

Nadja Rodrigues de Melo

(Cirurgiã-Dentista)

**Caracterização de *Candida* spp. e susceptibilidade a agentes
antifúngicos em isolados orais de pacientes HIV +**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do
grau de Doutor em Biologia e Patologia
Buco-Dental.



**Piracicaba
2002**

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

Nadja Rodrigues de Melo

(Cirurgiã–Dentista)

**Caracterização de *Candida* spp. e susceptibilidade a agentes
antifúngicos em isolados orais de pacientes HIV +**

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CDPG-036/83
CPO. 24 / 07 / 2002
Assinatura do Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do grau de Doutor em Biologia e Patologia Buco–Dental.

Orientador: Jacks Jorge Junior

Banca Examinadora: Prof. Dr. Antônio Olavo Jorge

Profa. Dra. Esther G. Birman

Prof. Dr. Ricardo Della Coletta

Prof.Dr. Oslei Paes de Almeida

Suplentes: Prof. Dr. Oswaldo Di Hipólito

Prof. Dr. Antônio Cortelli

Piracicaba

2002

MADE Pe
HAMADA UNICAMP
M491c
EX
BO BC/ 50276
16-837/02
DZ
BO R\$ 11,00
13/08/02
PD

100171941-4

ID 250720

Ficha Catalográfica

M491c Melo, Nadjia Rodrigues de.
Caracterização de *Candida* spp. e susceptibilidade a agentes antifúngicos em isolados orais de pacientes HIV +. / Nadjia Rodrigues de Melo. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2002.
xiv, 74f. : il.

Orientador : Prof. Dr. Jacks Jorge Junior.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. *Candida albicans*. 2. Agentes anti-infecciosos. 3. HIV. I. Jorge Junior, Jacks. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 14 de Março de 2002, considerou a candidata NADJA RODRIGUES DE MELO aprovada.

1. Prof. Dr. JACKS JORGE JUNIOR

2. Prof. Dr. ANTONIO OLAVO CARDOSO JORGE

3. Profa. Dra. ESTHER GOLDENBERG BIRMAN

4. Prof. Dr. RICARDO DELLA COLETTA

5. Prof. Dr. OSLEI PAES DE ALMEIDA

990655006

"...um discípulo nunca pode imitar os passos de seu guia. Porque cada um tem uma maneira de ver a vida, de conviver com as dificuldades e com as conquistas. Ensinar é mostrar que é possível. Aprender é tornar possível a si mesmo."

Paulo Coelho

Esta tese vai dedicada a você **Antônio Norio Nakagaito,**

Pela amizade incomensurável, na sua mais pura definição
onde emana lealdade, dedicação e reciprocidade presente em
todos os momentos.

Em especial a minha família que permanece intocável.

" Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente aprende."

Guimarães Rosa

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Makoto Miyaji um exemplo de dedicação e amor à ciência, foi um privilégio ter sua orientação na Universidade de Chiba–Japan. Sem seu apoio o desenvolvimento e conclusão desta tese não teriam este desfecho.

Ao Prof. Hideaki Taguchi compartilhar a rotina laboratorial com seus ensinamentos e orientação, com seu extremo bom humor e alegria foi algo muito suave e especial. Sua marcante participação contribuiu para o despertar do senso de pesquisa que tenho hoje.

Meus sinceros agradecimentos a todos os professores, cientistas e funcionários do "*Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University* ", fundamentais para realização desta tese.

Ao Prof. Dr. Jacks Jorge Junior,

Por todo seu empenho na orientação, dedicação inestimável em tornar a rotina do dia-a-dia sempre especial. Sua amizade e serenidade foram essenciais no desenvolvimento e conclusão desta tese. É com imensa alegria e orgulho que conquistamos esta vitória.

Com você aprendi a sempre olhar o que as pessoas têm de melhor.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, na pessoa de seu diretor Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum.

À coordenadora dos cursos de pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP Profa. Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury.

À coordenadora do curso de Biologia e Patologia Buco-Dental da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP Profa. Dra. Darcy Oliveira Tosello.

Ao Prof. Dr. Rogério de Jesus Pedro coordenador da Unidade de Pesquisa Clínica, Departamento de Moléstias Infecciosas–Faculdade de Ciências Médicas UNICAMP por ter permitido minha participação junto ao GPD–UNICAMP durante a fase clínica da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Fausto Bérzin, Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, meu primeiro orientador durante a graduação quando fui bolsista do PET/CAPES.

À Prof. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela pela oportunidade e credibilidade na participação em seu grupo de pesquisa no Centro de Investigação em Pediatria (CIPED/FCM/UNICAMP), laboratório de Imunologia e Imunodeficiência. Agradeço as suas palavras sábias em momentos decisivos.

Ao apoio incomensurável da amiga Vitória, exemplo de profissional responsável, leal e espírito de equipe, do Centro de Investigação em Pediatria (CIPED/FCM/UNICAMP).

À coordenadora do Laboratório de Imunoparasitologia Gastrocentro–UNICAMP Profa. Nancy Nishimura.

Ao Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida, Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP pelo incentivo e compreensão.

Aos bioestatísticos Cleide e Helymar da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP pelo inestimável apoio e exemplo de organização.

Aos companheiros da pós-graduação Rui Barbosa de Brito, Karina Gottardello Zecchin e Hannah Carmem Carlos Ribeiro Silva pela inestimável amizade e apoio durante os momentos difíceis e de alegria.

Aos funcionários do laboratório de Patologia, Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP sempre atenciosos.

Aos colegas da Pós-Graduação pelo entusiasmo e companheirismo.

Aos professores do Departamento de Patologia, Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP pelo apoio e amizade.

A todos os pesquisadores pois através de seus estudos despertam-se tantas outras idéias.

Principalmente aos Pacientes com os quais estou sempre aprendendo seja na vida ou com a pesquisa.

A realização desta tese foi viabilizada pela JICA – *Japan International Cooperation Agency*, através da concessão de bolsa e auxílio-pesquisa.

SUMÁRIO

	Página
1. LISTA DE ILUSTRAÇÕES	01
2. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	02
3. RESUMO	03
4. ABSTRACT	04
5. INTRODUÇÃO	05
6. REVISÃO DE LITERATURA	06
7. PROPOSIÇÃO.....	20
8. MATERIAL E MÉTODOS	21
8.1. GRUPO CONTROLE.....	21
8.2. GRUPO DE PACIENTES INFECTADOS PELO HIV	21
8.3. AMOSTRAS.....	22
8.4. IDENTIFICAÇÃO	23
8.4.1. MEIO CROMOGÊNICO	23
8.4.2. FORMAÇÃO DE TUBO GERMINATIVO	24
8.4.3. PRODUÇÃO DE CLAMIDÓSPORO	24
8.4.4. IMUNODIAGNÓSTICO	24
8.4.5. TESTE DE ASSIMILAÇÃO DE CARBOIDRATOS	25
8.4.6. SISTEMA DE UBIQUINONA	25
8.4.7. SEQÜENCIAMENTO DE DNA	26
8.5. SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA	27
8.6. MONITORAMENTO AUTOMÁTICO DO CRESCIMENTO DE HIFAS	28
8.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
9. RESULTADOS	30
9.1. IDENTIFICAÇÃO	30
9.2. SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA	32
10. DISCUSSÃO	44
11. CONCLUSÕES	56
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
13. ANEXOS	73

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Tabela 1. Características gerais dos pacientes	21
Tabela 2. Coloração das colônias de <i>Candida</i>	23
Tabela 3. Distribuição por espécie das amostras	30
Tabela 4. Ubiquinonas maiores e diferenças de nucleotídeos	31
Tabela 5. Distribuição de espécies de acordo com o estágio CDC	32
Tabela 6. Sumário dos níveis de MIC ($\mu\text{g/ml}$)	33
Tabela 7A. MIC ($\mu\text{g/ml}$) para as concentrações de AMPH	35
Tabela 7B. MIC ($\mu\text{g/ml}$) para as concentrações de FLCZ	36
Tabela 7C. MIC ($\mu\text{g/ml}$) para as concentrações de MCZ	37
Tabela 7D. MIC ($\mu\text{g/ml}$) para as concentrações de ITCZ	38
Tabela 8. Distribuição dos isolados resistentes (R)	40
Tabela 9. Distribuição dos isolados multi-resistentes	41
Gráfico 1. BCT do isolado ATCC em presença de AMPH e Ritonavir	42
Gráfico 2. BCT do isolado 42 em presença de AMPH e Ritonavir	43
Gráfico 3. BCT do isolado 42 em presença de AMPH e Indinavir	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS = Acquired immunodeficient deficiency syndrome
AMPH = Anfotericina B
API 20C® = Kit de identificação por assimilação de carboidratos
AZT® = Zidovudina
BCT® = Bio-cell tracer
CDC = Centers for Disease Control and Prevention
COE = Candidose oro-esofagiana
CTZL = Cetoconazol
DNA = Deoxyribonucleotide acid
DMSO = Dimetil sulfóxido
FLCZ = Fluconazol
g = grama
HAART = Highly active antiretroviral therapy
HIV = Human immunodeficiency virus
HIV+ = Paciente portador do HIV ou apresentando AIDS
ID 32C® = Kit de identificação por assimilação de carboidratos
Média ± DP = Média e Desvio-padrão
MIC = Minimum Inhibitory Concentration
MCZ = Miconazol
mL = mililitro
mm = milímetro
mg = miligrama
NCCLS = National Committee for Clinical Laboratory Standards
pH = Potencial de hidrogênio iônico
QQ = Qui quadrado
R = Resistente ao antifúngico testado
RNA = Ribonucleic acid
S = Sensível ao antifúngico testado
µg = micrograma
µL = microlitro
3TC® = Lamivudine
5FC® = 5-fluorocitosina

RESUMO

Uma das principais infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos é a candidose oral, presente em mais que 90% dos pacientes infectados pelo HIV. Um total de 204 amostras de leveduras provenientes de pacientes infectados pelo HIV (n=173) e controles (n=31) foram identificadas e avaliadas quanto à resistência a antifúngicos. *Candida albicans* correspondeu a 57,8% (n=100) das amostras identificadas e 42,1% foram de outras espécies, sendo 13 *C. krusei*, 9 *C. lusitaniae* e 8 *C. tropicalis*. Também foram isoladas 2 amostras de *C. intermedia* e 1 de *C. norvegensis*. Sensibilidade para anfotericina B (AMPH), fluconazol (FLCZ), miconazol (MCZ) e itraconazol (ITCZ) foi determinada por microdiluição. Do total de amostras, 29 isolados de *C. albicans* e 14 de outras espécies apresentaram baixa susceptibilidade para FLCZ. Dois isolados de *C. tropicalis*, 5 de *C. krusei* e 1 de *C. norvegensis* foram resistentes ao FLCZ. Cinco isolados de *C. tropicalis*, 12 de *C. krusei*, 4 de *C. glabrata*, 2 de *C. intermedia* e 1 de *C. norvegensis* foram resistentes ao ITCZ. Este estudo demonstrou o aumento da diversidade de espécies de *Candida* na cavidade bucal de pacientes infectados pelo HIV, associado à emergência de espécies incomuns de *Candida*, assim como a sensibilidade a agentes antifúngicos destes isolados.

Palavras chave: *Candida albicans*, HIV, Antifúngicos, Resistência a drogas.

ABSTRACT

Oral candidosis is one of the main opportunistic fungal infections amongst immunocompromised individuals, and affects more than 90% of HIV-infected patients. Two hundred and four yeasts isolates from oral cavities of HIV-infected and control patients were identified and tested for antifungal resistance. *C. albicans* corresponded to 57.8% of the isolates while 42.1% were identified as other species, from which 13 were subsequently identified as *C. krusei*, 9 as *C. lusitanae*, and 8 as *C. tropicalis*. There were also 2 isolates of *C. intermedia* and 1 of *C. norvegensis*. Antifungal resistance of the isolates to amphotericin B (AMPH), fluconazole (FLCZ), miconazole (MCZ) and itraconazole (ITCZ) was measured by microdilution. Out of 204 isolates, 29 of *C. albicans* and 14 of other species had low susceptibility to FLCZ. Two isolates of *C. tropicalis*, 5 of *C. krusei*, and 1 *C. norvegensis* were resistant to FLCZ. Five isolates of *C. tropicalis*, 12 of *C. krusei*, 4 of *C. glabrata*, 2 of *C. intermedia*, and 1 of *C. norvegensis* were resistant to ITCZ. This study demonstrated increased diversity of *Candida* species in the oral cavity of HIV-infected patients, associated with the emergence uncommon species, as well as the sensibility of these isolates to antifungal agents.

Key words: *Candida albicans*, HIV, antifungal agents, Drug resistance.

INTRODUÇÃO

Desde a emergência da epidemia de AIDS na década de 80, houve considerável aumento do número de pacientes imunossuprimidos e das manifestações clínicas associadas à mesma. Uma das principais infecções oportunistas em pacientes infectados pelo HIV é a candidose bucal, com prevalência maior que 90% (Korting et al. 1999). Fungos do gênero *Candida* são comuns na cavidade bucal e podem atuar de forma comensal ou patogênica. *Candida albicans* é a espécie mais frequentemente isolada e é responsável pela maioria das candidoses, embora outras espécies também possam ser patogênicas, especialmente em indivíduos infectados pelo HIV. Os antifúngicos azóis têm sido utilizados de forma efetiva no tratamento da candidose de mucosa nas últimas décadas, mas a exposição prolongada a estes antifúngicos pode resultar na colonização da mucosa por espécies de *Candida* menos susceptíveis aos antifúngicos ou no desenvolvimento de resistência entre cepas normalmente susceptíveis (Sobel et al. 2001). Espécies como *C. norvegensis* e *C. inconspicua* têm emergido como patógenos fluconazol-resistente (Sandven et al. 1997; Nho et al. 1997). Com o aumento da frequência de infecções, da proporção de espécies não-*albicans* de *Candida* e da resistência aos antifúngicos (Fidel, Jr. et al. 1999), a identificação acurada dos microrganismos envolvidos tornou-se procedimento de importância clínica ainda maior. O objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade na colonização da cavidade bucal por *Candida* e determinar a sensibilidade a agentes antifúngicos destas amostras.

REVISÃO DE LITERATURA

A candidose oro-esofagiana (COE) é a infecção oportunista mais comum em pessoas infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana - HIV (Lima et al. 1995; Sobel et al. 2001) e a incidência de candidose bucal em pacientes adultos aumenta com a progressão da doença do HIV (Fidel, Jr. et al. 1999). Prevalência de colonização fúngica da ordem de 80% em cavidade bucal tem sido descrita para este grupo de pacientes (Milan et al. 1997; Melo 1999). No período anterior à introdução da terapia antiretroviral altamente ativa (HAART), cerca de 95% dos portadores do HIV apresentavam ao menos um episódio de COE durante a progressão para AIDS (Leigh et al. 2001). Embora a incidência de COE tenha diminuído na era pós-HAART, esta infecção fúngica continua sendo importante problema clínico (Diz et al. 1999). *Candida albicans* é a principal espécie associada a COE, mas estudos recentes têm indicado aumento na participação de outras espécies de *Candida* e mudanças na susceptibilidade antifúngica entre isolados de *Candida* (Favel et al. 1997; Pfaller et al. 1998a; Sobel et al. 2001). COE refratária a tratamento devido a espécies de *Candida* azole-resistente tem sido reportada e é um dos problemas clínicos em pacientes com AIDS (Warnock et al. 1998).

Virulência

Morfogênese é considerada característica essencial na determinação da virulência de amostras de leveduras. Embora a forma de levedura de *Candida* possa estar presente em infecções, hifa é a forma mais invasiva. Alterações na morfogênese podem resultar em produção ou exposição de moléculas da superfície

fúngica que servem como adesinas, ligando-se a diferentes moléculas do hospedeiro (Woods 2001). A capacidade de aderência do fungo é maior na *C.albicans* (Ashman e Papadimitriou 1990) e é favorecida pela presença de taxas elevadas de glicose na saliva (Budtz-Jorgensen 1990). Aderência de *Candida* ao epitélio bucal parece ser o fator isolado de maior importância na determinação da virulência, e é facilitada por xerostomia, carboidratos, adesinas, fibronectinas, tipos específicos de queratina e bactérias (Fotos et al. 1991; Jorge et al. 1993; Calderone e Fonzi 2001). O uso prévio de agentes antifúngicos parece aumentar a capacidade de adesão celular dos leveduras (Pereiro, Jr. et al. 1997). A alta diversidade genética de *C.albicans* também parece estar associada à maior virulência da mesma (Slutsky et al. 1985, Sangeorzan et al. 1994). *C. albicans* pode infectar vários sítios em hospedeiros humanos e há indícios de que a proteção imunológica pode ser diferenciada para alguns destes locais (Calderone e Fonzi 2001).

Virulência de *Candida* e o HIV

Gp160 e gp41 viral ligam-se *in vitro* ao receptor CR3 análogo de complemento de *C. albicans* (Wurzner et al. 1997; Pietrella et al. 1998) e esta interação pode ser, ao menos em parte, responsável pela virulência alterada de *C. albicans* em pacientes infectados pelo HIV (Cantorna e Balish 1991). A ligação com gp160 e/ou gp120 afeta intensamente a viabilidade de *C. albicans*, sua habilidade de gerar hifas e sua atividade de fosfolipase (Heidenreich e Dierich 1985; Vartivarian 1992). Amostras de *C. albicans* isoladas de pacientes infectados pelo HIV apresentam maior produção de proteinase aspartato (Ollert et al. 1995; De Bernardis et al. 1996; Gruber et al. 1998) e a interação com gp160 ou gp41 parece

ser responsável por esta elevação (Wu et al. 1996). Estas interações também parecem desencadear a liberação de produtos inibitórios do crescimento de hifas secretados por *C. albicans* e inibir as funções de células polimorfonucleadas (Wurzner et al. 1997; Pietrella et al. 1998).

Identificação

Classificações de leveduras levam em consideração as variações fenotípicas presentes numa cultura, tais como o formato da colônia. Entretanto, características de crescimento em meio líquido ou sólido, assimilação e fermentação de carboidratos e crescimento em meio de isolamento diferencial são os principais critérios utilizados na classificação das espécies (Baumgartner et al. 2000; Heelan et al. 1996). Mais recentemente, a cor produzida pelas colônias em meios especiais passou a ser usada no processo de identificação (Beighton et al. 1995). A maioria das espécies de *Candida* é dimórfica, mostrando diferenças bioquímicas, estruturais e morfológicas nas diferentes formas (Woods 2001). *C. glabrata* é considerada monomórfica, apresentando apenas a forma de levedura, embora trabalhos recentes indiquem que o dimorfismo pode ocorrer sob condições especiais (Woods 2001). Na maioria das vezes, a cultura das amostras é realizada em ágar Sabouraud dextrose ou extrato de Malte (Beighton et al. 1995). Estes meios geram resultados estáveis, reproduzíveis e permitem a diferenciação de algumas espécies. Entretanto, com frequência as colônias de diferentes espécies apresentam aparência muito similar (Baumgartner et al. 2000) e o subsequente processo de identificação apresenta custos financeiros elevados. A presença de populações mistas de leveduras isoladas de proporção significativa de pacientes

com estomatite por dentadura já foi reportada (Budtz-Jorgensen et al. 1975; Kreher et al. 1991), mas a presença de uma única espécie por indivíduo parece ser mais comum (Cumming et al. 1990).

Assimilação de carboidratos

Durante muito tempo as técnicas auxanográficas para identificação de leveduras incluíram meios sólidos e líquidos, eram de difícil interpretação e demandavam longo tempo de trabalho para obtenção de resultados finais (Mary et al. 1988). O intensivo trabalho laboratorial e conseqüente custo financeiro impulsionaram o desenvolvimento de métodos mais rápidos e padronizados de identificação de leveduras (Freydiere e Odds 2001). O sistema de identificação API 20C® foi o primeiro sistema comercial desenvolvido para tal finalidade e ainda é um dos métodos de referência (Schuffenecker et al. 1993; Baumgartner et al. 1996; Freydiere e Odds 2001), mostrando alta correlação com os métodos convencionais, até 97%, quando usado em conjunto com critérios morfológicos (Land et al. 1979). Outros sistemas comerciais têm sido desenvolvidos e podem identificar fungos entre 4 e 72 horas (Wadlin et al. 1999). ID 32C® (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France) é um sistema de identificação de leveduras baseado na capacidade das amostras de assimilar uma variedade de carboidratos. Combinações de resultados positivos e negativos, fornecidas pela leitura visual direta, resultam em um código, que por sua vez indicará a espécie a partir de uma lista de referência ou de um banco de dados deste sistema (Druetta et al. 1993).

Embora nem todos os sistemas comerciais sejam capazes de identificar

leveduras raras, normalmente são eficientes para as mais comuns (Fenn et al. 1994). Apesar das vantagens associadas aos diversos sistemas comerciais de identificação, certa imprecisão na identificação de amostras pode ocorrer (Kellogg et al. 1999).

Meio Cromogênico

A identificação presuntiva de *Candida* já na cultura primária tem sido buscada desde que se notaram as similaridades fenotípicas entre as espécies desta levedura. Meios cromogênicos são seletivos e causam o crescimento de colônias pigmentadas, sendo certas colorações, específicas para determinadas espécies (Willinger e Manafi 1995; Beighton et al. 1995; Odds e Davidson 2000). Um dos primeiros ensaios a utilizar meio cromogênico foi o teste de redução do sal tetrazolium, reduzido por colônias de *C. tropicalis* que passam a apresentar coloração marrom. Outras espécies, incapazes de reduzir o sal, produzem colorações que variam de levemente rosa a branca (Velegaki e Logotheti 1998). *C. albicans* produz β -N-acetilgalactosaminidase, que é capaz de interagir com substratos cromogênicos e fluorogênicos do meio, permitindo a diferenciação da mesma já no isolamento primário (Perry e Miller 1987). CHROMagar *Candida*® (CHROMagar, Paris, France) e Albicans ID® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) são exemplos comerciais destes meios. Ambos permitem realizar isolamento seletivo primário de leveduras e simultaneamente identificar espécies como *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (Beighton et al. 1995; Pfaller et al. 1996; Odds e Davidson 2000). Os resultados são disponíveis após 24 a 48 horas, mais

rapidamente portanto que nos procedimentos de identificação padrão. O aumento da capacidade de discriminação entre *C. albicans* e outras espécies em amostras de material clínico com populações mistas de leveduras pode ter importantes consequências para os pacientes (Odds 1995; Odds e Bernaerts 1994; Baumgartner et al. 1996). O diagnóstico presuntivo rápido em culturas de leveduras provenientes de orofaringe de pacientes imunocomprometidos é importante na seleção de agentes antifúngicos apropriados (Pfaller et al. 1996). O uso de meios cromogênicos, como o CHROMagar Candida®, dispensa a subcultura adicional prévia para confirmação da viabilidade ou isolamento primário (Pfaller et al. 1996; Odds e Davidson 2000). Apesar destas vantagens, os mesmos são substitutos dos protocolos de identificação padrão (Pfaller et al. 1996).

Ubiquinona

As ubiquinonas (coenzima Q) das leveduras têm sido investigadas como critério na taxonomia das leveduras (Billon-Grand 1987; Montrocher et al. 1989) e parecem ser úteis na identificação de algumas espécies (Fukushima et al. 1991; Fukushima et al. 1993a). Estes estudos são usualmente realizados por meio de cromatografia líquida de alta performance – HPLC (Montrocher et al. 1989; Fukushima et al. 1991; Fukushima et al. 1993a). Cinco tipos de ubiquinona (Q-6, 7, 8, 9 e 10) foram descritas para o gênero *Candida* (Yamada et al. 1977), sendo a Q-9 predominante (Fukushima et al. 1991; Fukushima et al. 1993a), mas ainda são poucos os estudos de ubiquinonas nas espécies menos frequentes de *Candida* (Schauer e Hanschke 1999).

Imunodiagnóstico

Diagnóstico sorológico de candidose pode ser obtido através de reação antígeno-anticorpo, como no teste de anticorpo de fluorescência indireta (Poulain et al. 1983). Outro sistema empregado na identificação de amostras de leveduras é o imunodiagnóstico (Borg et al. 1988). O sistema Candida Check® (Iatron Inc., Tokyo, Japan) tem sido usado como auxiliar na identificação de 9 espécies de *Candida* mais importantes do ponto de vista médico e na caracterização dos sorotipos A e B de *C. albicans* (Tsuchiya e Tsuchiya 1980). Este sistema consiste de 10 anticorpos monoespecíficos que atuam pela reação de aglutinação direta. Já foi reportada diferença nas características de adesão e invasão tecidual entre os dois sorotipos de *Candida albicans*, sendo o sorotipo A mais virulento (Borg et al. 1988). Os sorotipos B parecem apresentar pouca ou nenhuma expressão de *Candida* protease e menor potencial de adesão e invasão do epitélio da mucosa (Poulain et al. 1983; Borg et al. 1988). Parece haver maior prevalência de *C. albicans* sorotipo B em amostras provenientes da cavidade bucal de homossexuais masculinos (Torssander et al. 1996).

Caracterização molecular

Espécies de *Candida* têm sido classicamente identificadas com base nas reações bioquímicas e características morfológicas. Contudo, parâmetros fenotípicos tais como assimilação de substratos, composição da parede celular e produção de enzimas proteolíticas extracelulares, podem variar entre isolados de uma mesma espécie de *Candida*. Identificação de fungos com características

morfológicas e fenotípicas em comum ou variáveis tem sido realizada por meio da caracterização genética (Nho et al. 1997). A análise molecular tem revelado algumas surpresas. Até recentemente, o *Pneumocystis carinii* era considerado um protozoário, mas o seqüenciamento genético revelou que o mesmo está melhor classificado entre os fungos (Sullivan et al. 1995). A obtenção de dados genéticos para a identificação acurada das espécies e análise filogenética tem sido realizada a partir de grande variedade de metodologias; dentre elas o seqüenciamento de DNA mitocondrial, DNA fingerprinting, análise de polimorfismo de DNA amplificado randomicamente (RAPD), análise de cariótipo, seqüenciamento de DNA e de rRNA (Sullivan et al. 1995; Coleman et al. 1997; Yokoyama et al. 2000). Análise molecular também tem sido aplicada nos estudos dos mecanismos de resistência antifúngica aos azoles de amostras de *Candida albicans* (Lamb et al. 1997; Kelly et al. 1997).

Diversidade de espécies

Mudanças na diversidade de espécies de *Candida* na cavidade bucal em pacientes infectados pelo HIV tem sido descrita recentemente (Hazen 1995; Sullivan et al. 1996; Pfaller et al. 1998c). Esta mudança tem sido associada ao uso de agentes antiretrovirais (Hoegl et al. 1998a; Hoegl et al. 1998b; Korting et al. 1999; Cassone et al. 1999) antibióticos (Nguyen et al. 1996a; Nho et al. 1997; Pfaller et al. 1997; Pfaller et al. 1998c) e antifúngicos (Greenspan 1994; Nguyen et al. 1996a; Nho et al. 1997; Pfaller et al. 1998d; Fidel, Jr. et al. 1999). Outros estudos não observaram tal aumento na variedade de espécies de *Candida* (Hauman et al. 1993; Sobel et al. 2001). Alguns estudos alta prevalência de *C. albicans*, mais que 80% do total de amostras (Franker et al. 1990; Fotos e Hellstein 1992). Apesar desta

controvérsia, estes últimos estudos avaliaram apenas pacientes que não estavam sob terapêutica antiretroviral com inibidor de protease. Além das modificações na composição da microbiota associadas ao uso dos antiretrovirais.

Embora existam mais de 150 espécies do gênero *Candida* isoladas e identificadas (Barnett e Lichtenthaler 2001), a espécie predominantemente associada à infecção patogênica no ser humano é a *C.albicans* (Coleman et al. 1997). O mesmo tem sido demonstrado em pacientes infectados pelo HIV (Greenspan 1994). Mais que 80% dos indivíduos imunocompetentes pode apresentar *C. albicans* na orofaringe, trato gastrointestinal e vagina, ainda que em ausência de doença (Sobel et al. 2001). Teoricamente, todo indivíduo é colonizado por *Candida* em algum momento da vida (Sobel et al. 2001). A maioria das amostras não-*albicans* é composta por *C. glabrata* e *C.tropicalis* (Sobel et al. 2001). Outras espécies patogênicas para os seres humanos são a *C.parapsilosis*, *C.krusei*, *C.guilliermondii* e, mais recentemente, *C.dubliniensis* (Sano et al. 2000). Em pacientes com AIDS, a frequência de infecções causadas por espécies não-*albicans* varia entre 14% e 35%, e as espécies mais frequentemente citadas são a *C.krusei*, *C.glabrata*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis* e *C.lusitaniae* (Powderly et al. 1993; Pfaller 1996; Nguyen et al. 1996a; Rodero et al. 1997; Milan et al. 1997; Sobel et al. 2000). Outros estudos têm reportado resultados similares; (Hazen 1995; Nguyen et al. 1996a; Sullivan and Coleman 1997; Pfaller et al. 1998a; Pfaller et al. 1998b; Colombo et al. 1999). A frequência com que espécies não-*albicans* causam doença parece ter aumentado nos últimos anos. Amostras não-*albicans* representavam 3,4% do total de isolados orofaríngeos de pacientes infectados pelo

HIV no fim dos anos oitenta e passaram a 16,8% nos anos noventa (Barchiesi et al. 1993). Em raras ocasiões, *Rhodotorula* spp. pode causar septicemia e meningite, em geral como complicação relacionada ao uso de cateter intravascular (Anaissie e Bodey 1989; Anaissie et al. 1994) e associadas à imunossupressão de pacientes com câncer ou AIDS (Gyaurgieva et al. 1996; Samonis et al. 2001), recém-nascidos e idosos (El-Tahawy e Ragga 1999).

A resistência a drogas antifúngicas parece estar relacionada à espécie de *Candida* presente (Greenspan 1994) e espécies não-*albicans* apresentam maior percentual de cepas resistentes a antifúngicos que amostras de *C. albicans* (Pfaller et al. 1998c). Talvez por este motivo, espécies menos prevalentes têm sido associadas a casos de recorrência de doença (Willinger et al. 2000). É mais provável que as mesmas cepas de *C. albicans* sejam mantidas ao longo do tempo e progressivamente tomem-se menos sensíveis ao FLCZ (Dronda et al. 1996), mas a aquisição de novas cepas em associação com baixas contagens de linfócitos e profilaxia com FLCZ também já foi reportada (Powderly et al. 1993). O uso freqüente de antifúngicos tem gerado pressão seletiva e está associado à maior prevalência de colonização e infecção por espécies não-*albicans*, sobretudo *C. krusei* e *C. glabrata*; (Millon et al. 1994; Chavanet et al. 1994; Fidel, Jr. et al. 1999). *C. glabrata* pode adquirir rapidamente resistência ao FCZL (Warnock et al. 1998; Fidel, Jr. et al. 1999; Rex et al. 1995; Stevens e Stevens 1996) e *C. krusei* parece ter resistência inerente ao FCZL, sendo freqüentemente associada a infecções com alta taxa de mortalidade (Nguyen et al. 1996a; Ghannoum e Rice 1999). Resistência a AMPH é rara para a maioria das espécies de *Candida*, mas parece ser mais comum entre

isolados de *C. lusitanae* (Vanden Bossche et al. 1998, Ghannoum e Rice 1999). *C. parapsilosis* é responsável por grande número de casos de infecção hospitalar no Brasil (Levin et al. 1998) e parece ter capacidade aumentada de sobreviver em ambiente hospitalar, fato que aumenta a chance de transmissão nosocomial (Pfaller et al. 1998b).

Antifúngicos

A maior variabilidade das espécies de *Candida*, associada ao aumento da frequência de cepas resistentes aos agentes antifúngicos, assumiu destaque como problema clínico (Pfaller et al. 1998b). A identificação precisa e rápida de amostras clínicas, com técnicas laboratoriais simples e de custo aceitável na rotina de microbiologia clínica, permitindo assim a adaptação da terapêutica antifúngica, tornou-se ainda mais importante (Ghannoum e Rice 1999; Sobel et al. 2000). Entre 1950 e 1970, a taxa anual de mortes por candidose ficou estável, mas tem aumentado desde então em associação com as várias mudanças na clínica médica, incluindo o uso difundido de terapias imunossupressoras, uso indiscriminado de agentes antibacterianos de largo espectro e o advento da AIDS (Ghannoum e Rice 1999).

Uma das primeiras quimioterapias antifúngicas bem sucedidas foi descrita em 1903, com o uso do iodo potássico no tratamento da esporotricose e pouco mudou até que o primeiro poliene, a nistatina, foi introduzido em 1951 (Al-Mohsen e Hughes 1998). Os polienes, principalmente a anfotericina B, foram a terapêutica padrão para infecções fúngicas até a descoberta dos azoles nos anos sessenta (Ghannoum e Rice 1999). A resistência de *Candida* aos polienes está restrita às

espécies menos comuns (Martins e Rex 1996) e pode ocorrer por seleção natural (Fryberg et al. 1974) ou por mutação (Athar e Winner 1971).

As principais publicações sobre propriedades antifúngicas dos imidazoles são do final dos anos sessenta (Holt 1980). Os imidazoles, e depois os derivados triazoles, provaram ser importantes drogas no combate as infecções fúngicas. O miconazol (MCZ) tem sido o antifúngico de eleição para tratamento de candidose durante muitos anos, o que pode estar associado ao aparecimento de cepas resistentes (Metzger e Hofmann 1997; Ghannoum e Rice 1999; Costa et al. 1999; Costa et al. 2000). O fluconazol tem sido utilizado em larga escala pela eficácia clínica e segurança (Ghannoum e Rice 1999). Amostras resistentes aos azoles exibem modificação da qualidade ou quantidade das enzimas envolvidas na biossíntese do ergosterol e há evidências da associação entre qualidade e quantidade de 14- α demetilase com a expressão de resistência ao azole (Orozco et al. 1998; Ghannoum e Rice 1999). Estudo em cepas isoladas da cavidade bucal de pacientes portadores do HIV no Brasil, mostrou 18,6% de resistência para FLCZ e 20,4% para CTZL (Silva et al. 1999). Outro estudo mostrou níveis de resistência dose/dependente de 16% das amostras para ITCZ, 13% para CTZL e 10% para FLCZ (Milan et al. 1998).

Proteases como antifúngicos

A incidência de infecções por fungos em pacientes infectados pelo HIV tem diminuído após a introdução dos inibidores de protease do HIV (Cassone et al. 1997). Estudos *in vitro* sugerem que inibidores de protease do HIV podem mostrar

atividade inibitória para *Pneumocystis carinii* (Atzori et al. 2001), *Candida albicans* (Cassone et al. 1999) e *Toxoplasma gondii* (Derouin e Santillana-Hayat 2000). Estudos em animais também indicam redução da virulência em candidose experimental após terapêutica com inibidores de protease (Korting et al. 1999). A protease do HIV é da mesma classe da protease aspartato de *Candida*, que é um importante fator de virulência da mesma (Korting et al. 1999; Hoegl et al. 1999). A alteração na produção de protease de *Candida* também foi associada à ligação das proteínas do envelope do HIV a superfície da célula fúngica (Gruber et al. 1998). *Candida* protease tem importante participação nas etapas iniciais da invasão fúngica e na degradação da superfície epitelial (Borg e Ruchel 1988; Ray e Payne 1988).

Avaliação da atividade antifúngica

Em 1928, Fleming descobriu que o fungo *Penicillium notatum* secretava substância com ação inibitória sobre estafilococos em uma placa de cultura. Este foi o primórdio das provas de sensibilidade a antimicrobianos por difusão em meio sólido, método ainda utilizado. A diluição em caldo foi o primeiro procedimento desenvolvido especificamente para avaliar a atividade *in vitro* dos antimicrobianos, sendo ainda hoje o método de referência (Tudela et al. 2000). Consiste de uma série de diluições do fármaco em caldo de cultivo e a posterior inoculação do microorganismo, incubados em temperatura pré-estabelecida. É determinada então a concentração do antimicrobiano que inibe o crescimento (NCCLS 1997). Outro sistema utiliza reservatórios com concentração conhecida e constante do antimicrobiano e colocados na placa de cultivo. A susceptibilidade do microorganismo é determinada

pelo aparecimento de zona de inibição de crescimento ao redor do reservatório usado. Destes, o mais utilizado é o disco de papel impregnado com o fármaco em concentração conhecida (Sandven 1999; Odland et al. 2000; Cuenca-Estrella et al. 2001). Mais recentemente, foi lançado o sistema comercial Etest® (Pfaller et al. 2001a; Chryssanthou 2001), que consiste em tiras de papel contendo concentrações pré-estabelecidas do agente antifúngico. O MIC é determinado pela intersecção da hipérbole inibitória formada na placa de cultura com a fita do antimicrobiano (Ishigaki et al. 2000; Pfaller et al. 2001b). A avaliação quantitativa do efeito antifúngico de um medicamento pode ser realizada por técnicas espectrofotométricas, onde a turbidez está relacionada com a população de microrganismos presente no meio (Odds et al. 1985; Odds 1991). O sistema Bio-Cell Tracer® (BCT, Cia. Hidan, Ltd, Chiba Japan) realiza análise dinâmica do crescimento celular e permite rápida avaliação quantitativa da atividade antifúngica (Taguchi et al. 1995; Oh et al. 1998; Ansheng et al. 1999; Iida et al. 1999a; Iida et al. 1999b). Consiste de placa de cultura, microscópio e analisador de imagem com programa de computador que localiza a ponta da hifa automaticamente e monitora o crescimento com precisão de 0,01 mm/min. O sistema pode monitorar pontas de hifas crescendo a velocidades entre 0,5 e 20 mm/min e a cabine pode ser regulada para temperaturas entre 10 e 50°C (Taguchi et al. 1995; Ansheng et al. 1999). A aplicação clínica deste procedimento tem sido limitada até o presente pelo elevado custo operacional.

PROPOSIÇÃO

1. Avaliar a diversidade na colonização por *Candida* da cavidade bucal em pacientes infectados pelo HIV.
2. Determinar a sensibilidade aos agentes antifúngicos de amostras isoladas a partir da cavidade bucal de pacientes infectados pelo HIV.

MATERIAL E MÉTODOS

Grupo controle

Pacientes que não apresentavam lesões bucais, nem estavam sob terapêutica medicamentosa, foram selecionados como controle. As características clínicas e laboratoriais disponíveis indicavam que estes pacientes não eram portadores do HIV, ainda que não tenham sido testados para a presença deste vírus. Todos os pacientes eram da região de Campinas e estavam sob tratamento dentário na UNICAMP. Do total de 30 controles, 17 eram do gênero masculino e 13 do gênero feminino. A média de idade foi de $47,7 \pm 9,5$ anos, variando de 20 a 70 anos; 20 eram leucodermas, 5 melanodermas e 5 feodermas (Tabela 1).

Grupo de pacientes infectados pelo HIV

Amostras de *Candida* deste grupo foram obtidas de pacientes infectados pelo HIV provenientes do Grupo de Pesquisa em Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS – UNICAMP, em Campinas. A presente pesquisa utilizou pacientes que já faziam parte de um protocolo de pesquisa multicêntrico randomizado. Todos estavam sob terapêutica antiretroviral que incluía Zidovudina (AZT), Lamivudine (3TC), Indinavir e eventualmente outros antiretrovirais (Didanosine, Zalcitabine, Stavudine, Ritonavir e Saquinavir). Nem todos os pacientes daquele protocolo participaram da presente pesquisa. No total, foram investigados 114 pacientes, 74 do gênero masculino e 40 do feminino, com média de idade de $35,2 \pm 8,2$ anos variando de 20 a 70 anos. A maioria foi composta por

X ~~de idade de $35,2 \pm 8,2$ anos variando de 20 a 70 anos. A maioria foi composta por~~
leucodermas (95), sendo 9 melanodermas e 10 feodermas. O estadiamento da infecção pelo HIV seguiu os critérios definidos pelo CDC em 1993 (CDC 1993), como exposto no Anexo (página 72). A maioria dos pacientes foi classificada no grupo C3 (41,2%), seguido pelo grupo B2 (32,4%), B3 (18,4%) e A2 (7,8%) como pode ser visto na Tabela 1.

Amostras

As amostras de saliva foram semeadas em Agar-Sabouraud-dextrose (Sigma, USA) com 1% de cloranfenicol (INC, Japan), em placas duplicatas e incubadas à 37°C por 48 horas. Colônias do cultivo primário de cada amostra de saliva foram isoladas e estocadas em água destilada estéril e/ou tubos com agar-Sabouraud-dextrose para posterior identificação e teste de susceptibilidade antifúngica. A seleção de colônias para posterior identificação baseou-se no aspecto morfológico sendo, no mínimo, 2. No total foram isoladas 352 amostras de leveduras de pacientes infectados pelo HIV (média de 3 amostras por paciente). As amostras foram submetidas às etapas de identificação convencional e classificadas de acordo com a espécie. Para cada paciente foi selecionada apenas uma amostra de cada espécie identificada, bem como as que apresentaram identificação duvidosa (*Candida* spp.). Amostras repetidas de uma mesma espécie foram descartadas. Restaram 173 amostras, que foram utilizadas nesse estudo. Do grupo controle foram obtidas 50 amostras, que foram submetidas ao mesmo processo e resultaram em 31 isolados (média de 1,0 amostra por paciente).

Tabela 1. Distribuição dos 114 pacientes infectados pelo HIV e 30 controles de acordo com as características gerais.

	HIV	Controle
Gênero (masculino / feminino)	74 / 40	17 / 13
Idade em anos (média $\pm$ desvio-padrão)	35,2 $\pm$ 8,2	47,7 $\pm$ 9,5
Cor da Pele (leucoderma/ melanoderma/ feoderma)	95 / 9 / 10	20 / 5 / 5
Classificação do CDC* (A2 / B2 / B3 / C3)	47 / 37 / 20 / 10	-

*Classificação segundo estágio da infecção pelo HIV de acordo com o CDC (CDC 1993).

Identificação

Meio cromogênico

O meio cromogênico (CHROMagar[®], France) foi preparado segundo as orientações do fabricante e distribuído em placas de Petri descartáveis estocadas à temperatura de 4°C e protegidas de luz (Willinger e Manafi 1999; Odds e Davidson 2000). Os isolados (n=204) foram cultivados em placas duplicatas e incubados por 48 horas à 30°C. As colônias foram classificadas de acordo com a coloração (Tabela 2).

Tabela 2. Coloração das colônias de *Candida* de acordo com as espécies*

Espécies	Coloração da Colônia
<i>C. albicans</i>	verde
<i>C. dubliniensis</i>	verde escuro
<i>C. stellatoidea</i>	azul esverdeado
<i>C. tropicalis</i>	azul com halo púrpura
<i>C. krusei</i>	rosa e rugosa
<i>C. glabrata</i>	rosa
outras espécies	branco ou rosa

* Como preconizado por Willinger e Manafi (Willinger e Manafi 1999).

Formação de tubo germinativo

Uma alçada de levedura, cultura pura de 24 horas (204 amostras), foi adicionada ao tubo de centrifugação contendo 0,5 ml soro de carneiro estéril (Sigma, USA) e incubada em estufa à 37°C por cerca de 3 horas. Para visualização do tubo germinativo, 19 µl da suspensão foram colocados entre lâmina e lamínula de vidro e observados à microscopia de luz (Sandven 1990).

Produção de clamidósporo/clamidioconídio

Foi utilizado o meio ágar-fubá - tween 80 (Difco, USA) pH 5,6, distribuído em placas de petri descartáveis e estocadas à temperatura de 4°C (Sandven 1990). O ágar-fubá foi recortado em quadrados de 18 mm de lado colocados sobre lâminas histológicas sendo cada amostra (n=204) semeada em um único ponto sobre a superfície do meio e coberta por lamínula. Algodão esterilizado embebido em soro fisiológico foi utilizado para manter a umidade do meio. O material foi incubado por 5 dias em temperatura ambiente e observado em microscopia de luz para detecção da presença de clamidósporos, pseudohifas e blastoconídias.

Imunodiagnóstico

As amostras (n=204) foram submetidas ao imunodiagnóstico utilizando-se o sistema *Candida Check*® (latron laboratories, Japan). Um ml de suspensão com cerca de 3×10^3 células em solução fisiológica foi preparada a partir de colônias cultivadas à 30°C por 24 horas em ágar dextrose-batata. Uma gota de cada reagente e 30 µl da suspensão de células fúngicas foram distribuídas nos respectivos poços da placa, seguindo-se homogeneização por cerca de 10 minutos

à temperatura ambiente. Foi realizada a leitura visual direta dos resultados, sendo o teste considerado positivo quando da presença da reação de aglutinação (Taguchi et al. 1979; Coleman et al. 1993).

Teste de assimilação de carboidratos

Os testes de assimilação de carboidratos foram realizados com o auxílio do sistema ID 32C® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). As amostras (n=204) foram cultivadas por 24 horas em agar-dextrose-batata à 30°C e 1 ml de suspensão com 3×10^4 células em solução fisiológica foi preparado. A seguir, 250 µl desta suspensão foram diluídos em 7 ml de meio de cultura específico fornecido pelo fabricante e 135 µl desta última suspensão foram acrescentados em cada poço da placa. As placas foram incubadas à 30°C e avaliadas após 24 e 48 horas (Schuffenecker et al. 1993; Freydiere e Odds 2001). Foram considerados positivos os poços que apresentaram alteração de turbidez.

Avaliação das ubiquinonas

Isolados que não apresentaram índices de confiabilidade elevados no teste de assimilação de carboidratos (n=16), foram avaliados quanto ao tipo de ubiquinona presente. Nem todos os isolados não identificados pelos testes anteriores foram avaliados quanto ao tipo de ubiquinona presente. Isolados com padrões fortemente atípicos de assimilação de carboidratos foram considerados não elegíveis para este teste. A avaliação das ubiquinonas foi utilizada como recurso para confirmação dos testes convencionais e não como meio de identificação de casos difíceis. Os isolados foram pré-cultivados sob agitação em

200 ml de caldo dextrose-batata (PDA, Difco, USA) por 48 horas à 30°C. Ubiquinonas foram extraídas através do n-hexano após saponificação à 90°C, sob a presença de pirogólol, metanol e hidróxido de sódio por 25 minutos e purificadas por cromatografia de camada fina de sílica gel usando benzeno como solvente. Foram em seguida identificadas por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) com a associação de sistema de solventes metanol, isopropanol e butanol na proporção de 8:3:3 (Billon-Grand 1985; Billon-Grand 1987; Montrocher et al. 1989; Fukushima et al. 1991; Fukushima et al. 1993a).

Seqüenciamento de DNA

A extração de DNA foi executada com o sistema GenTLE® (Takara Shuzo Cia. Ltd, Japan) como descrito previamente (Fukushima et al. 1993b). O domínio divergente da extremidade 5' do gene (LSU rDNA) foi amplificado com os primers NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG). A amplificação foi realizada durante 30 ciclos de PCR, com anelamento à 52°C, extensão à 72°C por 2 min e denaturação à 94°C por 1 min (Kurtzman e Robnett 1997). O DNA amplificado foi purificado com o sistema SUPRE®-2 (Takara Shuzo Cia. Ltd, Japan) como previamente descrito (Fukushima et al. 1993b) e os amplicons seqüenciados diretamente com o sistema *Thermo Sequenase II Dye terminator cycle* (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) e o seqüenciador ABL PRISM® 377 (Fukushima et al. 1993b). Para a reação completa de seqüenciamento, foram utilizados os primers NL-2 (5'-CTTGTTTCGCTATCGGTCTC) e NL-3 (5'-GAGACCGATAGCGAACAAG), além dos já citados NL-1 e NL-4. Os dados de seqüenciamento de nucleotídeos foram

analisados por meio do software GENETYX-MAC 9.0 (Software Development, Tokyo, Japan) como descrito anteriormente (Fukushima et al. 1993b). A determinação das diferenças de nucleotídeos foi baseada na sequência genética de microrganismos depositada no GenBank.

Susceptibilidade antifúngica

O teste de susceptibilidade para agentes antifúngicos (204 amostras) foi realizado através do método de microdiluição seguindo as recomendações do protocolo M-27A (NCCLS 1997). Incluiu anfotericina B (AMPH) (Bristol-Myers Squibb, UK) em concentrações de 0,03 a 16 µg/ml, fluconazol (FLCZ) (Pfizer pharm. Inc. Japan) em concentrações de 0,125 a 64 µg/ml, miconazol (MCZ) (Mochida Pharm. Inc. Japan) em concentrações de 0,06 a 32 µg/ml e itraconazol (ITCZ) (Janssen-Kyowa Co., Ltda, Japan) em concentrações de 0,015 a 8 µg/ml. O meio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., Sta. Louis, Mo., USA) foi dissolvido em água destilada, tamponado com ácido morfolinopropano sulfônico (MOPS; Sigma Chemical Co., USA) e o pH foi ajustado para 7,0 com a solução 1N de NaOH. A solução foi autoclavada e estocada à 4°C. Soluções de estoque com concentração de 12,8 mg/ml dos antifúngicos foram preparadas com dimetil sulfoxido (DMSO) como solvente e foram diluídas em séries de 10 concentrações em meio RPMI-1640 previamente ao uso. Meio similar ao anterior, mas sem o antifúngico, foi utilizado nos poços de controle positivo (meio sem antifúngico adicionado de suspensão de *Candida*) e no poço de controle negativo ou branco (meio puro, sem antifúngico e sem suspensão de *Candida*). Cada teste foi realizado em triplicata utilizando-se

placas de 96 poços em U estéreis e descartáveis. Culturas novas de 24h à 30°C em meio ágar dextrose-batata foram usadas na preparação de suspensões de *Candida* em meio RPMI-1640 e o inóculo foi ajustado para concentração final de 0,5 a 3,0 x 10³ cel/ml. As placas de microdiluição foram incubadas a 30°C e a leitura dos resultados foi realizada após 24h e 48h com auxílio de espelho de leitura, considerando-se a ausência ou presença de crescimento visível. MIC foi definida como concentração mínima para o qual havia 80% de inibição do crescimento em comparação ao controle livre de droga. *Candida albicans* ATCC 90028 e ATCC 90029 foram incluídas em cada lote de testes de microdiluição como controle de qualidade. Os pontos de corte para definição de isolados resistentes foram os seguintes: AMPH > 2µg/ml; FLCZ ≥ 32µg/ml; ITCZ ≥ 2µg/ml; MCZ ≥ 2µg/ml.

Monitoramento automático do crescimento de hifas

Duas amostras foram selecionadas para testar o sistema de monitoramento automático do crescimento de hifas Bio-cell tracer® (BCT, Cia. Hidan, Ltd, Chiba Japan). Não houve intenção de testar sistematicamente as amostras deste estudo com o sistema BCT. *C. albicans* ATCC 90028 e um isolado clínico (amostra 42, *C. albicans*) foram cultivados e incubados sob agitação moderada e constante à 30°C por 24h em 200 ml de meio RPMI-1640 (Nissui Pharmaceutical Co., Japan) preparado como descrito anteriormente. As leveduras foram lavadas 3 vezes com solução salina estéril por centrifugação e inoculadas em placas de cultura (35 x 10 mm, Nunc, Denmark) após ajuste da concentração para cerca 1x10⁶ cells/ml usando o hematocítômetro. A superfície interna das placas de cultura foi

previamente coberta com solução 0,01% (p/v) de poli-L-lisina (Sigma, USA) para permitir a adesão das células de levedura. Um ml de suspensão de células foi incubado em cada placa de cultura por 1 hora em temperatura ambiente. Células não aderidas foram removidas por pipetagem do meio, que foi substituído por 1 ml de RPMI-1640, suplementado com 5% soro de bezerro (Sigma, USA). A placa padronizada de cultivo foi fixada ao microscópio, sob temperatura constante de 35°C, até que 90% das hifas houvessem crescido. Hifas em posição horizontal foram selecionadas para monitoramento pelo sistema BCT e a taxa de crescimento foi medida a cada 10 minutos. A ponta da hifa foi exibida em monitor de televisão e registrada em vídeo (NEC, Japan) de acordo com metodologia descrita previamente (Ansheng et al. 1999; Iida et al. 1999a). Após a estabilização da taxa de crescimento, o meio simples foi trocado por meio acrescido com a droga a ser testada. AMPH (Bristol-Myers Squibb, UK) e FCLZ (Pfizer, Inc. Japan) foram dissolvidos em DMSO e empregados na prova de atividade antifúngica para concentração de 1 µg/ml, bem como os inibidores de protease sulfato de indinavir 1,5 µg/ml (Merck Dohme, USA) e ritonavir 5,3 µg/ml (Abbott Comp, UK), que foram dissolvidos em metanol. O monitoramento foi realizado por 6 horas em média.

Análise Estatística

Os dados foram digitados em planilha eletrônica (Excel 2000, Microsoft, USA) e analisados com em SAS® (Release 6.11, SAS Institute, USA), utilizando-se os testes de Qui-Quadrado e exato de Fisher (bicaudal), considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Identificação

A distribuição das espécies de leveduras identificadas entre os 114 pacientes infectados pelo HIV mostrou que 100 isolados (57,7%) eram *C. albicans* e 73 (42,1%) foram não-*albicans*. Dos isolados do grupo controle, 26 (83,8%) foram *C. albicans*, como pode ser visto na tabela 3. Houve diferença estatisticamente significativa na distribuição de amostras de não-*albicans* entre o grupo HIV+ e controle (QQ; $p=0,001$). Não houve diferença na distribuição de amostras de *Candida albicans* sorotipo A e B (QQ; $p=0,212$).

TABELA 3. Distribuição das amostras identificadas, por espécie, entre 204 amostras.

Espécies	Grupo HIV+ 173 (100%)	Grupo controle 31 (100%)
<i>C. albicans-A</i>	70 (40,4)	22 (70,9)
<i>C. albicans-B</i>	30 (17,3)	4 (12,9)
<i>C. krusei</i>	13 (7,5)	1 (3,2)
<i>C. lusitaniae</i>	9 (5,2)	-
<i>C. tropicalis</i>	8 (4,6)	1 (3,2)
<i>C. parapsilosis</i>	8 (4,6)	-
<i>C. glabrata</i>	5 (2,8)	-
<i>C. kefyr</i>	3 (1,7)	-
<i>C. guilliermondii</i>	3 (1,7)	-
<i>C. intermedia</i>	2 (1,1)	-
<i>C. norvegensis</i>	1 (0,5)	-
<i>Rhodotorula rubra</i>	3 (1,7)	1 (3,2)
<i>Candida</i> spp.	18 (10,4)	2 (6,4)
<i>C. albicans</i>	100 (57,7)	26 (83,8)
não-<i>albicans</i>	73 (42,1) [#]	5 (16,1)

[#] Diferença estatisticamente significativa (Qui-Quadrado; $p=0,001$)

Através dos métodos convencionais utilizados, a maioria (n=184) dos isolados foi identificada. Em alguns casos, entretanto, o resultado dos testes convencionais não foi claro e essas amostras em particular foram investigadas quanto aos tipos de ubiquinona presentes e tiveram parte do material genético seqüenciado. Em particular os isolados de *C. lusitaniae* e *C. kefir*, mostraram baixos índices de confiabilidade para identificação pelo ID32C® quando comparados aos demais. Todos os isolados de *C. lusitaniae* (n = 9) foram ubiquinona 8 (Q8), enquanto as amostras de *C. intermedia* (n = 2) foram Q9 e a amostra de *C. norvegensis* (n = 1) foi Q7. Os isolados de *C. kefir*, *C. intermedia*, *C. norvegensis* e *C. guilliermondii* apresentaram diferença de apenas um nucleotídeo na seqüência genética, como pode ser observado na tabela 4. A avaliação da ubiquinona, assim como as diferenças de nucleotídeos confirmaram a identificação prévia das amostras pelo teste de assimilação de carboidratos.

TABELA 4. Ubiquinonas maiores e diferenças de nucleotídeo em diferentes regiões LSUrDNA D1/D2.

Espécies	Ubiquinonas maiores	Diferenças de Nucleotídeos	GenBank, número de acesso
<i>C. kefir</i> (n=3)	Q6	1	U94924
<i>C. norvegensis</i> (n=1)	Q7	1	U75730
<i>C. lusitaniae</i> (n=9)	Q8	-	-
<i>C. intermedia</i> (n=2)	Q9	0	U44809
<i>C. guilliermondii</i> (n=1)	Q9	2	U45709

A variabilidade das espécies de leveduras identificadas acompanhou a progressão da doença do HIV como mostra a tabela 5. Apesar disto, não houve

diferença estatisticamente significativa na distribuição de *C. albicans* A e B e entre *C. albicans* e não-*albicans*. Espécies pouco freqüentes, como *C. norvegensis* e *C. intermédia*, foram isoladas da cavidade bucal destes pacientes.

TABELA 5. Distribuição de espécies de leveduras no grupo HIV + de acordo com o estágio de infecção*

Espécies	Estágio de infecção* pelo HIV			
	A2 (n=12)	B2 (n=51)	B3(n=30)	C3(n=80)
<i>C. albicans</i> -A**	4	19	17	30
<i>C. albicans</i> -B**	2	10	4	14
<i>C. tropicalis</i>	-	2	1	5
<i>C. krusei</i>	1	2	2	8
<i>C. kefyr</i>	1	1	-	1
<i>C. parapsilosis</i>	1	3	1	3
<i>C. glabrata</i>	2	2	1	-
<i>C. lusitaniae</i>	-	4	-	5
<i>C. guilliermondii</i>	-	2	1	-
<i>C. norvegensis</i>	-	-	1	-
<i>C. intermedia</i>	-	-	-	2
<i>Candida</i> spp.	-	6	2	10
<i>Rhodotorula rubra</i>	1	-	-	2
<i>C. albicans</i>	6	29	21	44
não-<i>albicans</i>	6	22	9	36

*Classificação do CDC; **sorotipos A e B

Susceptibilidade antifúngica

A tabela 6 sumariza o nível de susceptibilidade das amostras a 4 agentes antifúngicos. Entre as amostras do grupo HIV, 29 isolados de *C. albicans* e 13 isolados não-*albicans* mostraram resistência ao FLCZ (MIC $\geq$ 64 μ g/ml). Muitos isolados de *C. albicans* (60) e outros de não-*albicans* (53) mostraram resistência ao

ITCZ (MIC $\geq$ 2 μ g/ml). Entre as amostras controle, 5 isolados de *C. albicans* mostraram baixa susceptibilidade ao ITCZ (MIC $\geq$ 2 μ g/ml) e 26 eram susceptíveis ao FLCZ (MIC entre 0,12 e 8 μ g/ml).

TABELA 6. Sumário das faixas de MIC(μ g/ml) de 204 amostras de leveduras para as quatro drogas testadas.

	n	AMPH	FLCZ	MCZ	ITCZ
Grupo controle (n=31)					
<i>C. albicans</i> -A	22	0,25-1	0,12-8	0,06-4	0,06-8
<i>C. albicans</i> -B	4	0,5	0,25-0,5	0,06-0,25	0,12-0,25
<i>C. tropicalis</i>	1	1	4	0,5	0,25
<i>C. krusei</i>	1	1	64	2	0,5
<i>Candida</i> spp.	2	0,5	2,0-4	1	0,25-0,5
<i>Rhodotorula rubra</i>	1	1	8	32	2
Grupo HIV+ (n=173)					
<i>C. albicans</i> -A	70	0,125-4	0,125-64	0,125-16	0,125-8
<i>C. albicans</i> -B	30	0,25-2	0,25-64	0,25-8	0,25-8
<i>C. tropicalis</i>	8	0,5-4	4-64	2,0-8	0,5-8
<i>C. krusei</i>	13	0,5-4	2-64	4,0-16	1,0-8
<i>C. kefyr</i>	3	0,5-2	0,125-0,25	0,06-4	0,125-1
<i>C. parapsilosis</i>	8	1,0-2	2,0-8	0,5-8	0,5-2
<i>C. glabrata</i>	5	0,5-4	4-32	0,5-4	0,5-4
<i>C. lusitaniae</i>	9	0,25-2	0,125-4	0,25-4	0,25-8
<i>C. guilliermondii</i>	3	0,5-2	0,5-16	0,25-8	1,0-8
<i>C. norvegensis</i>	1	2	64	4	2
<i>C. intermedia</i>	2	0,25-0,5	1,0-8	2	2
<i>Candida</i> spp.	18	0,25-4	1-64	0,25-8	0,5-8
<i>Rhodotorula rubra</i>	3	0,5-2	32-64	2,0-8	4,0-8

AMPH = anfotericina B, FLCZ = fluconazol, MCZ = miconazol, ITCZ= itraconazol.

As concentrações mínimas inibitórias (MIC) para cada uma das 4 drogas testadas podem ser vistas nas tabelas de 7A a 7D.

TABELA 7A. Número de amostras para cada MIC de anfotericina B - AMPH (R > 2µg/ml) para 173 isolados de pacientes HIV+.

Espécies	n	0,125	0,25	0,5	1	2	4
<i>Candida albicans A</i>	70	3	5	14	25	22	1
<i>Candida albicans B</i>	30	-	2	6	7	15	-
<i>Candida tropicalis</i>	8	-	1	1	3	-	3
<i>Candida krusei</i>	13	-	-	2	2	7	2
<i>Candida kefyr</i>	3	-	-	1	-	2	-
<i>Candida parapsilosis</i>	8	-	-	-	1	7	-
<i>Candida glabrata</i>	5	-	-	1	1	2	1
<i>Candida lusitanae</i>	9	-	2	1	3	3	-
<i>Candida guilliermondii</i>	3	-	-	1	1	1	-
<i>Candida novergensis</i>	1	-	-	-	-	1	-
<i>Candida intermedia</i>	2	-	1	1	-	-	-
<i>Candida spp.</i>	18	-	1	6	3	5	3
<i>Rhodotorula rubra</i>	3	-	-	1	1	1	-
<i>Candida albicans</i>	100	3	7	20	32	37	1
não - <i>albicans</i>	73	0	5	15	15	29	9

TABELA 7B. Número de amostras para cada MIC de fluconazol – FCZL ($R \geq 32\mu\text{g/ml}$) para 173 isolados de pacientes HIV+.

Espécies	n	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
<i>Candida albicans A</i>	70	2	1	7	7	2	6	4	8	6	27
<i>Candida albicans B</i>	30	1	6	3	1	1	2	4	6	5	2
<i>Candida tropicalis</i>	8	-	-	1	-	-	2	1	1	1	2
<i>Candida krusei</i>	13	-	-	-	-	1	-	2	2	3	5
<i>Candida kefyr</i>	3	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	8	-	-	-	1	2	4	1	-	-	-
<i>Candida glabrata</i>	5	-	-	-	-	-	1	-	-	4	-
<i>Candida lusitanae</i>	9	1	1	-	2	2	3	-	-	-	-
<i>Candida guilliermondii</i>	3	-	-	1	-	-	-	1	1	-	-
<i>Candida novergensis</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Candida intermedia</i>	2	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-
<i>Candida spp.</i>	18	-	-	-	1	-	2	1	6	5	3
<i>Rhodotorula rubra</i>	3	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2
<i>Candida albicans</i>	100	3	7	10	8	3	8	8	14	11	29
não - <i>albicans</i>	73	0	2	2	5	5	12	7	10	14	13

TABELA 7C. Número de amostras para cada MIC de miconazol – MCZ ($R \geq 2\mu\text{g/ml}$) para 173 isolados de pacientes HIV+.

Espécies	n	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16
<i>Candida albicans A</i>	70	-	2	5	10	6	6	17	19	5
<i>Candida albicans B</i>	30	-	-	5	5	1	6	8	5	-
<i>Candida tropicalis</i>	8	-	-	-	-	-	2	1	2	-
<i>Candida krusei</i>	13	-	-	-	-	-	-	9	3	1
<i>Candida kefyr</i>	3	2	-	-	-	-	-	1	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	8	-	-	-	2	-	1	4	1	-
<i>Candida glabrata</i>	5	-	-	-	1	-	3	1	-	-
<i>Candida lusitanae</i>	9	-	-	1	3	-	4	1	-	-
<i>Candida guilliermondii</i>	3	-	-	1	-	-	1	-	1	-
<i>Candida novergensis</i>	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-
<i>Candida intermedia</i>	2	-	-	-	-	2	-	-	-	-
<i>Candida spp.</i>	18	-	-	1	2	3	3	5	4	-
<i>Rhodotorula rubra</i>	3	-	-	-	-	-	1	1	1	-
<i>Candida albicans</i>	100	0	2	10	15	7	12	25	24	5
não - <i>albicans</i>	73	2	0	3	8	5	15	24	12	1

TABELA 7D. Número de amostras para cada MIC de itraconazol – ITCZ ($R \geq 2\mu\text{g/ml}$) para 173 isolados de pacientes HIV+.

Espécies	n	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8
<i>Candida albicans A</i>	70	1	3	13	18	8	8	29
<i>Candida albicans B</i>	30	-	1	2	12	5	6	4
<i>Candida tropicalis</i>	8	-	-	1	2	4	1	-
<i>Candida krusei</i>	13	-	-	-	1	3	5	4
<i>Candida kefyr</i>	3	1	1	-	1	-	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	8	-	-	3	2	3	-	-
<i>Candida glabrata</i>	5	-	-	1		1	3	-
<i>Candida lusitanae</i>	9	-	2	1	3	2	1	1
<i>Candida guilliermondii</i>	3	-	-	-	1	1	-	1
<i>Candida novergensis</i>	1	-	-	-	-	1	-	-
<i>Candida intermedia</i>	2	-	-	-	-	2	-	-
<i>Candida spp.</i>	18	-	-	-	1	7	8	2
<i>Rhodotorula rubra</i>	3	-	-	-	-	-	1	2
<i>Candida albicans</i>	100	1	4	15	30	13	14	33
não - <i>albicans</i>	73	1	3	6	11	24	19	10

No grupo controle, houve apenas 1 isolado de *C. albicans* resistente ao MCZ e ITCZ e 1 de *C. krusei* resistente ao FLCZ. Na Tabela 8 no grupo HIV, 68 isolados de *C. albicans* eram resistentes a pelo menos uma das drogas testadas. Das espécies menos comuns, *C. intermedia* foi resistente ao ITCZ e a *C. norvegensis* e foi resistente ao FLCZ, MCZ e ITCZ. Todos os isolados de *C. tropicalis* e *C. krusei* eram resistentes a pelo menos um dos agentes antifúngicos (FLCZ, MCZ e ITCZ). Entre os isolados de *C. glabrata*, 4 (80%) foram resistentes ao FLCZ, MCZ e ITCZ como pode ser visto na tabela 8. Apenas 1 isolado de *C. albicans* mostrou-se resistente à AMPH. Os pontos de corte para resistência das espécies não-*albicans* ainda não foram estabelecidos.

No grupo HIV, o número de isolados de *C. albicans* multi-resistentes para FLCZ, MCZ e ITCZ (27) foi similar ao número de isolados resistentes a MCZ e ITCZ (29). Entre as espécies não-*albicans* de *Candida*, 46,5% era multi-resistente para MCZ e ITCZ e 16,4% para FLCZ, MCZ e ITCZ (Tabela 9).

TABELA 8. Distribuição dos isolados do grupo HIV, resistentes (R) a pelo menos um dos agentes antifúngicos testados. FLCZ 64 = fluconazol ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$; FLCZ 32 = fluconazol ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$; MCZ 2 = miconazol ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$; ITCZ 2 = itraconazol ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$; n = total de isolados testados para cada espécie.

Espécies	n	R (%)	FLCZ 64	FLCZ 32	MCZ 2	ITCZ 2
<i>C. albicans</i> -A	70	49 (70,0)	27	6	47	45
<i>C. albicans</i> -B	30	19 (63,0)	2	5	19	15
<i>C. tropicalis</i>	8	8 (100,0)	2	1	5	5
<i>C. krusei</i>	13	13 (100,0)	5	3	13	12
<i>C. kefyr</i>	3	2 (66,6)	0	0	1	0
<i>C. parapsilosis</i>	8	7 (87,5)	0	0	6	3
<i>C. glabrata</i>	5	4 (80,0)	0	4	4	4
<i>C. lusitaniae</i>	9	6 (66,6)	0	0	5	4
<i>C. guilliermondii</i>	3	3 (100,0)	0	0	2	2
<i>C. norvegensis</i>	1	1 (100,0)	1	0	1	1
<i>C. intermedia</i>	2	2 (100,0)	0	0	0	2
<i>Candida</i> spp.	18	17 (94,4)	2	5	12	17
<i>Rhodotorula rubra</i>	3	3 (100,0)	3	1	3	3
<i>C. albicans</i>	100	68 (68,0)	29	11	66	60
não - <i>albicans</i>	73	66 (90,4)	13	14	52	53
Total	173	134 (74,4)	42	25	118	113

TABELA 9. Distribuição dos isolados do grupo HIV, multi-resistentes aos agentes antifúngicos testados (FLCZ+MCZ+ITCZ e MCZ+ITCZ). FLCZ= fluconazol ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$; MCZ = miconazol ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$; ITCZ = itraconazol ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$; n = total de isolados testados para cada espécie.

Espécies	n	FLCZ+MCZ+ITCZ	MCZ+ITCZ
		n (%)	n (%)
<i>C. albicans</i> -A	70	27 (38,5)	15 (21,4)
<i>C. albicans</i> -B	30	2 (6,6)	12 (40,0)
<i>C. tropicalis</i>	8	3 (37,5)	5 (62,5)
<i>C. krusei</i>	13	5 (38,4)	7 (53,8)
<i>C. kefyr</i>	3	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	8	-	3 (37,5)
<i>C. glabrata</i>	5	-	4 (80,0)
<i>C. lusitaniae</i>	9	-	2 (22,2)
<i>C. guilliermondii</i>	3	-	2 (66,6)
<i>C. norvegensis</i>	1	1 (100,0)	-
<i>C. intermedia</i>	2	-	2 (100,0)
<i>Candida</i> spp.	18	1 (5,5)	9 (50,0)
<i>Rhodotorula rubra</i>	3	3 (100,0)	-
<i>C. albicans</i>	100	27 (27,0)	29 (29,0)
não - <i>albicans</i>	73	12 (16,4)	34 (46,5)
Total	173	39 (22,5)	63 (36,4)

Monitoramento automático do crescimento de hifas

Através do monitoramento pelo BCT foi demonstrado efeito inibitório do inibidor de protease ritonavir sobre o crescimento de hifas de *Candida*, tanto para o isolado clínico 42, quanto para a referência ATCC 90028. A combinação de drogas (AMPH e ritonavir) parece ter efeito sinérgico, causando inibição do crescimento de hifas. Por outro lado, não foi observada ação inibitória do indinavir sobre o crescimento de hifas. Resultados da análise por BCT podem ser observados nos gráficos de 1 a 3.

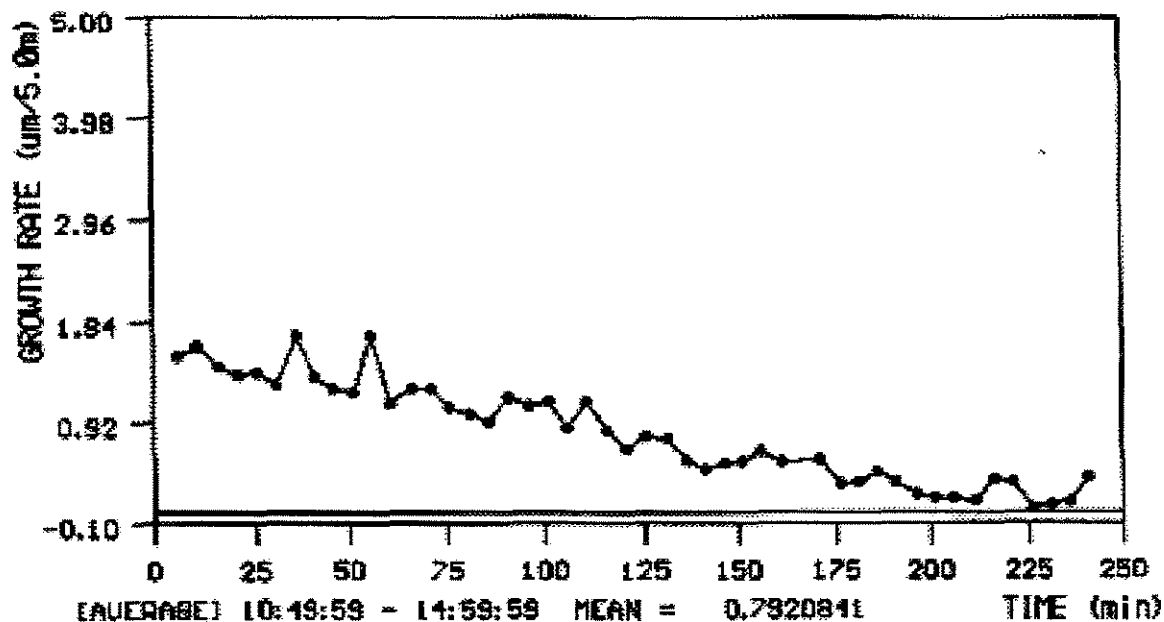


Gráfico 1. Monitoramento pelo BCT do isolado de *Candida* referência ATCC em presença da combinação das drogas AMPH e Ritonavir.

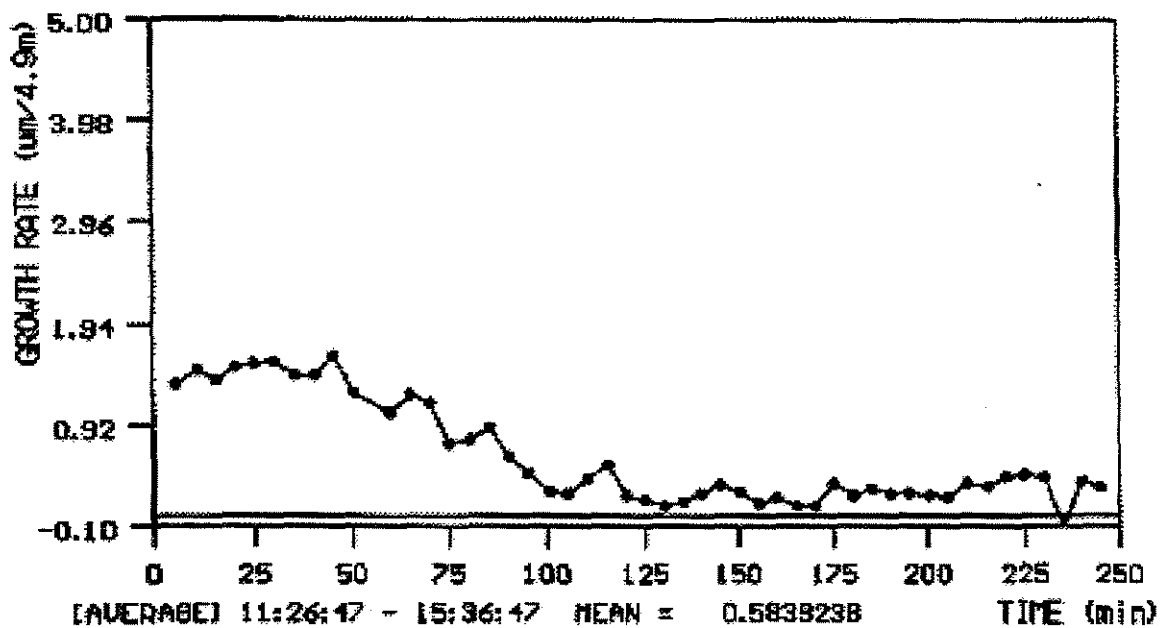


Gráfico 2. Monitoramento pelo BCT do isolado clínico 42 em presença da combinação das drogas AMPH e Ritonavir.

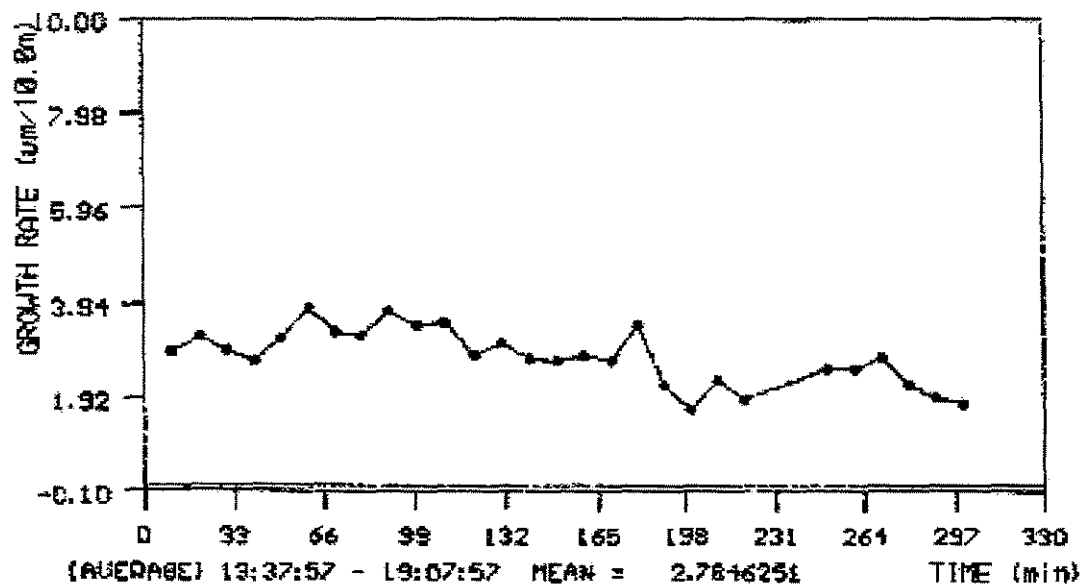


Gráfico 3. Monitoramento pelo BCT do isolado clínico 42 em presença da combinação das drogas AMPH e Indinavir.

DISCUSSÃO

Identificação

O aumento da prevalência de espécies não-*albicans* em pacientes com AIDS têm aumentado o interesse pela caracterização da microbiota bucal e a identificação das espécies é essencial para a análise da susceptibilidade antifúngica. O aumento do número de amostras resistentes a agentes antifúngicos representa um dos mais sérios problemas da micologia médica atual.

Isolados de *C. albicans* foram muito mais freqüentes (83,8%) no grupo controle que isolados não-*albicans*, indicando baixa diversidade. Esta característica já foi reportada previamente para grupos similares de pacientes (Schoofs et al. 1998; Sobel et al. 2001). Estudo em população imunocompetente reportou índices de 86% para *C. albicans* e de 23% para não-*albicans*, das quais 16% foram *C. glabrata* e 11% foram *C. tropicalis* (Sobel et al. 2001).

A variabilidade das amostras de levedura dos pacientes infectados pelo HIV diferiu significativamente daquela do grupo controle (QQ, $p=0,001$). Amostras de *C. albicans* corresponderam a 57,7% ($n=100$) dos 173 isolados. O número de espécies identificadas no grupo HIV no presente estudo foi maior, 10 espécies, que o previamente reportado em outro estudo no Brasil, 8 espécies, mas aspectos metodológicos dificultam a comparação entre os mesmos (Colombo et al. 1999). Pacientes imunossuprimidos geralmente tem altas proporções (70 a 80%) de *C. albicans*, enquanto *C. glabrata* e *C. tropicalis* representam de 5 a 8% dos isolados (Fidel, Jr. et al. 1999). Aumento na proporção de infecções causadas por espécies não-*albicans* de *Candida* em imunossuprimidos também foi descrito (Hazen 1995, Nguyen et al. 1996a; Pfaller et al. 1998b; Schoofs et al. 1998; Colombo et al. 1999).

No presente estudo, a segunda espécie mais freqüente no grupo HIV foi *C. krusei* (7,5%; n=13) seguida por *C. lusitaniae* (5,2%, n=9). Esta freqüência confirma trabalhos recentes de epidemiologia de leveduras em pacientes portadores do HIV (Nguyen et al. 1996a; Milan et al. 1997; Sobel et al. 2000). Ainda que *C. tropicalis* tenha sido descrita como a segunda e *C. glabrata* como a terceira espécie mais comum em isolados da cavidade bucal de pacientes infectados pelo HIV (Fidel, Jr. et al. 1999), outras espécies podem se apresentar com alta freqüência (Hazen 1995; Sullivan et al. 1996; Pfaller et al. 1998b; Heelan et al. 1998; Fidel, Jr. et al. 1999). Em estudo brasileiro de pacientes com infecção sistêmica por *Candida*, 63% das amostras de *Candida* foram não-*albicans*, sendo 25% *C. parapsilosis*, 24% *C. tropicalis* e 5% *C. rugosa* (Colombo et al. 1999). Estes resultados enfatizam as mudanças do perfil epidemiológico das espécies de *Candida* em pacientes imunossuprimidos.

No presente estudo, 70% das amostras de *C. albicans* eram sorotipo A e 30% sorotipo B. O número de trabalhos epidemiológicos que realizam sorotipagem de *C. albicans* é relativamente pequeno, mas aumento da prevalência de *C. albicans* sorotipo B em pacientes portadores do HIV já foi descrito (Torssander et al. 1996). Menor virulência de isolados de *C. albicans* sorotipo B foi reportada previamente (Poulain et al. 1983; Borg et al. 1988). O fato parece estar ligado à menor expressão de *Candida*-protease e menor potencial de adesão e invasão do epitélio da mucosa (Poulain et al. 1983; Borg e Ruchel 1988). Apesar disto, o sorotipo A de *Candida albicans* ainda é o mais freqüente (Poulain et al. 1983; Williamson et al. 1987; Borg et al. 1988; Borg e Ruchel 1988; McMullan-Vogel et al. 1999). Há escassez de estudos sobre a possível correlação entre sorotipo e

manifestações clínicas, virulência ou resistência antifúngica.

Neste estudo, o número de espécies não-*albicans* de *Candida* no grupo HIV foi relativamente elevado, cerca de 42%, ou 73 dentre 173 isolados. Espécies incomuns, como *C. lusitaniae*, *C. norvegensis* e *C. intermedia* foram identificadas no grupo HIV positivo. Estes resultados são compatíveis com a informação recente de literatura (Nguyen et al. 1996a; Nguyen et al. 1996b; Yokoyama et al. 2000; Schoofs et al. 1998; Walsh e Groll 1999; Groll e Walsh 2001). Amostras de espécies não-*albicans* de *Candida* representavam 3,4% dos isolados orofaríngeos de pacientes HIV positivo ao fim dos anos oitenta em comparação a 16,8% dos isolados no início dos anos noventa (Barchiesi et al. 1993). Estudo recente demonstrou cerca de 22% de espécies não-*albicans* entre amostras de *Candida* de pacientes brasileiros com AIDS (Milan et al. 1998). Espécies não-*albicans* de *Candida* parecem ter papel relevante na etiologia da candidose neste grupo de pacientes (Nguyen et al. 1996b; Fidel, Jr. et al. 1999; Sobel et al. 2001). Todos os pacientes do grupo HIV estavam sob terapêutica antiretroviral, que pode ter exercido efeito antifúngico sobre as espécies produtoras de protease e reduzido seu potencial de virulência, possibilitando a emergência de espécies não produtoras de protease como a *C.krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* (Ray e Payne 1988). Este fato aumenta o interesse e a importância da caracterização acurada de amostras de *Candida* da cavidade bucal.

O uso de métodos tradicionais em associação com sistemas comerciais de identificação, em especial do ID 32C®, permitiu a caracterização da maioria das amostras, o que confirma a eficácia destes métodos. Entretanto, espécies menos comuns, como *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, *C. intermedia* e *C. norvegensis*, geraram

dúvidas em alguns critérios de assimilação. A análise de ubiquinona, um dos importantes métodos utilizados em taxonomia (Montrocher et al. 1989), confirmou os resultados das técnicas anteriores, reforçando sua validade. Os tipos de ubiquinona reportados no presente estudo (Q8 para *C. lusitaniae*, Q9 para *C. intermedia*, Q6 para *C. kefyr*, Q9 para *C. guilliermondii* e Q7 para *C. norvegensis*) foram semelhantes aos reportados previamente na literatura (Billon-Grand 1985; Molnar et al. 1996; Schauer e Hanschke 1999). A expressão de ubiquinonas em espécies não-*albicans* de *Candida* ainda é pouco conhecida, com escassos trabalhos disponíveis na literatura (Molnar et al. 1996; Schauer e Hanschke 1999). A emergência de espécies raras é mais um fator de estímulo na busca de técnicas alternativas que auxiliem a identificação de amostras de leveduras.

Do mesmo modo que o teste das ubiquinonas, as técnicas moleculares aplicadas à identificação de amostras de leveduras confirmaram os resultados dos testes de assimilação e fermentação. Ainda que poucas amostras tenham sido submetidas ao seqüenciamento de nucleotídeos da região D1/D2 LSUrDNA, não foram encontradas diferenças significativas na análise das amostras de *C. kefyr*, *C. intermedia* e *C. norvegensis*. Já as amostras de *C. guilliermondii*, mostraram duas substituições, mas também confirmaram a identificação pelos métodos convencionais. Os resultados são similares aos de outros estudos (Nho et al. 1997; Yokoyama et al. 2000; Biswas et al. 2001). Técnicas moleculares tem evoluído rapidamente, permitindo a caracterização de espécies com maior acuidade e economia de tempo e possivelmente serão os métodos de referência em futuro próximo (Reiss et al. 1998; Yokoyama et al. 2000).

A alta frequência de candidose orofaríngea e esofagiana têm sido

glabrata nos grupos A2 e B2 (n=4) quando comparados aos grupos B3 e C3 (n=1). Esta espécie está relacionada à resistência inata ao fluconazol (Ghannoum e Rice 1999; Woods 2001) e resistência cruzada à terbinafina (Ghannoum e Rice 1999). Quatro isolados de *C. lusitaniae* foram identificados no grupo B2. *C. lusitaniae* apresenta capacidade de desenvolver resistência a anfotericina (Nguyen et al. 1996a; Favel et al. 1997; Ghannoum e Rice 1999).

Antifúngicos

A emergência de patógenos oportunistas resistentes a agentes antifúngicos tornou-se um importante problema clínico em medicina (Favel et al. 1999). No presente estudo, as mostras do grupo controle apresentaram estreita variação de intervalo de MIC, sendo a maioria das amostras de *C. albicans* (96,1%) sensíveis aos agentes antifúngicos testados (AMPH, FLCZ, ITCZ e MCZ). Estes dados são similares àqueles reportados pela literatura (NCCLS 1997; Pfaller et al. 1998b; Fidel, Jr. et al. 1999; Sobel et al. 2001), ainda que o número de amostras tenha sido pequeno (n=31). Estes resultados podem estar associados a ausência de contato prévio dos pacientes com agentes antifúngicos. Por outro lado, presume-se que a eficácia dos medicamentos, na eventualidade de uso clínico destes antifúngicos nestes pacientes, será satisfatória. Neste estudo, apenas um isolado de *C. albicans* apresentou resistência para MCZ e ITCZ. O MCZ tem sido o agente antifúngico de eleição para tratamento de candidose à muitos anos (Metzger e Hofmann 1997) e o uso prolongado do medicamento parece estar associado ao aparecimento de cepas resistentes (Metzger e Hofmann 1997; Ghannoum e Rice 1999, Ghannoum e Elewski 1999; Tudela et al. 2000).

Por outro lado, os isolados de *C. albicans* do grupo HIV mostraram larga

variação de intervalo de MIC para as mesmas drogas testadas. Quase todas as amostras de *C. albicans* (99%) foram sensíveis a AMPH, fato já descrito pela literatura (Vanden Bossche et al. 1998; Ghannoum e Rice 1999). Valores similares foram encontrados entre os sorotipos A (98,5%) e sorotipos B (100%), o que também está de acordo com as informações disponíveis na literatura para amostras brasileiras (Tresoldi et al. 1997; Levin et al. 1998; Colombo et al. 1999). Cerca de 71% das amostras de *C. albicans* neste estudo foram sensíveis ao FLCZ. Sensibilidade de amostras de *Candida albicans* ao FLCZ tem sido reportada em níveis que variam de 80 a 100% (Kelly et al. 1996; Colombo et al. 1999), ligeiramente superiores portanto aos valores obtidos no presente estudo. Enquanto 61,4% das amostras de *C. albicans* sorotipo A foram sensíveis ao FLCZ, 93,3% das amostras de sorotipo B apresentavam a mesma característica. O uso prévio de agentes antifúngicos parece aumentar a capacidade de adesão celular dos fungos, conseqüentemente aumentando o potencial patogênico destes isolados (Pereiro, Jr. et al. 1997). FLCZ não costuma ser indicado como medicamento de primeira escolha para pacientes brasileiros com candidose em função do alto custo e tem sido prescrito apenas nos casos sem resposta clínica a outros medicamentos (Colombo et al. 1999). Para MCZ e ITCZ, o percentual de amostras de *C. albicans* sensíveis foi menor, variando de 40 a 60%. Estes resultados podem estar relacionados com o uso clínico freqüente destas drogas (Metzger e Hofmann 1997).

No grupo HIV, uma amostra de *C. albicans* foi resistente ao AMPH, evento raramente reportado na literatura (Nguyen et al. 1996a). No presente estudo, 29% dos isolados de *C. albicans* foram resistentes ao FLCZ e a maioria foi do sorotipo A (apenas 1 isolado de sorotipo B). Resultados similares em pacientes com AIDS já

foram reportados (Law et al. 1994), mas o valor de 29% foi surpreendentemente elevado quando comparado aos 10% relatos por KELLY (Kelly et al. 1996). Estudos prévios com isolados obtidos no Brasil a partir de pacientes HIV, também mostraram níveis elevados de resistência a compostos azólicos (acima de 15%) e cetoconazole (acima de 13%) para *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (Milan et al. 1998; Silva et al. 1999).

Entre os isolados de *C. albicans*, 54% foram resistentes ao MCZ. Considerando o reduzido uso clínico do fluconazol no Brasil, o mecanismo de resistência pode estar associado à reação cruzada com outros azoles (Kelly et al. 1996; Metzger e Hofmann 1997; Silva et al. 1999). A elevada freqüência de casos de candidose refratária ao tratamento com esta droga tem reduzido o número de centros médicos que a utilizam (Metzger e Hofmann 1997; Silva et al. 1999).

No presente estudo, cerca de 50% dos isolados de *C. albicans* apresentaram resistência para o ITCZ. Resistência cruzada ao cetoconazol e ao ITCZ tem sido descrita em freqüências que variam de 20 a 70% (Metzger e Hofmann 1997) e o elevado percentual de cepas resistentes ao ITCZ neste estudo pode ser consequência de resistência cruzada do cetoconazol ou MCZ, ambos amplamente utilizados na clínica médica brasileira. É importante considerar este fato durante a eleição da terapêutica antifúngica nos casos de candidose refratária.

A maioria dos isolados não-*albicans* de *Candida* foi sensível a todos os agentes antifúngicos testados, o que já havia sido reportado em artigos similares na literatura (Hauman et al. 1993; Pfaller et al. 1998b; Sobel et al. 2001). Das amostras não-*albicans* do grupo controle, um isolado de *C. krusei* mostrou baixa sensibilidade para FLCZ. É possível que esta espécie apresente resistência inata ao FLCZ

(Warnock 1998; Pfaller et al. 1998a; Fidel, Jr. et al. 1999). Um isolado de *Rhodotorula rubra* foi classificado como dose-dependente para FLCZ.

Nos isolados do grupo HIV foi encontrada acentuada variação no intervalo de MIC para FLCZ, ITCZ e MCZ, mas a maioria foi sensível à AMPH, fato também reportado por outros autores (Nguyen et al. 1996a; Kelly et al. 1996). FLCZ tem sido largamente utilizado em centros hospitalares internacionais (Heelan et al. 1996; Heelan et al. 1998; Ghannoum e Rice 1999; Tudela et al. 2000), mas ainda é de uso relativamente restrito no Brasil (Colombo et al. 1999). No presente estudo, a maioria dos isolados não-*albicans* foi sensível ao FLCZ. *C. krusei* foi exceção, com 61,5% sendo susceptível ao FLCZ. Em contraste, cerca de 40% dos isolados não-*albicans* foi sensível ao MCZ. Também dentre os isolados não-*albicans* de *Candida*, 87,5% das *C. tropicalis* e 30,7% amostras de *C. krusei* foram sensíveis ao ITCZ, sendo a maioria das amostras das demais espécies, sensíveis. O reduzido número de isolados não-*albicans* sensíveis ao MCZ demonstra sua baixa efetividade na terapêutica, apesar do mesmo ter sido muito utilizado nos últimos anos pelo baixo custo (Metzger e Hofmann 1997), particularmente no Brasil (Milan et al. 1998; Colombo et al. 1999; Silva et al. 1999; Ribeiro et al. 2001). Esta informação enfatiza a importância clínica da determinação da espécie prevalente em casos de candidose refratária para a definição do protocolo terapêutico mais apropriado (Metzger e Hofmann 1997; Baran, Jr. et al. 2001; Kovacicova et al. 2001). Outra informação valiosa é o ajuste da dose da droga em função dos valores de referência do MIC para espécies não-*albicans*, que têm apresentado valores do MIC superiores aos de referência para *C. albicans* e portanto requerem prescrição de dose superior às doses comumente aplicadas pelo clínico.

Dentre os isolados não-*albicans* do grupo HIV, 3 amostras de *C. tropicalis*, 2 de *C. krusei* e 1 de *C. glabrata* foram resistentes a AMPH, o que é considerado raro, embora existam alguns relatos prévios (Powderly et al. 1993; Nguyen et al. 1996a; Warnock et al. 1998; Prasad et al. 1999; Pfaller 2000). Isolados de *C. lusitaniae* resistentes têm sido reportados e esta espécie parece ter potencial inato para o desenvolvimento de resistência a AMPH (Sandven et al. 1997; Favel et al. 1997; Yoon et al. 1999; Reyes e Ghannoum 2000). No presente estudo, todos os isolados de *C. lusitaniae* foram sensíveis a AMPH. Deve ser destacado que ainda não foram superadas as dificuldades técnicas na elaboração de protocolo para determinação *in vitro* de resistência ao AMPH (NCCLS 1997).

O presente estudo detectou diversos isolados não-*albicans* de *Candida* resistentes ao FLCZ, incluindo 5 amostras de *C. krusei*, valores similares aos reportados anteriormente na literatura internacional e brasileira (Nguyen et al. 1996a; Warnock et al. 1998; Ghannoum e Rice 1999; Silva et al. 1999; Reyes e Ghannoum 2000; Graybill 2000). *C. krusei* têm sido descrita como portadora de resistência inata ao FLCZ (Nguyen et al. 1996a; Nho et al. 1997; Metzger e Hofmann 1997; Graybill 2000). Apenas recentemente, *C. norvegensis* foi descrita como patógeno resistente ao FLCZ (Nho et al. 1997; Sandven et al. 1997; Becker 2000), enquanto amostras de *C. tropicalis* rotineiramente o são (Nguyen et al. 1996a; Warnock et al. 1998; Hoegl et al. 1998b; Sobel et al. 2000; Ishigaki et al. 2000). No presente estudo, todos os isolados de *C. parapsilosis* foram sensíveis ao FLCZ e 3 isolados de *C. glabrata* foram considerados dose-dependente (MIC=32µg/ml), o que já foi reportado por outros autores (Pfaller et al. 1998b; Colombo et al. 1999; Safdar

et al. 2001), ainda que haja estudos discordantes (Nguyen et al. 1996a; Hoegl et al. 1998b; Fidel, Jr. et al. 1999).

Casos isolados de infecções causadas por *Rhodotorula rubra* foram reportados apenas recentemente (Papadogeorgakis et al. 1999; Kiraz et al. 2000; Samonis et al. 2001) e as amostras desta levedura avaliadas no presente estudo apresentaram baixa susceptibilidade aos antifúngicos testados. *R. rubra* é geralmente considerada sensível ao FLCZ e MCZ, e resistente a AMPH, fluorocitosina, econazol e cetoconazol (El-Tahawy e Ragga 1999; Ishigaki et al. 2000). A maioria dos isolados não-*albicans* foi resistente ao MCZ, com destaque para *C. lusitaniae*, com 100% das amostras resistentes. Resistência ao ITCZ foi observada em níveis ligeiramente elevados para *C. intermedia* (100%, n=2), *C. krusei* (69,2%, n=9), *C. glabrata* (60%, n=3) e *Rhodotorula rubra* (100%, n=3), quando comparados aos da literatura (Nguyen et al. 1996a; Fidel, Jr. et al. 1999; Colombo et al. 1999; Safdar et al. 2001; Piero et al. 2001). Resistência aos antifúngicos em amostras de *C. intermedia* ainda não foi descrita na literatura. Dentre os isolados não-*albicans*, 94,4% apresentaram multi-resistência ao FLCZ, MCZ e ITCZ, enquanto 68% das amostras de *C. albicans* mostraram a mesma característica.

A frequência aumentada de isolados não-*albicans* resistentes a antifúngico em pacientes HIV-positivo no presente estudo reforça a hipótese de que o uso prolongado destes medicamentos pode ser responsável por este fenômeno clínico (Sullivan et al. 1996; Nguyen et al. 1996a; Pfaller 1996; Pfaller et al. 1998e; Redding et al. 2000; Sobel et al. 2001; Baran, Jr. et al. 2001), mas resistência cruzada a azoles e ação de drogas anti-retrovirais também podem ter contribuído (Metzger e

Hofmann 1997; Kelly et al. 1996; Cassone et al. 1999; Bektic et al. 2001; Ueta et al. 2001). A ação destes antifúngicos parece afetar a capacidade de aderência de amostras de *C.albicans* mas o modo como isto ocorre ainda não foi completamente esclarecido (Pfaller e Riley 1992; Pereiro, Jr. et al. 1997; Egusa et al. 2000; Bektic et al. 2001) e este fator não foi avaliado no presente estudo.

O sistema para análise dinâmica do crescimento das células fúngicas (Bio-Cell Tracer[®]) tem sido aplicado recentemente na avaliação da atividade antifúngica (Taguchi et al. 1995; Oh et al. 1998; Ansheng et al. 1999). Ainda que o uso do BCT no presente estudo tenha sido apenas demonstrativo, avaliando poucas amostras e drogas, demonstrou a aplicabilidade do BCT na análise do efeito de agentes antifúngicos sobre isolados de *Candida*. O possível efeito anti-*Candida* dos inibidores de protease HIV ainda causa controvérsias, mas já foi demonstrado através de outras metodologias (Korting et al. 1999; Diz et al. 1999; Derouin and Santillana-Hayat 2000). Em nosso conhecimento, esta é a primeira descrição da atividade antifúngica de inibidor de protease avaliada com o uso do BCT. Uma das vantagens desta metodologia é a rapidez da avaliação quantitativa da atividade antifúngica quando comparada à metodologia padrão (Taguchi et al. 1995; Oh et al. 1998; Ansheng et al. 1999).

CONCLUSÕES

- 1- Houve maior diversidade de espécies de *Candida* entre amostras do grupo HIV que entre amostras do grupo controle.
- 2- Houve redução da sensibilidade aos agentes antifúngicos testados nos isolados do grupo HIV, com destaque para amostras não-*albicans* de *Candida*.
- 3- Houve elevado número de cepas multi-resistentes para as drogas testadas no grupo HIV, particularmente entre as amostras não-*albicans* de *Candida*.
- 4- Espécies pouco freqüentes de *Candida* foram isoladas no grupo HIV e apresentaram menor susceptibilidade aos antifúngicos testados.

REFERÊNCIAS

- 1 Al-Mohsen I, Hughes WT. Systemic antifungal therapy: past, present and future. *Annals of Saudi Medicine* 1998; 18:1-11.
- 2 Anaissie E, Bodey GP. Nosocomial fungal infections. Old problems and new challenges. *Infect Dis Clin North Am* 1989; 3(4):867-882.
- 3 Anaissie EJ, Karyotakis NC, Hachem R, Dignani MC, Rex JH, Paetznick V. Correlation between in vitro and in vivo activity of antifungal agents against *Candida* species. *J Infect Dis* 1994; 170(2):384-389.
- 4 Ansheng L, Taguchi H, Miyaji M, Nishimura K, Wu S. Study on the hyphal responses of *Aspergillus fumigatus* to the antifungal agent by Bio-Cell Tracer. *Mycopathologia* 1999; 148(1):17-23.
- 5 Ashman RB, Papadimitriou JM. What's new in the mechanisms of host resistance to *Candida albicans* infection? *Pathol Res Pract* 1990; 186(4):527-534.
- 6 Athar MA, Winner HI. The development of resistance by *Candida* species to polyene antibiotics in vitro. *J Med Microbiol* 1971; 4(4):505-517.
- 7 Atzori C, Fantoni G, Valerio A, Cargnel A. In vitro activity of amprenavir against *Pneumocystis carinii*. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 18(3):271-273.
- 8 Baran J, Jr., Muckatira B, Khatib R. Candidemia before and during the fluconazole era: prevalence, type of species and approach to treatment in a tertiary care community hospital. *Scand J Infect Dis* 2001; 33(2):137-139.
- 9 Barchiesi F, Morbiducci V, Ancarani F, Scalise G. Emergence of oropharyngeal candidiasis caused by non-albicans species of *Candida* in HIV-infected patients. *Eur J Epidemiol* 1993; 9(4):455-456.
- 10 Barnett JA, Lichtenthaler FW. A history of research on yeasts 3: Emil Fischer, Eduard Buchner and their contemporaries, 1880-1900. *Yeast* 2001; 18(4):363-388.
- 11 Baumgartner C, Freydiere AM, Gille Y. Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using albicans ID and CHROMagar *Candida* plates. *J Clin Microbiol* 1996; 34(2):454-456.
- 12 Baumgartner JC, Watts CM, Xia T. Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. *J Endod* 2000; 26(12):695-698.
- 13 Becker K. Molecular biological differentiation of yeasts. *Mycoses* 2000; 43 Suppl 1:40-47.

- 14 Beighton D, Ludford R, Clark DT, Brailsford SR, Pankhurst CL, Tinsley GF et al. Use of CHROMagar Candida medium for isolation of yeasts from dental samples. J Clin Microbiol 1995; 33(11):3025-3027.
- 15 Bektic J, Lell CP, Fuchs A, Stoiber H, Speth C, Lass-Flörl C et al. HIV protease inhibitors attenuate adherence of *Candida albicans* to epithelial cells in vitro. FEMS Immunol Med Microbiol 2001; 31(1):65-71.
- 16 Billon-Grand G. Coenzyme Q of various species of the genus *Pichia*: qualitative and quantitative determinations. Mycopathologia 1985; 90(2):101-106.
- 17 Billon-Grand G. Minor ubiquinones of the yeast coenzyme Q system: importance in the taxonomy of the yeast. J Gen Microbiol 1987; 33:381-390.
- 18 Biswas SK, Yokoyama K, Wang L, Nishimura K, Miyaji M. Identification of *Candida dubliniensis* based on the specific amplification of mitochondrial cytochrome b gene. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi 2001; 42(2):95-98.
- 19 Borg M, Ruchel R. Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida* spp. during experimental infection of oral mucosa. Infect Immun 1988; 56(3):626-631.
- 20 Borg M, Watters D, Reich B, Ruchel R. Production and characterization of monoclonal antibodies against secretory proteinase of *Candida albicans* CBS 2730. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A] 1988; 268(1):62-73.
- 21 Budtz-Jørgensen E. Histopathology, immunology, and serology of oral yeast infections. Diagnosis of oral candidosis. Acta Odontol Scand 1990; 48(1):37-43.
- 22 Budtz-Jørgensen E, Stenderup A, Grabowski M. An epidemiologic study of yeasts in elderly denture wearers. Community Dent Oral Epidemiol 1975; 3(3):115-119.
- 23 Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends Microbiol 2001; 9(7):327-335.
- 24 Cantorna MT, Balish E. Role of CD4⁺ lymphocytes in resistance to mucosal candidiasis. Infect Immun 1991; 59(7):2447-2455.
- 25 Cassone A, Chiani P, Quinti I, Torosantucci A. Possible participation of polymorphonuclear cells stimulated by microbial immunomodulators in the dysregulated cytokine patterns of AIDS patients. J Leukoc Biol 1997; 62(1):60-66.
- 26 Cassone A, de Bernardis F, Torosantucci A, Tacconelli E, Tumbarello M,

- Cauda R. In vitro and in vivo anticandidal activity of human immunodeficiency virus protease inhibitors. *J Infect Dis* 1999; 180(2):448-453.
- 27 CDC. Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR* 1993; 41:1-19.
 - 28 Chavanet P, Lopez J, Grappin M, Bonnin A, Duong M, Waldner A et al. Cross-sectional study of the susceptibility of *Candida* isolates to antifungal drugs and in vitro-in vivo correlation in HIV-infected patients. *AIDS* 1994; 8(7):945-950.
 - 29 Chryssanthou E. Trends in Antifungal Susceptibility among Swedish *Candida* Species Bloodstream Isolates from 1994 to 1998: Comparison of the E-test and the Sensititre YeastOne Colorimetric Antifungal Panel with the NCCLS M27-A Reference Method. *J Clin Microbiol* 2001; 39(11):4181-4183.
 - 30 Coleman D, Sullivan D, Harrington B, Haynes K, Henman M, Shanley D et al. Molecular and phenotypic analysis of *Candida dubliniensis*: a recently identified species linked with oral candidosis in HIV-infected and AIDS patients. *Oral Dis* 1997; 3 Suppl 1:S96-101.
 - 31 Coleman DC, Bennett DE, Sullivan DJ, Gallagher PJ, Henman MC, Shanley DB et al. Oral *Candida* in HIV infection and AIDS: new perspectives/new approaches. *Crit Rev Microbiol* 1993; 19(2):61-82.
 - 32 Colombo AL, Nucci M, Salomao R, Branchini ML, Richtmann R, Derossi A et al. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 34(4):281-286.
 - 33 Costa LJ, Birman EG, Alves SH, Cury AE. Antifungal susceptibility of *C. albicans* isolated from oral mucosa of patients with cancer. *Revista de Odontologia da USP* 1999; 13(3):233-238.
 - 34 Costa LJ, Cury AE, Birman EG. Antifungal susceptibility of oral strains of *Candida albicans* from AIDS patients. *Revista de Pós Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo* 2000; 7(2):155-158.
 - 35 Cuenca-Estrella M, Diaz-Guerra TM, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL. Influence of glucose supplementation and inoculum size on growth kinetics and antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. *J Clin Microbiol* 2001; 39(2):525-532.
 - 36 Cumming CG, Wight C, Blackwell CL, Wray D. Denture stomatitis in the elderly. *Oral Microbiol Immunol* 1990; 5(2):82-85.

- 37 de Bernardis F, Chiani P, Ciccozzi M, Pellegrini G, Ceddia T, D'Offizzi G et al. Elevated aspartic proteinase secretion and experimental pathogenicity of *Candida albicans* isolates from oral cavities of subjects infected with human immunodeficiency virus. *Infect Immun* 1996; 64(2):466-471.
- 38 Derouin F, Santillana-Hayat M. Anti-toxoplasma activities of antiretroviral drugs and interactions with pyrimethamine and sulfadiazine in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(9):2575-2577.
- 39 Diz P, Ocampo A, Iglesias I, Otero I. Lack of ritonavir antifungal effect in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(4):997.
- 40 Dronda F, Alonso-Sanz M, Laguna F, Chaves F, Martinez-Suarez JV, Rodriguez-Tudela JL et al. Mixed oropharyngeal candidiasis due to *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* strains in HIV-infected patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15(6):446-452.
- 41 Druetta A, Freydiere A, Guinet R, Gille Y. Evaluation of five commercial antifungal susceptibility testing systems. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12(5):336-342.
- 42 Egusa H, Ellepola AN, Nikawa H, Hamada T, Samaranayake LP. Exposure to subtherapeutic concentrations of polyene antifungals suppresses the adherence of *Candida* species to denture acrylic. *Chemotherapy* 2000; 46(4):267-274.
- 43 El-Tahawy ATA, Ragga MFK. *Rhodotorula rubra* fungemia in an immunocompromised patient. *Annals of Saudi Medicine* 1999; 19:1-3.
- 44 Favel A, Michel-Nguyen A, Chastin C, Trousson F, Penaud A, Regli P. *In-vitro susceptibility pattern of Candida lusitaniae* and evaluation of the Etest method. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39(5):591-596.
- 45 Favel A, Peyron F, De Meo M, Michel-Nguyen A, Carriere J, Chastin C et al. Amphotericin B susceptibility testing of *Candida lusitaniae* isolates by flow cytometry: comparison with the Etest and the NCCLS broth macrodilution method. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43(2):227-232.
- 46 Fenn JP, Segal H, Barland B, Denton D, Whisenant J, Chun H et al. Comparison of updated Vitek Yeast Biochemical Card and API 20C yeast identification systems. *J Clin Microbiol* 1994; 32(5):1184-1187.
- 47 Fidel PL, Jr., Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(1):80-96.
- 48 Fotos PG, Hellstein JW. *Candida* and candidosis. Epidemiology, diagnosis and therapeutic management. *Dent Clin North Am* 1992; 36(4):857-878.

- 49 Fotos PG, Hellstein JW, Vincent SD. Oral candidosis revisited. *Gen Dent* 1991; 39(6):422-430.
- 50 Franker CK, Lucartorto FM, Johnson BS, Jacobson JJ. Characterization of the mycoflora from oral mucosal surfaces of some HIV-infected patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990; 69(6):683-687.
- 51 Freydiere AM, Odds FC. Commercial kits for yeast identification: concerns for standardisation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20(5):366-367.
- 52 Fryberg M, Oehlschlager AC, Unrau AM. Sterol biosynthesis in antibiotic-resistant yeast: nystatin. *Arch Biochem Biophys* 1974; 160(1):83-89.
- 53 Fukushima K, Takeo K, Takizawa K, Nishimura K, Miyaji M. Reevaluation of the teleomorph of the genus *Histoplasma* by ubiquinone systems. *Mycopathologia* 1991; 116(3):151-154.
- 54 Fukushima K, Takizawa K, Okada K, Maebayashi Y, Nishimura K, Miyaji M. Suitability of sterilization methods for Ubiquinone analysis of pathogenic fungi. *Trans Mycol Soc Japan* 1993a; 34:473-480.
- 55 Fukushima K, Takizawa K, Okada K, Maebayashi Y, Nishimura K, Miyaji M et al. Ubiquinone systems of *Coccidioides immitis*, the causative agent of coccidioidomycosis. *FEMS Microbiol Lett* 1993b; 108(2):243-245.
- 56 Ghannoum MA, Elewski B. Successful treatment of fluconazole-resistant oropharyngeal candidiasis by a combination of fluconazole and terbinafine. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6(6):921-923.
- 57 Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(4):501-517.
- 58 Graybill JR. Changing strategies for treatment of systemic mycoses. *Braz J Infect Dis* 2000; 4(2):47-54.
- 59 Greenspan D. Treatment of oral candidiasis in HIV infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 78(2):211-215.
- 60 Groll AH, Walsh TJ. Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7 Suppl 2:8-24.
- 61 Gruber A, Lukasser-Vogl E, Borg-von Zepelin M, Dierich MP, Wurzner R. Human immunodeficiency virus type 1 gp160 and gp41 binding to *Candida albicans* selectively enhances candidal virulence in vitro. *J Infect Dis* 1998; 177(4):1057-1063.

- 62 Gyaurgieva OH, Bogomolova TS, Gorshkova GI. Meningitis caused by *Rhodotorula rubra* in an HIV-infected patient. J Med Vet Mycol 1996; 34(5):357-359.
- 63 Hauman CH, Thompson IO, Theunissen F, Wolfaardt P. Oral carriage of *Candida* in healthy and HIV-seropositive persons. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1993; 76(5):570-572.
- 64 Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. Clin Microbiol Rev 1995; 8(4):462-478.
- 65 Heelan JS, Siliezar D, Coon K. Comparison of rapid testing methods for enzyme production with the germ tube method for presumptive identification of *Candida albicans*. J Clin Microbiol 1996; 34(11):2847-2849.
- 66 Heelan JS, Sotomayor E, Coon K, D'Arezzo JB. Comparison of the rapid yeast plus panel with the API20C yeast system for identification of clinically significant isolates of *Candida* species. J Clin Microbiol 1998; 36(5):1443-1445.
- 67 Heidenreich F, Dierich MP. *Candida albicans* and *Candida stellatoidea*, in contrast to other *Candida* species, bind iC3b and C3d but not C3b. Infect Immun 1985; 50(2):598-600.
- 68 Hoegl L, Korting HC, Klebe G. Inhibitors of aspartic proteases in human diseases: molecular modeling comes of age. Pharmazie 1999; 54(5):319-329.
- 69 Hoegl L, Thoma-Greber E, Rocken M, Korting HC. HIV protease inhibitors influence the prevalence of oral candidosis in HIV-infected patients: a 2-year study. Mycoses 1998a; 41(7-8):321-325.
- 70 Hoegl L, Thoma-Greber E, Rocken M, Korting HC. Persistent oral candidosis by non-albicans *Candida* strains including *Candida glabrata* in a human immunodeficiency virus-infected patient observed over a period of 6 years. Mycoses 1998b; 41(7-8):335-338.
- 71 Holt RJ. Progress in antimycotic chemotherapy 1945-1980. Infection 1980; 8 Suppl 3:S-7.
- 72 Iida Y, Oh KB, Saito M, Matsuoka H, Kurata H, Natsume M et al. Detection of antifungal activity in *Anemarrhena asphodeloides* by sensitive BCT method and isolation of its active compound. J Agric Food Chem 1999a; 47(2):584-587.
- 73 Iida Y, Yonemura H, Oh KB, Saito M, Matsuoka H. Sensitive screening of antifungal compounds from acetone extracts of medicinal plants with a Bio-Cell Tracer. Yakugaku Zasshi 1999b; 119(12):964-971.

- 74 Ishigaki S, Kawakami S, Ono Y, Miyazawa Y. Evaluation of a new method for antifungal drugs susceptibility testing to yeasts. *Kansenshogaku Zasshi* 2000; 74(3):221-230.
- 75 Jorge AO, Totti MA, de Almeida OP, Scully C. Effect of sialoadenectomy on the carriage of *Candida albicans* in the mouths of rats. *J Oral Pathol Med* 1993; 22(3):138-140.
- 76 Kellogg JA, Bankert DA, Chaturvedi V. Variation in Microbial Identification System accuracy for yeast identification depending on commercial source of Sabouraud dextrose agar. *J Clin Microbiol* 1999; 37(6):2080-2083.
- 77 Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE, Loeffler J, Einsele H. Resistance to fluconazole and amphotericin in *Candida albicans* from AIDS patients. *Lancet* 1996; 348(9040):1523-1524.
- 78 Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE, Manning NJ, Loeffler J, Hebart H et al. Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol delta5,6-desaturation. *FEBS Lett* 1997; 400(1):80-82.
- 79 Kiraz N, Gulbas Z, Akgun Y. Case report. *Rhodotorula rubra* fungaemia due to use of indwelling venous catheters. *Mycoses* 2000; 43(5):209-210.
- 80 Korting HC, Schaller M, Eder G, Hamm G, Bohmer U, Hube B. Effects of the human immunodeficiency virus (HIV) proteinase inhibitors saquinavir and indinavir on in vitro activities of secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* isolates from HIV-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(8):2038-2042.
- 81 Kovacicova G, Lovaszova M, Hanzen J, Roidova A, Mateicka F, Lesay M et al. Persistent fungemia—risk factors and outcome in 40 episodes. *J Chemother* 2001; 13(4):429-433.
- 82 Kreher JM, Graser GN, Handelman SL, Eisenberg AD. Oral yeasts, mucosal health, and drug use in an elderly denture-wearing population. *Spec Care Dentist* 1991; 11(6):222-226.
- 83 Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J Clin Microbiol* 1997; 35(5):1216-1223.
- 84 Lamb DC, Kelly DE, Manning NJ, Kelly SL. Reduced intracellular accumulation of azole antifungal results in resistance in *Candida albicans* isolate NCPF 3363. *FEMS Microbiol Lett* 1997; 147(2):189-193.

- 85 Land GA, Harrison BA, Hulme KL, Cooper BH, Byrd JC. Evaluation of the new API 20C strip for yeast identification against a conventional method. J Clin Microbiol 1979; 10(3):357-364.
- 86 Law D, Moore CB, Wardle HM, Ganguli LA, Keaney MG, Denning DW. High prevalence of antifungal resistance in *Candida* spp. from patients with AIDS. J Antimicrob Chemother 1994; 34(5):659-668.
- 87 Leigh JE, Barousse M, Swoboda RK, Myers T, Hager S, Wolf NA et al. *Candida*-specific systemic cell-mediated immune reactivities in human immunodeficiency virus-positive persons with mucosal candidiasis. J Infect Dis 2001; 183(2):277-285.
- 88 Levin AS, Costa SF, Mussi NS, Basso M, Sinto SI, Machado C et al. *Candida parapsilosis* fungemia associated with implantable and semi-implantable central venous catheters and the hands of healthcare workers. Diagn Microbiol Infect Dis 1998; 30(4):243-249.
- 89 Lima OC, Silveira FRX, Birman EG. Manifestações bucais de origem infecciosa em pacientes HIV positivos ou com AIDS - Doenças Fúngicas. Revista da Associação Brasileira de Odontologia 1995; 2(1):28-32.
- 90 Martins MD, Rex JH. Resistance to antifungal agents in the critical care setting: problems and perspectives. New Horiz 1996; 4(3):338-344.
- 91 Mary C, Blancard A, Quilici M. Carbon assimilation tests: substrates assimilation profiles. Mycopathologia 1988; 102(1):3-8.
- 92 McMullan-Vogel CG, Jude HD, Ollert MW, Vogel CW. Serotype distribution and secretory acid proteinase activity of *Candida albicans* isolated from the oral mucosa of patients with denture stomatitis. Oral Microbiol Immunol 1999; 14(3):183-189.
- 93 Melo NR. Identificação e quantificação de *Candida* sp em saliva total de pacientes HIV +, estudo longitudinal. Tese de Mestrado. FOP/UNICAMP, 1999.
- 94 Metzger S, Hofmann H. Fluconazole-resistant *Candida* species from HIV infected patients with recurrent *Candida* stomatitis: cross resistance to itraconazole and ketoconazole. Mycoses 1997; 40 Suppl 1:56-63.
- 95 Milan EP, Burattini MN, Kallas EG, Fischmann O, Costa PR, Colombo AL. Azole resistance among oral *Candida* species isolates from AIDS patients under ketoconazole exposure. Diagn Microbiol Infect Dis 1998; 32(3):211-216.

- 96 Milan EP, Malheiros ES, Fischman O, Colombo AL. Evaluation of the AUXACOLOR system for the identification of clinical yeast isolates. *Mycopathologia* 1997; 137(3):153-157.
- 97 Millon L, Manteaux A, Reboux G, Drobacheff C, Monod M, Barale T et al. Fluconazole-resistant recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: persistence of *Candida albicans* strains with the same genotype. *J Clin Microbiol* 1994; 32(4):1115-1118.
- 98 Molnar O, Prillinger H, Lopandic K, Weigang F, Staudacher E. Analysis of coenzyme Q systems, monosaccharide patterns of purified cell walls, and RAPD-PCR patterns in the genus *Kluyveromyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1996; 70(1):67-78.
- 99 Montrocher R, Billon-Grand G, Claisse M. Biochemical analysis in the yeast genus *Candida*. *Yeast* 1989; 5 Spec No:S385-S386.
- 100 NCCLS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; document M27-A. 1997. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- 101 Nguyen MH, Peacock JE, Jr., Morris AJ, Tanner DC, Nguyen ML, Snyderman DR et al. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am J Med* 1996a; 100(6):617-623.
- 102 Nguyen MT, Weiss PJ, LaBarre RC, Miller LK, Oldfield EC, Wallace MR. Orally administered amphotericin B in the treatment of oral candidiasis in HIV-infected patients caused by azole-resistant *Candida albicans*. *AIDS* 1996b; 10(14):1745-1747.
- 103 Nho S, Anderson MJ, Moore CB, Denning DW. Species differentiation by internally transcribed spacer PCR and HhaI digestion of fluconazole-resistant *Candida krusei*, *Candida inconspicua*, and *Candida norvegensis* strains. *J Clin Microbiol* 1997; 35(4):1036-1039.
- 104 Odds FC. Quantitative microculture system with standardized inocula for strain typing, susceptibility testing, and other physiologic measurements with *Candida albicans* and other yeasts. *J Clin Microbiol* 1991; 29(12):2735-2740.
- 105 Odds FC. Changes in epidemiology of opportunistic infections due to *Candida*. *Rev Clin Esp* 1995; 195 Suppl 3:1-3.
- 106 Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1994; 32(8):1923-1929.

- 107 Odds FC, Cheesman SL, Abbott AB. Suppression of ATP in *Candida albicans* by imidazole and derivative antifungal agents. *Sabouraudia* 1985; 23(6):415-424.
- 108 Odds FC, Davidson A. "Room temperature" use of CHROMagar *Candida*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 38(3):147-150.
- 109 Odland BA, Erwin ME, Jones RN. Quality control guidelines for disk diffusion and broth microdilution antimicrobial susceptibility tests with seven drugs for veterinary applications. *J Clin Microbiol* 2000; 38(1):453-455.
- 110 Oh KB, Shirogane H, Matsuoka H, Niitsu A, Yamada S, Kurata H et al. Evaluation of antifungal activity of an antifungal drug by in vitro simulation of in vivo pharmacokinetics of the drug against fungal hyphal growth. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 1998; 39(3):173-178.
- 111 Ollert MW, Wende C, Gorlich M, McMullan-Vogel CG, Borg-von Zepelin M, Vogel CW et al. Increased expression of *Candida albicans* secretory proteinase, a putative virulence factor, in isolates from human immunodeficiency virus-positive patients. *J Clin Microbiol* 1995; 33(10):2543-2549.
- 112 Orozco AS, Higginbotham LM, Hitchcock CA, Parkinson T, Falconer D, Ibrahim AS et al. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42(10):2645-2649.
- 113 Papadogeorgakis H, Frangoulis E, Papaefstathiou C, Katsambas A. *Rhodotorula rubra* fungaemia in an immunosuppressed patient. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1999; 12(2):169-170.
- 114 Pereiro M, Jr., Losada A, Toribio J. Adherence of *Candida albicans* strains isolated from AIDS patients. Comparison with pathogenic yeasts isolated from patients without HIV infection. *Br J Dermatol* 1997; 137(1):76-80.
- 115 Perry JL, Miller GR. Umbelliferyl-labeled galactosaminide as an aid in identification of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1987; 25(12):2424-2425.
- 116 Pfaller M, Riley J. Effects of fluconazole on the sterol and carbohydrate composition of four species of *Candida*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11(2):152-156.
- 117 Pfaller MA. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clin Infect Dis* 1996; 22 Suppl 2:S89-S94.
- 118 Pfaller MA. Antifungal susceptibility testing: progress and future developments. *Braz J Infect Dis* 2000; 4(2):55-60.

- 119 Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. J Clin Microbiol 1996; 34(1):58-61.
- 120 Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Hollis RJ, Messer SA. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY Program. The SENTRY Participant Group. J Clin Microbiol 1998a; 36(7):1886-1889.
- 121 Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, Edmond MB, Wenzel RP. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. Diagn Microbiol Infect Dis 1998b; 31(1):327-332.
- 122 Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, Edmond MB, Wenzel RP. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to species of *Candida* other than *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. SCOPE Participant Group. Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic. Diagn Microbiol Infect Dis 1998c; 30(2):121-129.
- 123 Pfaller MA, Messer SA, Coffman S. In vitro susceptibilities of clinical yeast isolates to a new echinocandin derivative, LY303366, and other antifungal agents. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41(4):763-766.
- 124 Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN, Doern GV, Brandt ME et al. In vitro susceptibilities of *Candida* bloodstream isolates to the new triazole antifungal agents BMS-207147, Sch 56592, and voriconazole. Antimicrob Agents Chemother 1998d; 42(12):3242-3244.
- 125 Pfaller MA, Messer SA, Houston A, Rangel-Frausto MS, Wiblin T, Blumberg HM et al. National epidemiology of mycoses survey: a multicenter study of strain variation and antifungal susceptibility among isolates of *Candida* species. Diagn Microbiol Infect Dis 1998e; 31(1):289-296.
- 126 Pfaller MA, Messer SA, Mills K, Bolmstrom A, Jones RN. Evaluation of Etest Method for Determining Caspofungin (MK-0991) Susceptibilities of 726 Clinical Isolates of *Candida* Species. J Clin Microbiol 2001a; 39(12):4387-4389.
- 127 Pfaller MA, Messer SA, Mills K, Bolmstrom A, Jones RN. Evaluation of Etest Method for Determining Posaconazole MICs for 314 Clinical Isolates of *Candida* Species. J Clin Microbiol 2001b; 39(11):3952-3954.

- 128 Piero TG, Falco F, Sarrecchia C, Sordillo P, Bontempo G, Andreoni M. Two-year surveillance on fluconazole susceptibility of *Candida* spp isolates in a general and university hospital in Rome. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; 41(1-2):23-27.
- 129 Pietrella D, Monari C, Retini C, Palazzetti B, Bistoni F, Vecchiarelli A. Human immunodeficiency virus type 1 envelope protein gp120 impairs intracellular antifungal mechanisms in human monocytes. *J Infect Dis* 1998; 177(2):347-354.
- 130 Poulain D, Tronchin G, Vernes A, Popeye R, Biguet J. Antigenic variations of *Candida albicans* in vivo and in vitro—relationships between P antigens and serotypes. *Sabouraudia* 1983; 21(2):99-112.
- 131 Powderly WG, Robinson K, Keath EJ. Molecular epidemiology of recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: evidence for two patterns of recurrence. *J Infect Dis* 1993; 168(2):463-466.
- 132 Prasad KN, Agarwal J, Dixit AK, Tiwari DP, Dhole TN, Ayyagari A. Role of yeasts as nosocomial pathogens & their susceptibility to fluconazole & amphotericin B. *Indian J Med Res* 1999; 110:11-17.
- 133 Ray TL, Payne CD. Scanning electron microscopy of epidermal adherence and cavitation in murine candidiasis: a role for *Candida* acid proteinase. *Infect Immun* 1988; 56(8):1942-1949.
- 134 Redding SW, Kirkpatrick WR, Dib O, Fothergill AW, Rinaldi MG, Patterson TF. The epidemiology of non-albicans *Candida* in oropharyngeal candidiasis in HIV patients. *Spec Care Dentist* 2000; 20(5):178-181.
- 135 Reiss E, Tanaka K, Bruker G, Chazalet V, Coleman D, Debeaupuis JP et al. Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. *Med Mycol* 1998; 36 Suppl 1:249-257.
- 136 Rex JH, Rinaldi MG, Pfaller MA. Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(1):1-8.
- 137 Reyes G, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility testing of yeasts: uses and limitations. *Drug Resist Updat* 2000; 3(1):14-19.
- 138 Ribeiro MA, Dietze R, Paula CR, da Matta DA, Colombo AL. Susceptibility profile of vaginal yeast isolates from Brazil. *Mycopathologia* 2001; 151(1):5-10.
- 139 Rodero L, Boutureira M, Demkura H, Burkett A, Fernandez C, Losso M et al. Yeast infections: causative agents and their antifungal resistance in hospitalized pediatric patients and HIV-positive adults. *Rev Argent Microbiol* 1997; 29(1):7-15.

- 140 Safdar A, Chaturvedi V, Cross EW, Park S, Bernard EM, Armstrong D et al. Prospective study of *Candida* species in patients at a comprehensive cancer center. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(7):2129-2133.
- 141 Samonis G, Anotoliotaki M, Apostolakou H, Maraki S, Mavroudis D, Georgoulas V. Transient fungemia due to *Rhodotorula rubra* in a cancer patient: case report and review of the literature. *Infection* 2001; 29(3):173-176.
- 142 Sandven P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. *Acta Odontol Scand* 1990; 48(1):27-36.
- 143 Sandven P. Detection of fluconazole-resistant *Candida* strains by a disc diffusion screening test. *J Clin Microbiol* 1999; 37(12):3856-3859.
- 144 Sandven P, Nilsen K, Digranes A, Tjade T, Lassen J. *Candida norvegensis*: a fluconazole-resistant species. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(6):1375-1376.
- 145 Sangeorzan JA, Bradley SF, He X, Zarins LT, Ridenour GL, Tiballi RN et al. Epidemiology of oral candidiasis in HIV-infected patients: colonization, infection, treatment, and emergence of fluconazole resistance. *Am J Med* 1994; 97(4):339-346.
- 146 Sano A, Vilela MM, Takahashi I, Fukushima K, Takizawa K, da Silva MT et al. Isolation of *Candida dubliniensis* from the Oral Cavity of an HIV- positive Child in Brazil. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2000; 41(3):177-181.
- 147 Schauer F, Hanschke R. Taxonomy and ecology of the genus *Candida*. *Mycoses* 1999; 42 Suppl 1:12-21.
- 148 Schoofs AG, Odds FC, Colebunders R, Ieven M, Goossens H. Cross-sectional study of oral *Candida* carriage in a human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive population: predisposing factors, epidemiology and antifungal susceptibility. *Mycoses* 1998; 41(5-6):203-211.
- 149 Schuffenecker I, Freydiere A, de Montclos H, Gille Y. Evaluation of four commercial systems for identification of medically important yeasts. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12(4):255-260.
- 150 Silva MRR, Melo TA, Paula CR. Resistance profile of yeast from AIDS patients with oropharyngeal candidiasis (E-test method). <http://www.hivdent.org/oralm/selectedabs031999.htm> . 1999.
- 151 Slutsky B, Buffo J, Soll DR. High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. *Science* 1985; 230(4726):666-669.

- 152 Sobel JD, Ohmit SE, Schuman P, Klein RS, Mayer K, Duerr A et al. The evolution of *Candida* species and fluconazole susceptibility among oral and vaginal isolates recovered from human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and at-risk HIV-seronegative women. *J Infect Dis* 2001; 183(2):286-293.
- 153 Sobel JD, Ohmit SE, Schuman P, Klein RS, Mayer K, Duerr A et al. The Evolution of *Candida* Species and Fluconazole Susceptibility among Oral and Vaginal Isolates Recovered from Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Seropositive and At-Risk HIV-Seronegative Women. *J Infect Dis* 2000; 183(2):286-293.
- 154 Stevens DA, Stevens JA. Cross-resistance phenotypes of fluconazole-resistant *Candida* species: results with 655 clinical isolates with different methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996; 26(3-4):145-148.
- 155 Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: an emerging opportunistic pathogen. *Curr Top Med Mycol* 1997; 8(1-2):15-25.
- 156 Sullivan DJ, Henman MC, Moran GP, O'Neill LC, Bennett DE, Shanley DB et al. Molecular genetic approaches to identification, epidemiology and taxonomy of non-*albicans* *Candida* species. *J Med Microbiol* 1996; 44(6):399-408.
- 157 Sullivan DJ, Westemeng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* 1995; 141 (Pt 7):1507-1521.
- 158 Taguchi H, Myiaji M, Nishimura K, Min-Li X. Studies on the synergistic effect of amphotericin B and 5-fluorocytosine on the growth of single hyphae of *A. fumigatus* a biocell-tracer system. *Mycoscience* 1995; 36:341-343.
- 159 Taguchi M, Tsukiji M, Tsuchiya T. Rapid identification of yeasts by serological methods: a combined serological and biological method. *Sabouraudia* 1979; 17(3):185-191.
- 160 Torssander J, Chryssanthou E, Petrini B. Increased prevalence of oral *Candida albicans* serotype B in homosexual men: a comparative and longitudinal study in HIV-infected and HIV-negative patients. *Mycoses* 1996; 39(9-10):353-356.
- 161 Tresoldi AT, Branchini ML, Moreira Filho Dd, Padoveze MC, Dantas SP, Reginato L et al. Relative frequency of nosocomial microorganisms at UNICAMP University Hospital from 1987 to 1994. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1997; 39(6):333-336.

- 162 Tsuchiya T, Tsuchiya M. Serological characterization. *Methods Microbiol* 1980; 16:26-75.
- 163 Tudela P, Rego MJ, Tor J, Estrada O, Modol JM, Sahuquillo JC. Analysis of internal notices to the emergency team of the medical area at a general hospital. *Med Clin (Barc)* 2000; 114(19):730-731.
- 164 Ueta E, Tanida T, Yoneda K, Yamamoto T, Osaki T. Increase of *Candida* cell virulence by anticancer drugs and irradiation. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16(4):243-249.
- 165 Vanden Bossche H, Dromer F, Improvisi I, Lozano-Chiu M, Rex JH, Sanglard D. Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. *Med Mycol* 1998; 36 Suppl 1:119-128.
- 166 Vartivarian SE. Virulence properties and nonimmune pathogenetic mechanisms of fungi. *Clin Infect Dis* 1992; 14 Suppl 1:S30-S36.
- 167 Velegraki A, Logotheti M. Presumptive identification of an emerging yeast pathogen: *Candida dubliniensis* (sp. nov.) reduces 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998; 20(3):239-241.
- 168 Wadlin JK, Hanko G, Stewart R, Pape J, Nachamkin I. Comparison of three commercial systems for identification of yeasts commonly isolated in the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 1999; 37(6):1967-1970.
- 169 Walsh TJ, Groll AH. Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. *Transpl Infect Dis* 1999; 1(4):247-261.
- 170 Warnock DW. Fungal infections in neutropenia: current problems and chemotherapeutic control. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41 Suppl D:95-105.
- 171 Warnock DW, Johnson EM, Rogers TR. Multi-centre evaluation of the Etest method for antifungal drug susceptibility testing of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. BSAC Working Party on Antifungal Chemotherapy. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42(3):321-331.
- 172 Williamson MI, Samaranayake LP, MacFarlane TW. A new simple method for biotyping *Candida albicans*. *Microbios* 1987; 51(208-209):159-167.
- 173 Willinger B, Apfalter P, Hirschl AM, Makristathis A, Rotter M, Seibold M. Susceptibility testing of *Candida* species: comparison of NCCLS microdilution method with Fungitest. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 38(1):11-15.
- 174 Willinger B, Manafi M. Evaluation of a new chromogenic agar medium for the identification of urinary tract pathogens. *Lett Appl Microbiol* 1995; 20(5):300-302.

- 175 Willinger B, Manafi M. Evaluation of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida* species. *Mycoses* 1999; 42(1-2):61-65.
- 176 Woods J. *Candida albicans* and others species and candidiasis. <http://www.medmicro.wisc.edu/Undergraduate/Candida.pdf> . 27-3-2001.
- 177 Wu S, Guo N, Hou Y. Effects of systemic fluconazole therapy on in vitro adhesion of *Candida albicans* to buccal epithelial cells and changes of the cell surface proteins of the epithelial cells. *Chin Med Sci J* 1996; 11(1):45-48.
- 178 Wurznier R, Gruber A, Stoiber H, Spruth M, Chen YH, Lukasser-Vogl E et al. Human immunodeficiency virus type 1 gp41 binds to *Candida albicans* via complement C3-like regions. *J Infect Dis* 1997; 176(2):492-498.
- 179 Yamada Y, Arimoto M, Kondo K. Coenzyme Q system in the classification of some ascosporogenous yeast genera in the families Saccharomycetaceae and Spermophthoraceae. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1977; 43(1):65-71.
- 180 Yokoyama K, Biswas SK, Miyaji M, Nishimura K. Identification and phylogenetic relationship of the most common pathogenic *Candida* species inferred from mitochondrial cytochrome b gene sequences. *J Clin Microbiol* 2000; 38(12):4503-4510.
- 181 Yoon SA, Vazquez JA, Steffan PE, Sobel JD, Akins RA. High-frequency, in vitro reversible switching of *Candida lusitanae* clinical isolates from amphotericin B susceptibility to resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(4):836-845.

ANEXO

Classificação de pacientes infectados pelo HIV, segundo Sistema Revisado de Classificação do CDC de 1993 (CDC 1993):

O Sistema revisado destaca a importância dos estudos de linfócitos CD₄ na avaliação clínica das pessoas infectadas pelo vírus HIV. Baseia-se em três faixas de contagens de CD₄ e três categorias clínicas, que dão origem a uma matriz de nove categorias exclusivas.

	Categoria Clínica		
Categoria de células CD ₄	A	B	C
1. > 500/mm ₃	A ₁	B ₁	C ₁
2. 200-499/mm ₃	A ₂	B ₂	C ₂
3. < 200/ mm ₃	A ₃	B ₃	C ₃

Categoria clínica A

Infecção assintomática por HIV.

Linfadenopatia generalizada persistente

Doença aguda primária por HIV

Categoria clínica B

Sintomáticos, excluindo os transtornos relatados em A ou C.

Os exemplos incluem, entre outros:

Angiomatose Bacilar, Candidose vulvovaginal persistente > um mês com pouca resposta ao tratamento, Candidose orofaríngea, Displasia cervical grave ou Carcinoma *in situ*, sintomas constitucionais.

Categoria clínica C

Candidose: esôfago, traquéia e brônquios

Coccidioidomicose extrapulmonar

Câncer cervical invasivo

Criptococose extrapulmonar

Criptosporidiose crônica intestinal (> mês)

Retinite por CMV, ou CMV em lugares diferentes do fígado, baço e gânglios

Encefalopatia por HIV

Herpes simples com úlcera mucocutânea > um mês, bronquite crônica, pneumonia

Histoplasmose: disseminada e extrapulmonar

Isosporíase crônica > um mês

Sarkoma de Kaposi

Linfoma de Burkitt, imunoblástico, cerebral primário

M. avium ou *M. kansasii* extrapulmonar

Pneumonia por *Pneumocystis carinii*

Leucoencefalopatia multifocal progressiva

Bacteremia recorrente por *Salmonella*

Toxoplasmose cerebral

Síndrome consumptiva devido ao HIV