicine* 29: 1056-61.

Trick, W.E., Fridkin, S.K., Edwards, J.R., Hajjeh, R.A., Gaynes, R.P., National Nosocomial Infections Surveillance System Hospitals. 2002. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clinical Infectious Diseases* 35: 627-630.

Valle H.A., Acha O, Palomo G.J.D., Álvarez C.F, Mazarrasa F.C, Farinas M.C. 2003. Candidemia in Tertiary Care Hospital: Epidemiology and Factors Influencing Mortality. *European Clinical Microbiology Infectious Diseases* 22: 254-257.

Vaz F. L., Martins S. C. S., Carvalho A. F. F. U., Melo V. M. M. 2002. Isolamento e caracterização de um toxina *killer* de levedura isolada de cana-de-açúcar. In: VI Reunião Regional da SBBq Nordeste, Fortaleza. CD room VI Reunião Regional da SBBq Nordeste.

Wagener J.S., Headley A.A. 2003. Cystic fibrosis: current trends in respiratory care. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 48: 234-45.

Walsh T. J. 2004. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clinical Microbiology and Infection* 10: p.48-66.

Walsh T.J., Groll A.H. 1999. Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. *Transplant Infectious Disease* 1: 247-261.

Walsh T.J., Kasai M., Francesconi A. 1997. New evidence that *Candida albicans* possesses additional ATP binding cassette MDR-like genes: implications for antifungal azole resistance. *Journal of medical and veterinary mycology* 35: 133-137.

Wang S.S., O'Leary L.A., Fitzsimmons S.C., Khoury M.J. 2002. The impact of early cystic fibrosis on pulmonary function in children. *Jornal de Pediatria* 141: 804-10.

Wenzel R.P., Pfaller M.A. 1991. *Candida* species: emerging hospital bloodstream pathogens. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 12: 523-4.

Wingard J.R. 2005. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as pathogens in oncology patients. *Clinical Infectious Diseases* 20: 115-125.

Wisplinghoff H., Bischoff T., Tallent S.M., Seifert H., Wenzel R.P., Edmond M.B. 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Diseases* 39: 309-317.

Woods D.R., Bevan E.A. 1968. Studies on the nature of the killer factor produced by *saccaromyces cerevisiae*. *Journal Genetic Microbiology* 51: 115-126.

Zeichner L.O., Pappas P.G. 2006. Invasive candidiasis in the intensive care unit. *Journal of Critical Care Medicine* 34: 857-863.