



### 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

Bruna Fernanda Fernandes  
Ferreira<sup>1</sup>

Ligia Junqueira Ragazzini<sup>1</sup>

Marileia Chaves Andrade<sup>2</sup>

*Investigation of Fluconazole Sensibility and Hydrolytic Enzymes Production by Candida sp. Isolated from the Respiratory Tract of Patients Admitted to a Hospital in Southern Minas Gerais*

#### RESUMO

**Objetivo:** Identificar e caracterizar isolados de *Candida* do trato respiratório de pacientes, em relação à sensibilidade ao fluconazol e produção de enzimas hidrolíticas (fosfolipase e proteinase). **Materiais e Métodos:** 52 espécies de amostras do trato respiratório no período de 2001 a 2007 foram identificadas pelo método ChroMagar®. As amostras foram submetidas a teste de provas enzimáticas, para obtenção do grau de virulência e testadas quanto à susceptibilidade ao fluconazol, através do método Etest®. **Resultados:** *Candida albicans* foi a espécie prevalente, enquanto as demais somaram um total de 67,3%. Todas as amostras foram produtoras de proteinase e 88,5% de fosfolipase e a maioria sensível ao fluconazol, com exceção de *C. glabrata* que apresentou relevante resistência. **Conclusão:** Os resultados demonstraram um aumento de isolamento das espécies de *Candida não-albicans* em amostras clínicas, além de uma relevante resistência ao fluconazol por *C. glabrata*.

**Palavras chave:** *Candida* sp; trato respiratório; fluconazol.

#### ABSTRACT

**Objective:** Identification and characterization of *Candida* isolates from respiratory tract of patients in relation to fluconazole sensitivity and production of hydrolytic enzymes (phospholipase and proteinase). **Material and Methods:** 52 species originated from respiratory tract samples in the period 2001 to 2007 were identified by CHROMagar® method. The samples were subjected to enzymatic test to evaluate the virulence degree of strains and tested for susceptibility to fluconazole by Etest® method. **Results:** *Candida albicans* was the prevalent specie, while *Candida non-albicans* amounted to a total of 67.3%. All samples were proteinase producers and 88.5% of phospholipase, and majority were susceptible to fluconazole, highlighting only *C. glabrata* with relevant resistance. **Conclusion:** The results showed an increased isolation of *Candida non-albicans* in clinical samples, and a significant resistance to fluconazole by *C. glabrata*.

**Key words:** *Candida* sp; respiratory tract; fluconazole.

1 – Médica, Graduada pela Faculdade de Medicina de Itajubá (FMIIt) – Itajubá/MG

2 - Bióloga, Doutora em Imunologia pela UFMG, Professora de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Itajubá (FMIIt) – Itajubá/MG

Trabalho desenvolvido na Faculdade de Medicina de Itajubá - FMIIt

#### Correspondência:

Bruna Fernanda Fernandes Ferreira  
Av. Renó Junior, 368. Bairro Medicina.  
CEP: 37502-138  
Itajubá – Minas Gerais  
E-mail: brunafernandesf@hotmail.com

## INTRODUÇÃO

As leveduras do gênero *Candida* vivem em diversos sítios anatômicos no homem, como a pele, mucosas, trato genitourinário e trato intestinal.<sup>1,2</sup> Determinadas espécies, podem se tornar patogênicas frente a alguns fatores, como comprometimento de barreira epitelial e imunodeficiência do hospedeiro, favorecendo a infecção.

Até 1970 as leveduras não estavam entre os agentes etiológicos mais isolados em hospitais, sendo raras as infecções sistêmicas causadas por esses microrganismos. Entretanto, a partir dessa época, vem aumentando a incidência e frequência de infecções hospitalares (IH) por leveduras. Atualmente, as espécies de *Candida*, por exemplo, são a quarta causa de infecções nosocomiais sistêmicas, ocasionando sérios problemas pessoais, como a alta mortalidade, e sócio-econômicos, em função do aumento do tempo de hospitalização, com consequente aumento dos custos com o tratamento do paciente.<sup>3</sup>

A Organização Mundial da Saúde (OMS), em estudo envolvendo 4 continentes, em 47 hospitais de 14 países, revelou que 3% a 21% dos pacientes hospitalizados apresentaram IH. Adicionalmente, os maiores índices de infecções foram observados também na Unidade de Tratamento Intensivo (UTI). No Brasil, as estimativas prevêem que aproximadamente 5% a 15% dos pacientes durante o período de internação contraem algum tipo de infecção hospitalar.<sup>4</sup>

No gênero *Candida*, 10% são mais associadas às infecções no homem, por exemplo, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitanae*, *C. tropicalis*, *C. Guilliermondii*, e a *Candida albicans* é a maior representante, sendo o principal patógeno oportunista.<sup>5-7</sup> Atualmente, as espécies de *Candida* são a quarta causa de infecções nosocomiais sistêmicas. As candidemias estão relacionadas, principalmente com causas endógenas, sendo, portanto, adquiridas pela colonização prévia de locais anatômicos que atuam como reservatórios.

Para impedir a colonização pelo fungo no tecido invadido, há vários mecanismos fungicidas, imunomediados ou não, como por exemplo, a produção ou liberação de oxigênio reativo e peptídeos antimicrobianos; o recrutamento de células efectoras (neutrófilos,

macrófagos e monócitos) para os locais de infecção, através da ação de sinais inflamatórios, além da ação de citocinas, quimiocinas e componentes do sistema complemento.<sup>7,8</sup>

As enzimas proteolíticas estão envolvidas no processo de penetração do patógeno no organismo e a adesão à mucosa é o passo inicial na patogenicidade de infecções causadas por espécies de *Candida*.<sup>9-11</sup>

Atualmente, anfotericina B e fluconazol são as duas drogas mais comumente utilizadas para o tratamento de infecções invasivas por *Candida*.<sup>6</sup> Mas, o uso rotineiro de agentes antifúngicos tem promovido o desenvolvimento de *Candidas* resistentes e aumentado as infecções por *Candida*-não *albicans*. Tem sido documentado que 10% de *C. albicans* isolada de sangue de pacientes hospitalizados foram resistentes ao fluconazol.<sup>12</sup>

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo, avaliar o perfil de susceptibilidade ao fluconazol e investigar a produção de enzimas hidrolíticas por leveduras isoladas do trato respiratório de pacientes internados em qualquer setor do Hospital Escola de uma Faculdade de Medicina do sul de Minas Gerais.

## MATERIAL E MÉTODOS:

As amostras de leveduras utilizadas são provenientes do Banco de Microrganismos do Laboratório de Microbiologia da FMIt, e foram obtidas de pacientes internados em qualquer setor do Hospital Escola desta instituição no período de 2001 a 2007. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMIt, sob o protocolo de número 032/08.

No período de 2001 a 2007 foram analisadas 1.188 amostras do trato respiratório de pacientes internados neste Hospital Escola. Dentre estas, 49 (4,13%) apresentaram-se contaminadas, 499 (42%) crescimento negativo e 384 (32,32%) crescimento significativo. Foram isoladas 331 (83,59%) bactérias e 65 (16,41%) leveduras, sendo três amostras de *Paracoccidiodes brasiliensis* que foram excluídas deste trabalho, e as demais do gênero *Candida*, entre as 384 amostras positivas (com crescimento significativo). Doze amostras apresentaram crescimento misto, ou seja, com mais de um microrganismo isolado, perfazendo

um total de 396 microrganismos. No entanto, foram analisadas neste estudo apenas 52 amostras (número de amostras viáveis no banco de dados).

#### Reavivamento das amostras:

Foram retiradas do freezer 10 amostras por vez e depois de descongeladas à temperatura ambiente foram passadas no *vortex* e repicadas em placas com Ágar Sabouraud com cloranfenicol e incubadas à 37°C por 48 horas. Foi iniciado o processo de identificação das amostras que tiveram crescimento significativo. As amostras que não cresceram significativamente, foram colocadas em caldo BHI e incubadas por 48 horas à 37°C, para assim obter crescimento adequado.

#### Análise Laboratorial:

Para o processo de identificação das amostras, foi preparada uma solução com turbidez igual à 0,5 da escala de McFarland, sendo uma alíquota de 100µL desta suspensão semeada em meio ChroMagar® *Candida* e incubada a 35° C por 48h: A espécie *Candida albicans* apresenta-se esverdeada; *Candida krusei*, rósea; *Candida tropicalis*, azul-acinzentada; e as demais espécies, róseo-esbranquiçadas.<sup>13</sup>

#### Provas Enzimáticas:

Depois de confirmadas a identificação das 52 espécies pelo método ChroMagar, as amostras foram submetidas ao teste de provas enzimáticas, para obtenção do grau de virulência das mesmas:

##### - Teste da Fosfolipase:

Para esse teste foi utilizado o ágar Sabouraud dextrose, suplementado com 1 M NaCl e 5mM CaCl<sub>2</sub> e 8% de emulsão de gema de ovo-telurito. Foi inoculada na superfície deste meio, suspensão de colônias de leveduras contendo aproximadamente 10<sup>5</sup> UFC (unidades formadoras de colônias). Após o inóculo, as placas foram incubadas a 37°C por 3 a 5 dias. Cada levedura foi testada em duplicata. Foram mensurados os diâmetros das colônias (DC) e os da zona de precipitação (DZPC) ao redor das colônias, observado pela formação de um halo opaco ao redor da colônia.<sup>14</sup>

A atividade enzimática foi obtida utilizando-se o valor da zona de precipitação (PZ). Para tanto, as atividades enzimáticas PZ foram medidas dividindo-se o DC pelo DZPC. Os resultados foram apresentados em código (Tabela 1), sendo o valor 1 (PZ=1,0), sem atividade enzimática, valor 2 (0,63 <PZ<1,0), atividade enzimática moderada, e valor 3 (PZ<0,63), forte atividade enzimática.<sup>15</sup>

Tabela 1- Atividade enzimática das leveduras, conforme PZ

PZ	Atividade enzimática	Código
= 1,00	Negativa	1
> 0,64<1,00	Positiva	2
<0,64	Fortemente positiva	3

##### - Teste da proteinase:

Foi realizado em placas de Petri contendo o meio YCB-BSA. Este meio é constituído de 1,5% de ágar bacteriológico, 1,17% de yeast carbon base, 0,2% de BSA (bovine serum albumin), 0,2% de glicose. Na superfície do meio foi inoculada a suspensão de colônias de leveduras, contendo aproximadamente 10<sup>5</sup> UFC e logo após, as

placas foram incubadas a 28°C por 7 dias a 3 semanas. Todas as leveduras foram testadas em duplicata.

Após esse período de incubação as placas foram coradas com azul brilhante a 0,5% (preparado com 10% [v/v] de ácido acético e 45% [v/v] de etanol) por 20 minutos, à temperatura ambiente e descoradas três vezes com solução descorante (10% [v/v] de ácido

acético e 45% [v/v] de etanol) por 20 minutos à 37°C e uma vez com água por 20 minutos, à 37°C. O diâmetro das colônias foi medido antes do uso do corante e o diâmetro da zona clara ao redor das colônias foi mensurado após a coloração.<sup>16</sup>

A presença da atividade da proteinase foi verificada pela formação de um halo transparente ao redor da colônia. A atividade enzimática também é medida utilizando-se do valor da zona de precipitação (PZ). Para tanto, as atividades enzimáticas PZ foram avaliadas dividindo-se o DC por DZPC (diâmetro da colônia somado à zona de precipitação). Os resultados foram apresentados em código sendo o valor 1, 2 e 3 como explicado no item anterior.

#### Teste de Sensibilidade ao Fluconazol:

As 52 espécies provenientes do trato respiratório foram testadas pelo método do E-test® (método com gradiente predefinido de concentração), determinando a concentração inibitória mínima (MIC) em µg/ml para o fluconazol. Este teste foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante (AB Biodisk). O meio utilizado foi o ágar Sabouraud, distribuído em placas de Petri de 90 mm de diâmetro. O inóculo foi ajustado à escala 0,5 de McFarland e distribuído uniformemente sobre a superfície do meio de ágar Sabouraud, com auxílio de “swab” esterilizado. Em seguida, após o excesso de umidade ter sido absorvido na superfície do ágar e esta se mostrar completamente seca, foi depositada a tira de

fluconazol sobre a placa que foi incubada a 35°C, durante 48 horas. As leituras dos halos foram realizadas com 24 horas e, posteriormente com 48 horas para confirmação. O ponto final da concentração do fluconazol foi aquele em que a elipse de inibição foi detectada. A leitura da concentração, segundo os critérios do NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), deve ser classificada como: sensibilidade (halo ≤ 8µg/mL), resistência (halo ≥ 64µg/mL) e susceptibilidade dose-dependente (entre 16 e 32 µg/mL). A *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foi utilizada como cepa controle.<sup>17</sup>

#### RESULTADOS

- *Espécie mais encontrada nas amostras clínicas:*

Foram analisadas 41 amostras e dentre essas, 7 tiveram crescimento misto, ou seja, crescimento de mais de uma levedura na mesma amostra, sendo que 3 amostras tiveram crescimento de 3 espécies diferentes, e as outras 4 amostras tiveram crescimento de 2 espécies diferentes, perfazendo um total de 52 espécies identificadas nas amostras. Como demonstrado na Tabela 2, observou-se através da identificação pelo Chromagar®, que 35 espécies (67,3 %) eram *C. não- albicans* e 17 (32,7%) *C. albicans*. Dentre as *C. não- albicans*, 14 (26,9%) eram *C. tropicalis*, 11 (21,1%) *C. glabrata*, 6 (11,5%) *C. parapsilosis*, 3 (5,8%) *C. guilliermondii* e 1 (2 %) *C. rugosa*.

Tabela 2 - Identificação por metodologia Chromagar® das espécies de *Candida* isoladas do trato respiratório no período de 2001 a 2007.

Espécies de <i>Candida</i> identificadas	Quantidade de cada espécie	%
<i>C. albicans</i>	17	32,7
<i>C. não albicans</i>	35	67,3
- <i>C. parapsilosis</i>	6	11,5
- <i>C. glabrata</i>	11	21,1
- <i>C. guilliermondii</i>	3	5,80
- <i>C. tropicalis</i>	14	26,9
- <i>Candida rugosa</i>	1	2,00

- *Espécie mais prevalente nas amostras de escarro.*

Os materiais oriundos do trato respiratório estavam assim distribuídos: 14 amostras de

secreção do líquido pleural, 27 de escarro, 07 de aspirado traqueal e 04 de secreção de traqueostomia. A Tabela 3 sumariza os achados das espécies de *Candida* por local de

isolamento. Dentre as 17 cepas isoladas de *C. albicans*, pouco mais da metade (58,8%) foram encontradas em escarro, 23,5% no líquido

pleural, 11,8% em aspirado traqueal e 5,9% em secreção de traqueostomia.

Tabela 3 - Distribuição de cepas clínicas de *Candida* de acordo com os locais de isolamento.

Cepas de <i>Candida</i>	Origem do material	Quantidade	%
<i>C. albicans</i> 17	Líquido pleural	4	23,5
	Escarro	10	58,8
	Aspirado traqueal	2	11,8
	Secreção de traqueostomia	1	5,9
<i>C. parapsilosis</i> 6	Líquido pleural	1	16,7
	Escarro	2	33,3
	Aspirado traqueal	2	33,3
	Secreção de traqueostomia	1	16,7
<i>C. tropicalis</i> 14	Líquido pleural	7	50
	Escarro	5	35,7
	Aspirado traqueal	2	14,3
<i>C. glabrata</i> 11	Líquido pleural	1	9
	Escarro	7	63,7
	Aspirado traqueal	1	9
	Secreção de traqueostomia	2	18,2
<i>C. guilliermondii</i> 3	Líquido pleural	1	33,3
	Escarro	2	66,7
<i>C. rugosa</i> 1	Escarro	1	100

Nas amostras de escarro, que foram as mais numerosas, prevaleceu *Candida albicans* (30%), diferentemente das amostras de líquido pleural cuja maior prevalência foi de *Candida tropicalis* (50%). Em aspirado traqueal, *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* foram igualmente prevalentes, estando em menor quantidade *C. glabrata* (14,3%). Nas secreções de traqueostomia prevaleceu em 50% *C. glabrata*.

- Atividade enzimática das amostras de *Candida* avaliadas

Das 52 amostras analisadas, 100% produziram a enzima proteinase e 88,5% (46) produziram a enzima fosfolipase, como demonstrado na Tabela 4.

Dentre as espécies de *Candida* com atividade de fosfolipase positiva, 16 foram *C. albicans*, 03 *C. guilliermondii*, 06 *C. parapsilosis*, 07 *C. glabrata*, 13 *C. tropicalis* e 01 *C. rugosa*.

A classificação das espécies como não produtoras, fortemente produtoras ou moderadamente produtoras dessas enzimas é dada pela variação de PZ, onde  $PZ \leq 0,63$  (forte atividade enzimática),  $0,63 < PZ, 1,0$  (moderada atividade enzimática) e  $PZ = 1,0$  (atividade enzimática ausente). Das amostras que produziram a enzima fosfolipase, conforme demonstrado na Tabela 4, o PZ de cada espécie variou da seguinte maneira: *C. albicans* PZ=0,34-0,50, *C. guilliermondii* PZ=0,33-0,46, *C. parapsilosis* PZ=0,21-0,46, *C. glabrata* PZ=0,40-0,50, *C. tropicalis* PZ=0,36-0,50 e a *C. rugosa* com PZ =0,44. Já a variação de PZ das espécies produtoras de proteinase foi assim identificado: *C. albicans* PZ=0,17-0,42, *C. guilliermondii* PZ=0,28-0,31, *C. parapsilosis* PZ=0,29-0,45, *C. glabrata* PZ=0,18-0,44, *C. tropicalis* PZ=0,31-0,48 e PZ=0,29 pela *C. rugosa*.

Tabela 4 - Produção de enzimas hidrolíticas (fosfolipase e proteinase) por espécies de *Candida*

Espécies	Produção de Fosfolipase		Produção de Proteinase
	Positiva	Negativa	Positiva
	88,5%	11,5%	100%
<i>C. albicans</i>	16 <sup>1</sup> 0,34-0,50 <sup>2</sup>	1 <sup>1</sup> 0,10 <sup>2</sup>	17 <sup>1</sup> 0,17-0,42 <sup>2</sup>
<i>C. guilliermondii</i>	3 <sup>1</sup> 0,33-0,46 <sup>2</sup>	0	3 <sup>1</sup> 0,28-0,31 <sup>2</sup>
<i>C. parapsilosis</i>	6 <sup>1</sup> 0,21-0,46 <sup>2</sup>	0	6 <sup>1</sup> 0,29-0,45 <sup>2</sup>
<i>C. glabrata</i>	7 <sup>1</sup> 0,40-0,50 <sup>2</sup>	4 <sup>1</sup> 0,10 <sup>2</sup>	11 <sup>1</sup> 0,18-0,44 <sup>2</sup>
<i>C. tropicalis</i>	13 <sup>1</sup> 0,36-0,50 <sup>2</sup>	1 <sup>1</sup> 0,10 <sup>2</sup>	14 <sup>1</sup> 0,31-0,48 <sup>2</sup>
<i>C. rugosa</i>	1 <sup>1</sup> 0,44 <sup>2</sup>	0	1 <sup>1</sup> 0,29 <sup>2</sup>

<sup>1</sup>=número de amostras;<sup>2</sup>=menor e maior valor PZ da enzima produzida.

#### - Sensibilidade das espécies de *Candida* isoladas do trato respiratório dos pacientes

Do total das espécies analisadas pelo método Etest®, 73% foram classificadas como sensíveis, 15,5% como dose-dependente e 11,5% como resistentes.

Em relação à *C. albicans*, a sensibilidade foi de 94,1% das amostras testadas, com apenas uma espécie (5,9%) resistente. Ao ser comparada com as demais espécies, foi a mais sensível (30,8%).

*C. parapsilosis* também teve apenas uma espécie resistente (16,7%), 83,3% sensível, representando a terceira espécie mais sensível (9,6%).

A espécie com percentual mais baixo de sensibilidade foi *C. glabrata* com 18,2%, sendo 45,4% dose-dependente e 36,4% resistente, e frente a todas leveduras, foi a principal representante do grupo dose-dependente e resistente.

*C. tropicalis* não teve resistência frente ao fluconazol, sendo a maioria das espécies sensíveis e apenas 02 amostras mostraram sensibilidade dose-dependente.

#### DISCUSSÃO:

A análise do escarro é a primeira etapa diagnóstica de uma série de afecções do trato respiratório, por ser um método não invasivo, de fácil aplicação, simples, econômico e seguro.<sup>18</sup> Portanto, neste trabalho foi o sítio onde se obteve mais amostras, correspondendo a 51,9% do total de amostras estudadas. A preocupação com as leveduras se dá em um momento que o gênero *Candida* emergiu para o sexto patógeno responsável por infecções hospitalares em geral (7,2%) e o quarto mais comum em infecções hospitalares da corrente sanguínea, com destaque à importante substituição de *C. albicans* por outras espécies de *Candida*.<sup>19</sup> Esse aumento tem sido atribuído à capacidade dos fatores virulentos dessa espécie. Já é sabido que *Candida albicans* é o patógeno mais comum nas candidíases cutâneas e de orofaringe, e na maioria das vezes, atuam como patógenos oportunistas, acometendo pacientes imunodeprimidos.<sup>13</sup>

Para o isolamento das espécies de leveduras do gênero *Candida* optou-se pela

utilização do Chromagar Candida®, por tratar-se de método susceptível e específico. *Candida albicans* foi isolada em 32,7% das amostras, e *C. não-albicans* em 67,3%, confirmando o quanto as espécies não-albicans vêm ganhando espaço, e sendo cada vez mais responsáveis por infecções. Colombo e cols., 2002, em uma análise de amostras colhidas de 1998 a 2000 em dois hospitais da cidade São Paulo, oriundas de vários sítios anatômicos, obtiveram 42% de espécies *C. não-albicans*. Os autores destacaram que seu trabalho contrastava com os dados do Estados Unidos e Europa, onde *C. glabrata* é a segunda ou terceira espécie de *Candida* mais isolada de pacientes com infecções invasivas.<sup>20</sup>

As amostras obtidas do trato respiratório são de difícil avaliação e diagnóstico, pois muitas vezes as espécies encontradas são devido contaminação por microrganismos comensais do próprio indivíduo. Drakulovic e cols., 2001, observaram que pacientes internados em UTI, após intubação orotraqueal e em ventilação mecânica, têm em 18% dos casos, colonização na traquéia com microrganismos potencialmente patogênicos de origem comunitária, onde há o predomínio de *S. aureus* e *Candida spp.*<sup>21</sup>

Diversos estudos têm demonstrado que a maioria das cepas são produtoras de proteinases e fosfolipases, reforçando a relevância dessas enzimas como elementos integrantes do mecanismo de virulência fúngica. O presente estudo indicou que 11,5% das amostras foram negativas para a produção de fosfolipase e 88,5% foram positivas, mas apenas 11,5% foram fortemente positivas, enquanto o restante (76%) foram moderadamente positivas. Esses dados se assemelham com os resultados obtidos por Borstt e Fluit, 2003, em amostras do trato respiratório, sendo 87% produtoras de

fosfolipase, com 61% das cepas forte produtoras da enzima.<sup>22</sup>

Quando se trata das espécies não-albicans, *C. tropicalis* mostrou ser a espécie com maior número de resultados positivos e *C. parapsilosis* a espécie com o menor número de isolados positivos para a atividade de fosfolipase.

Os resultados para a *C. glabrata* também são importantes e mostram que esta espécie pode produzir proteinase ácida *in vitro*, que poderia estar relacionados à virulência da espécie. Estes dados são diferentes da maioria dos publicados na literatura, que afirmam que a atividade de proteinase secretada não tem nenhuma função em relação a virulência de *C. glabrata*, e que esta parece não produzir níveis significativos da enzima.<sup>23</sup> Nosso experimento verificou produção de proteinase por essa espécie, sendo 08 cepas fortemente positivas, e apenas 03 moderadamente positivas.

Como o aumento da resistência a drogas antifúngicas é crescente, torna-se cada vez mais importante avaliar os perfis de susceptibilidade atual e tendências emergentes. O método do Etest® foi avaliado e demonstrou ser uma alternativa aceitável aos métodos de referência.<sup>13</sup>

No estudo de Crocco e cols., 2004, utilizando-se o Etest®, a maioria das cepas de *Candida albicans* isoladas das lesões fúngicas superficiais dos pacientes estudados mostrou-se susceptível aos antifúngicos testados. São relatados casos de resistência da *Candida albicans* aos derivados azólicos em pacientes infectados pelo VIH (vírus da imunodeficiência humana) e em pacientes com candidíase invasiva.<sup>13</sup> Em nosso estudo, somente uma amostra de *C. albicans* apresentou resistência ao fluconazol.

Outro estudo documentou que 10% das cepas de *C. albicans* isoladas de sangue de pacientes hospitalizados são resistentes ao fluconazol. E que 48% das infecções da corrente sanguínea por *Candida spp.* foram causadas por espécies não-albicans, que são as mais resistentes ao fluconazol.<sup>11</sup>

Os resultados do presente estudo demonstraram que para *C. albicans* a sensibilidade foi de 94,1% das amostras testadas, com apenas uma espécie (5,9%) resistente. A espécie com percentual mais baixo de sensibilidade foi *C. glabrata* com 18,2%, sendo 45,4% dose-dependente e 36,4% resistente, e frente a todas leveduras, foi a principal representante do grupo dose-dependente e resistente.

Mesmo com a eficácia do fluconazol, este deve ser usado com critério para prevenir resistência dos microrganismos.

## CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram um aumento de isolamento das espécies de *Candida* não-albicans em amostras clínicas, além de uma relevante resistência ao fluconazol por *C. glabrata*.

## AGRADECIMENTOS:

Os autores agradecem a Dra. Raquel Maria Lima Lemes pela contribuição teórico-técnica na realização deste trabalho e a Auxiliar de Laboratório Maria Aparecida de Oliveira pela valorosa contribuição prática.

## REFERENCIAS

1. Emira N, Mejdi S, Dorra K, Amina B, Eulogio V. Comparison of the adhesion ability of *Candida albicans* strains to biotic

and abiotic surfaces. Afr J Biotechnol. 2011 Feb;10(6):977-85.

2. Alonso-Valle H, Acha O, García-Palomo JD, Fariñas-Alvarez C, Fernández-Mazarrasa, Fariñas MC. Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology and factors influencing mortality. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2003;22:254-7.
3. Vidigal PG, Svidzinski TIE. Leveduras nos tratos urinário e respiratório: infecção fúngica ou não? J Bras Patol Med Lab. 2009 fev;45(1):55-64.
4. Machado A, Ferraz AAB, Ferraz E, Arruda E, Nobre J, Konkewicz LR, et al. Prevenção da infecção hospitalar. In: Projeto Diretrizes: Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina; 2001.
5. Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. Lancet Infect Dis. 2003 Nov; 3(11):685-702.
6. Hazen KC, Howell SA. *Candida*, *Cryptococcus*, and other yeasts of medical importance. In: Murray PR (eds.). Manual of clinical microbiology. v.2; 2006. p.1762-88.
7. Shoham S, Levitz SM. The immune response to fungal infections. Br J Haematol. 2005;129:569-82.
8. Calderone RA, Brawn PC. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. Microbiol Rev. 1991;55:1-20.
9. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 2001;9:327-35.
10. Whiteway M, Oberholzer U. *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. Curr Opin Microbiol. 2004;7:350-57.
11. Barenfanger J, Arakere P, Cruz RD, Imran A, Drake C, Lawhorn J, et al. Improved Outcomes Associated with Limiting Identification of *Candida spp.* in Respiratory Secretions. J Clin Microbiol. 2003 dec;41(12):5645-9.
12. Baillie G S, Douglas L J. Iron-limited biofilms of *Candida albicans* and their susceptibility to amphotericin B. Antimicrob Agents Chemother . 42(8):2146-2149. Aug 1998.
13. Crocco EI, Mimica LMJ, Muramatu LH, Garcia C, Souza VM, Ruiz LRB, et al. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica in vitro: estudo de 100 pacientes com candidíases

- superficiais. *An Bras Dermatol.* 2004 nov./dez;79(6):689-97.
14. Borst A, Fluit AC. High levels of hydrolytic enzymes secreted by *Candida albicans* isolates involved in respiratory infections. *J Med Microbiol.* 2003; 52:971-4.
  15. Christensen GD, Simpson A, Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun.* 1982;37:318-26.
  16. National Committee for Clinical Laboratory standards. Publication of M27-P. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard-Second Edition M27-A2 National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, Pennsylvania, USA; 2002.
  17. Silva JO, Ferreira JC, Candido RC. Atividade enzimática, produção de “slime” e sensibilidade a antifúngicos de *Candida* sp. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007 mai./jun;40(3):354-35.
  18. Falqueto L, Silva RM, Bazzo ML, Chagas M. Impacto da orientação na coleta de escarro sobre a qualidade da amostra obtida. *Arq Catarin Med.* 2006;35(3):29-34.
  19. Colombo AL, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003 Sept./Oct.; 36(5):599-607.
  20. Colombo AL, Matta D, Almeida LP, Rosas R. Fluconazole susceptibility of Brazilian *Candida* isolates assessed by a disk diffusion method. *Braz J Infect Dis.* 2002;6(3):118-23.
  21. Drakulovic, MB, Bauer TT, Torres A, Gonzalez J, Rodríguez MJ, Angrill J. Initial Bacterial Colonization in Patients Admitted to a Respiratory Intensive Care Unit: Bacteriological Pattern and Risk Factors. *Int J Thrac Med.* 2001;68:58-66.
  22. Borst A, Fluit AC. High levels of hydrolytic enzymes secreted by *Candida albicans* isolates involved in respiratory Infections. *J Med Microbiol.* 2003;52: 971-4.
  23. D'Eça Júnior A, Silva AF, Rosa FC, Monteiro SG, Figueiredo PMS, Monteiro CA. In vitro differential activity of phospholipases and acid proteinases of clinical isolates of *Candida*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011; 44(3) Epub June 10.

**Correspondência:** Bruna Fernanda Fernandes Ferreira – Av. Renó Junior, 368. Bairro Medicina. CEP: 37502-138 - Itajubá – Minas Gerais - e-mail: brunafernandesf@hotmail.com