



Universidade Nova de Lisboa

Determinação e comparação de genótipos de *Candida albicans* pelo método de PCR, com base nos polimorfismos da região 25S rDNA e das sequências ALT/RPS

Filipa da Conceição Martins Bento Gomes

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS,
ESPECIALIDADE DE BIOLOGIA MOLECULAR EM MEDICINA TROPICAL E
INTERNACIONAL**

JANEIRO, 2012



INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



Universidade Nova de Lisboa

Determinação e comparação de genótipos de
Candida albicans pelo método de PCR, com base
nos polimorfismos da região 25S rDNA e das
sequências ALT/RPS

Filipa da Conceição Martins Bento Gomes

Orientador: Investigadora Doutora Maria da Luz Martins

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, especialidade de Biologia Molecular em Medicina Tropical e Internacional, realizada sob a orientação científica da Inv.^a Doutora Maria da Luz Martins

JANEIRO, 2012

Agradecimentos

Dedico este campo aos que participaram, de forma directa ou indirecta, e que me acompanharam durante a realização deste trabalho. A todos os que estiveram ao meu lado deixo o meu sincero e puro agradecimento.

À minha orientadora, a *Doutora Maria da Luz Martins*, pela disponibilidade e pelo interesse demonstrado, não só pelo trabalho como pelo meu bem-estar, algo pelo qual estarei eternamente grata. Obrigada pelo apoio, pelo carinho e pela confiança, que depositou em mim ao longo de todo o trabalho.

À *Técnica Ana Paula Maduro*, por todo o acompanhamento, por toda a prontidão em ajudar e por todos os momentos de convívio e de risada.

Aos meus *colegas de trabalho*, do Serviço de Imunohemoterapia do Hospital Nossa Senhora do Rosário, Barreiro, por toda a compreensão, por todo o carinho e pela disponibilidade em cobrir os meus turnos quando tinha que trabalhar na dissertação.

Aos *meus pais* e à minha *irmã Sara*, pelo orgulho e pela confiança que colocaram em mim na realização deste trabalho e pelas palavras de incentivo e de força quando o cansaço vencia.

Por último, quero agradecer aos *meus amigos*, pela ajuda, pelo amor, pelo carinho, pelo aconselhamento e pela força que me deram ao longo deste trabalho.

Muito obrigada a todos.

Resumo

Determinação e comparação de genótipos de *Candida albicans* pelo método de PCR, com base nos polimorfismos da região 25S rDNA e das sequências ALT/RPS

Filipa da Conceição Martins Bento Gomes

PALAVRAS-CHAVE: *Candida albicans*, genotipagem, 25S rDNA, repetições ALT, RPS

As leveduras da espécie *Candida albicans* são comensais do ser humano, podendo em certos casos, como a toma prolongada de antibióticos de largo espectro, a diminuição da imunidade, ou a quimioterapia, causar infecções severas. Estas infecções classificam-se em superficiais ou sistémicas, consoante a zona anatómica ou os órgãos afectados. As infecções hospitalares por fungos, nomeadamente as causadas por *C. albicans*, têm vindo a aumentar nos últimos anos, assim como a mortalidade e a morbilidade associadas, e ainda os custos relacionados com os cuidados de saúde. Torna-se por isso importante a implementação de terapêutica de uma forma rápida, eficaz e correcta. Assim, é imperativo que os laboratórios de microbiologia clínica possuam métodos de diagnóstico rápidos, simples e económicos em relação a uma correcta identificação ao nível de espécie e em relação ao estudo da sensibilidade aos antifúngicos. Contudo, esta identificação ao nível de espécie não permite averiguar a origem das infecções, facto importante para a compreensão da evolução das infecções nosocomiais. Para tal, é necessário realizar um estudo ao nível de estirpe através de métodos moleculares que permitam fazer a distinção acurada entre isolados de *C. albicans*.

Os métodos moleculares têm vindo a desenvolver um papel importante no diagnóstico de infecções: são rápidos, sensíveis, precisos e possuem a vantagem de se poder trabalhar pequenas quantidades de amostra. Têm no entanto a desvantagem de ser métodos caros, por vezes demasiado elaborados para serem instituídos num laboratório de microbiologia clínica com grande volume de amostras diárias.

O principal objectivo deste trabalho consistiu na diferenciação de estirpes de *C. albicans* através de uma metodologia molecular inovadora, nunca antes efectuada no ocidente, simples e rápida, por meio de simples amplificações por PCR. Para tal, foram seleccionados 60 isolados clínicos de leveduras obtidas a partir de amostras clínicas de três localidades: Covilhã (Centro Hospitalar Cova de Beira, E.P.E) Lisboa (Instituto Português de Oncologia e Hospital de Santa Maria, E.P.E) e Viseu (Hospital de São Teotónio).

O trabalho baseou-se na genotipagem de isolados clínicos de *C. albicans* por amplificação por PCR com primers dirigidos às sequências 25S rDNA e às regiões ALT das sequências RPS. Foi possível a sua diferenciação e distinção em estirpes, fazendo deste método um bom recurso para estudos epidemiológicos.

Realizou-se ainda um estudo de sensibilidade *in vitro* das estirpes de *C. albicans* aos antifúngicos Fluconazol e Voriconazol pelo método de difusão em disco, segundo os procedimentos padronizados e publicados pelo CLSI. Através deste estudo foi verificada elevada susceptibilidade aos antifúngicos estudados.

Com este trabalho conclui-se que a diferenciação ao nível de estirpe é muito importante para compreender padrões de surtos de infecções e ainda para averiguar a origem, endógena ou exógena, destas infecções nosocomiais. Como tal, este estudo epidemiológico torna-se essencial para definir um controlo mais rigoroso das infecções.

Abstract

Determination and comparison of genotypes of *Candida albicans* by the PCR method based in polymorphisms of 25S rDNA region and ALT/RPS sequences

Filipa da Conceição Martins Bento Gomes

PALAVRAS-CHAVE: *Candida albicans*, genotyping, 25S rDNA, ALT repeats, RPS

The yeast *Candida albicans* is a commensal of the human being but may, in some cases, such after broad spectrum antibiotic therapy, low immunity or chemotherapy treatments, cause severe infections. These infections are classified as superficial or systemic, depending on the anatomic site or organs affected. Hospital infections by fungi, particularly caused by the yeast *C. albicans*, have increased in recent years, as well as mortality and morbidity, and the costs related to health care. It is therefore important to implement a therapy quickly, efficiently and correctly. Thus, it is imperative that clinical microbiology laboratories have rapid, simple and low cost diagnostic methods, about a correct identification to species level and to the sensitivity study to antifungal drugs. However, this identification to species level does not allow to verify the source of infections, an important fact for understanding the evolution of nosocomial infections. To this end, it is necessary to conduct a study to the strains level by molecular methods through the distinction among isolates of *C. albicans*.

The molecular methods have been developing an important role in the diagnostic of infections: they are fast, sensitive, accurate and have the advantage of to be able to work small amounts of sample. They have however the disadvantage of being expensive methods, sometimes too elaborate to be established on a clinical microbiology laboratory.

The main objective of this study was the differentiation of clinical isolates of *C. albicans* through an innovative molecular approach, never before done in the West, simple, cheap and fast, by simple PCR amplifications. To this end, we selected 60 clinical isolates of yeasts obtained from clinical samples from three locations: Covilhã (Hospital Cova da Beira, EPE) Lisbon (Instituto Português de Oncologia and Hospital de Santa Maria, EPE) and Viseu (Hospital de S. Teotónio). The work was based on strains genotyping of *C. albicans* by PCR amplification with primers directed to 25S rDNA sequences and ALT regions of the RPS sequences. It was possible to distinguish among strains making this method a good resource to epidemiological studies.

We conducted a further study of in vitro sensitivity of the *C. albicans* strains to the antifungals Fluconazole and Voriconazole by the disk diffusion method, according to the standardized and published procedures by CLSI. Through this study we verified high susceptibility to antifungal drugs studied.

This work concludes that the differentiation at the strain level is very important to understand patterns of outbreaks of infections and also to determine the origin, endogenous or exogenous, of these nosocomial infections. As such, this epidemiological study is essential for the definition of a more rigorous infection control.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	3
As leveduras patogénicas do género <i>Candida</i>	4
Passagem de comensal a patogénico.....	4
A patogénese de <i>Candida albicans</i>	7
Morfologia e Ciclo Celular de <i>Candida albicans</i>	8
As Infecções por <i>Candida albicans</i>	10
Agentes Antifúngicos.....	11
Mecanismos de resistência.....	13
Diagnóstico Convencional	14
Determinação da Sensibilidade aos Antifúngicos.....	22
Diagnóstico molecular de <i>Candida albicans</i>	23
Determinação de genótipos de <i>Candida albicans</i>	25
Os genótipos de <i>Candida albicans</i>	27
Determinação dos Genótipos de <i>Candida albicans</i> baseada nas Sequências RPS/ALT	29
Objectivos do Trabalho e Plano da Dissertação.....	32
MATERIAIS E MÉTODOS	34
Origem das estirpes estudadas	35
Identificação das leveduras isoladas de infecções pelos métodos convencionais.....	36
Exame a fresco com Hidróxido de Potássio (KOH).....	36
Isolamento dos produtos biológicos	37

Observação Morfológica dos Isolados	38
Identificação Presuntiva	38
Teste da Filamentação	41
Bichro-Latex <i>Albicans</i> [®]	42
Identificação Bioquímica.....	43
Tipagem de estirpes de <i>Candida albicans</i> pelo método de PCR, com base nos polimorfismos da região 25S rDNA e das sequências ALT/RPS	48
Extracção de DNA de fungos leveduriformes pelo método das microesferas	48
Preparação do DNA para PCR	49
Primers utilizados na reacção de PCR.....	49
Condições para reacção de PCR.....	50
Detecção dos produtos amplificados	51
Estudo da sensibilidade aos antifúngicos, pelo método de difusão em disco Kirby-Bauer	53
Preparação do meio de cultura	53
Preparação do inóculo	53
Inoculação das placas	53
Aplicação dos discos de Fluconazol e de Voriconazol	54
Leitura das placas	54
Interpretação dos resultados	54
Análise estatística	55
RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
Isolados clínicos de <i>Candida albicans</i> de três zonas de Portugal: Covilhã, Lisboa e Viseu	57
Identificação dos isolados pela metodologia convencional	62

Meios Cromogénicos.....	62
Teste da Blastese (ou Teste da Filamentação).....	66
Bichro-Latex Albicans®.....	67
VITEK®.....	68
MicroScan WalkAway®.....	70
Genotipagem de <i>C. albicans</i> por PCR baseado nos polimorfismos da região 25S rDNA e da região ALT/RPS.....	71
Genótipos de <i>C. albicans</i> obtidos por amplificação da região 25S rDNA.....	71
Genotipagem de <i>C. albicans</i> com base nos polimorfismos da região ALT.....	75
Genótipos de <i>C. albicans</i> conjugando os dois métodos.....	82
Teste de Sensibilidade aos Antifúngicos.....	91
 CONCLUSÕES	 97
 BIBLIOGRAFIA	 107
 ANEXO I.....	 120
ANEXO II.....	124
ANEXO III.....	128
ANEXO IV.....	132

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Representação das diferentes morfologias de *C. albicans*: blastoconídio, hifas e pseudohifa. 8
- Figura 2. Esquema representativo dos locais de annealing para: (A) o conjunto de primers P-II , e (B) o set de *primers* AS-I (ASaF13 e AScR135). As setas a branco indicam o sentido *forward* do *primer* e as setas pretas o sentido *reverse* (Hattori *et al.* 2009). 28
- Figura 3. Esquema representativo da MRS e da RPS de *C. albicans* (Chibana & Magee 2009). 30
- Figura 4. (A) Teste da blastese de uma estirpe de *C. albicans*. Observação de tubos germinativos após 2h30m de incubação em soro humano. (B) Teste da blastese de uma estirpe de *Candida* não-*albicans* (incubação >3h). A observação de pseudofilamentos (a) pode levar à identificação de falsos positivos de *C. albicans*. 41
- Figura 5. Identificação de *C. albicans* pelo teste Bichro-Latex Albicans[®]. (A) Reacção positiva identificadora de *C. albicans*. (B) Reacção negativa correspondente a *Candida* não-*albicans*. 43
- Figura 6. (A) Sistema automatizado VITEK[®], bioMerieux utilizado em hospitais para a identificação convencional de microrganismos. (B) Carta contendo os diferentes compostos utilizados na identificação dos microrganismos e sensibilidade aos antibióticos. 43
- Figura 7. Representação do aspecto e da cor característica das colónias de cada espécie, identificadas pelo meio cromogéneo CHROMagar *Candida*.[®] (Frlabo, 2006). 62
- Figura 8. Representação do aspecto e da cor característica das colónias da espécie *C. albicans*, identificadas pelo meio cromogénico CandiSelect[®] 4 (BIO-RAD, 2008). 64

Figura 9. Representação do aspecto e da cor característica das colónias de cada espécie, identificadas pelo meio cromogénio ChromID <i>Candida</i> [®] (Guzel <i>et al.</i> 2011).	65
Figura 10. Padrões electroforéticos obtidos após amplificação por PCR da região 25S do rDNA, com o conjunto de primers P-I. Pertencem ao genótipo do tipo A os isolados C1, C2 e do C4 ao C9, ao genótipo do tipo B o isolado C3, e ao genótipo do tipo C o isolado C10. M, marcador de pesos moleculares.	72
Figura 11. Padrões electroforéticos obtidos após amplificação por PCR do DNA dos isolados clínicos provenientes da Covilhã C1 a C10 com o conjunto de primers P-II para determinação do número de repetições de ALT. A estirpe C1 possui 2/3 repetições ALT, as estirpes C2, C3, C5 e C10 possuem 3 repetições ALT, e as estirpes C4, C6, C7, C8 e C9, 3/4 repetições ALT. M, marcador de pesos moleculares.	76
Figura 12. Padrões electroforéticos obtidos após amplificação por PCR do DNA dos isolados clínicos provenientes da Covilhã C11 a C20 com o conjunto de primers P-II para determinação do número de repetições de ALT. As estirpes C11, C14, C15, C16, C17, C19 e C20 possuem 3 repetições ALT, a estirpe C12, 3/4 repetições ALT, a estirpe C13, 2/3/4 repetições ALT e a estirpe 18, 2/3 repetições ALT. M, marcador de pesos moleculares.	76

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribuição de genótipos A, B, C pelas localidades: Covilhã, Lisboa e Viseu.	73
---	----

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Factores que influenciam a mudança entre os estados leveduriforme e filamentoso (Webster & Weber 2007).....	10
Tabela 2. Resultados do auxanograma e zimograma para diferentes espécies de <i>Candida</i> (Levy, 2004).....	18
Tabela 3. Número de isolados clínicos obtidos a partir das diferentes amostras clínicas enviadas para diagnóstico laboratorial.....	35
Tabela 4. Número de isolados clínicos estudados em relação à localidade de origem e ao sexo dos doentes.	35
Tabela 5. Testes realizados na identificação convencional dos isolados seleccionados para este trabalho, provenientes dos três diferentes locais geográficos.....	36
Tabela 6. Cor desenvolvida e aspecto das leveduras do género <i>Candida</i> crescidas no meio CandiSelect [®] 4 (BIO-RAD, 2008).....	39
Tabela 7. Cor desenvolvida pelas leveduras do género <i>Candida</i> crescidas no meio chromID <i>Candida</i> [®] (Guzel <i>et al.</i> 2011).	39
Tabela 8. Cor desenvolvida pelas leveduras do género <i>Candida</i> crescidas no meio CHROMagar <i>Candida</i> [®] (Barbedo & Sgarb 2010).	40
Tabela 9. Sequência oligonucleotídica dos primers P-I, P-II e AS-I (Hattori <i>et al.</i> 2009).	49
Tabela 10. Mistura reaccional utilizada nas reacções de PCR para a amplificação da região 25S do rDNA e das sequências ALT/RPS de isolados clínicos da espécie <i>C. albicans</i>	50

Tabela 11. Programa de PCR usado na amplificação da subunidade 25S do rDNA dos isolados clínicos da leveduras da espécie <i>C. albicans</i>	50
Tabela 12. Composição do gel de agarose para corrida e visualização dos produtos de amplificação da região 25S do rDNA e da região ALT/RPS dos isolados clínicos da leveduras da espécie <i>C. albicans</i>	51
Tabela 13. Lista dos genótipos e dimensões dos produtos esperados após amplificação por PCR da região 25S do rDNA (Iwata <i>et al.</i> 2006).	52
Tabela 14. Lista dos genótipos obtidos por PCR baseado nas sequências RPS/ALT. A dimensão dos produtos obtidos varia consoante o número de repetições de ALT na sequência RPS (Iwata <i>et al.</i> 2006).	52
Tabela 15. Critérios de interpretação dos halos de inibição e respectivas CMI's para o Fluconazol e o Voriconazol.	55
Tabela 16. Número e percentagem de isolados clínicos obtidos em relação à idade dos doentes da Covilhã, Lisboa e Viseu a partir dos quais foram obtidos.	57
Tabela 17. Número e percentagem de isolados obtidos a partir do sexo masculino e sexo feminino provenientes da Covilhã, de Lisboa e de Viseu.	59
Tabela 18 Número e percentagem de isolados obtidos a partir dos produtos biológicos provenientes da Covilhã, de Lisboa e de Viseu.	60
Tabela 19. Número de genótipos obtidos com os isolados clínicos provenientes da Covilhã, de Lisboa e de Viseu após PCR com o conjunto de primers P-I (CA-INT-L e CA-INT-R).	73

Tabela 20. Comparação entre os resultados obtidos para o conjunto de primers P-I com os isolados estudados neste trabalho provenientes da Covilhã, Lisboa e Viseu e os trabalhos realizados por Hattori <i>et al.</i> (2006) e por Iwata <i>et al.</i> (2006).....	74
Tabela 21. Distribuição de genótipos obtidos para os isolados provenientes da Covilhã, Lisboa e Viseu, com base no número de repetições de ALT obtidos após PCR com o conjunto de primers P-II (ASDcF e pCSCR).....	77
Tabela 22. Comparação entre os genótipos obtidos com base no número de repetições de ALT dos isolados portugueses (Lisboa, Covilhã e Viseu), com resultados de outros trabalhos realizados em outros países.	78
Tabela 23. Conjugação dos genótipos obtidos através da amplificação por PCR com os dois conjuntos de primers P-I e P-II para os isolados provenientes da Covilhã, de Lisboa e de Viseu com um trabalho efectuado na China (She <i>et al.</i> 2008) e dois trabalhos realizados no Japão (Hattori <i>et al.</i> 2006; Iwata <i>et al.</i> 2006). A negrito estão marcados os genótipos mais frequentes em cada país estudado.	83
Tabela 24. Genótipos das estirpes de <i>C. albicans</i> isoladas dos vários produtos biológicos da Covilhã, Lisboa e Viseu (entre parêntesis, o número de isolados clínicos deste trabalho).....	88
Tabela 25. Percentagem de isolados sensíveis e resistentes ao Fluconazol, para todos os isolados das três regiões geográficas estudadas.....	91
Tabela 26. Percentagem de isolados sensíveis e resistentes ao Voriconazol, para todos os isolados das três regiões geográficas estudadas.	93
Tabela 27. Identificação dos diferentes produtos biológicos de acordo com o número de trabalho atribuído no estudo, provenientes da Covilhã e sexo e idade dos doentes.	121

Tabela 28. Identificação dos diferentes produtos biológicos de acordo com o número de trabalho atribuído no estudo provenientes de Lisboa e sexo e idade dos doentes	122
Tabela 29. Identificação dos diferentes produtos biológicos de acordo com o número de trabalho atribuído no estudo, provenientes de Viseu e sexo e idade dos doentes.	123
Tabela 30. Identificação Convencional e Tipagem Molecular das estirpes <i>C. albicans</i> provenientes da Covilhã, isoladas de doentes com infeção fúngica.	125
Tabela 31. Identificação Convencional e Tipagem Molecular das estirpes <i>C. albicans</i> provenientes de Lisboa, isoladas de doentes com infeção fúngica.	126
Tabela 32. Identificação Convencional e Tipagem Molecular das estirpes <i>C. albicans</i> provenientes de Viseu, isoladas de doentes com infeção fúngica.	127
Tabela 33. Resultados do estudo da sensibilidade aos antifúngicos Fluconazol e Voriconazol pelo método de difusão em disco das leveduras provenientes da Covilhã.	129
Tabela 34. Resultados do estudo da sensibilidade aos antifúngicos Fluconazol e Voriconazol pelo método de difusão em disco das leveduras provenientes de Lisboa.	130
Tabela 35. Resultados do estudo da sensibilidade aos antifúngicos Fluconazol e Voriconazol pelo método de difusão em disco das leveduras provenientes de Viseu.	131
Tabela 36. Resultados estatísticos do One-Way ANOVA, para determinação de diferenças na sensibilidade das estirpes mais comuns ao Fluconazol e Voriconazol.	133

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ALS	<i>Agglutinin-like sequence</i>
Ce	Celobiose
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótido-trifosfato
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
E.P.E.	Entidade Pública Empresarial
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
HIV/VIH	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> /Vírus da Imunodeficiência Humana
I	Intermédio
IgA	Imunglobulina A
In	Inositol
Kb	Kilobases
KOH	Hidróxido de Potássio
La	Lactose
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
Ma	Maltose
MLP	<i>Microsatellite Length Polymorphism</i>
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
MRS	<i>Major Repeat Sequence</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
NO ₃	Nitrato
PAS	<i>Periodic Acid Schiff</i>
Pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFGE	<i>Pulse Field Gel Electrophoresis</i>

R	Resistente
Ra	Rafinose
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RPS	<i>Repeated Sequences</i>
RYI	<i>Rapid Yeast Identification</i>
S	Sensível
Sa	Sacarose
SDD	Sensível Dependente da Dose
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
STR	<i>Simple Tandem Repeats</i>
TBE	Tampão Tris, Ácido Bórico e EDTA
Tr	Trealose
UCIP	Unidade de Cuidados Intensivos Polivalente
UV	Luz Ultravioleta
V	Variável
YBC	<i>Yeast Biochemical Card</i>
X	Xilose

INTRODUÇÃO

As leveduras patogénicas do género *Candida*

As leveduras do género *Candida* vivem como comensais no tracto gastrointestinal em 80% da população adulta saudável. No sexo feminino, cerca de 20 a 30% da microbiota vaginal é constituída por este fungo (Barbedo & Sgarb 2010).

Nos últimos anos, a incidência de infecções por fungos tem vindo a aumentar significativamente (Chang *et al.* 2000; Somenzi *et al.* 2007) sendo que, as micoses causadas por leveduras do género *Candida*, as candidoses ou candidíases, têm suscitado grande interesse por possuírem um papel importante não só como agentes causadores de infecções em indivíduos imunocomprometidos (Somenzi *et al.* 2007) como também de infecções nosocomiais (Prescott *et al.* 2002).

Taxonomicamente, as leveduras do género *Candida* pertencem ao Reino *Fungi*, Filo *Ascomycota*, Classe *Hemiascomycetes*, Ordem *Saccharomycetales*, Família *Saccharomycetaceae* (Berkhout, 2002), e compreendem um vasto número de espécies, tais como *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida lusitaniae*, *Candida guilliermondii*, *Candida famata*, *Candida utilis*, *Candida rugosa*, *Candida kefyr*, *Candida inconspícua*, entre outras espécies menos frequentes como agentes patogénicos. Embora muitas espécies possam causar infecções, são as leveduras da espécie *C. albicans* as que possuem maior interesse por estarem associadas a uma ampla variedade e número de patologias humanas (Webster & Weber 2007; Barbedo & Sgarb 2010; Lyon *et al.* 2010). Numerosos estudos demonstram que *C. albicans* é a espécie isolada com maior frequência, contando com 60% dos isolados provenientes de amostras clínicas (Barbedo & Sgarb 2010).

Passagem de comensal a patogénico

C. albicans é uma levedura comensal do organismo humano e é considerada como o fungo causador de infecções oportunistas mais relevante para o ser humano,

sendo responsável tanto por infecções superficiais como sistémicas (Bougnoux *et al.*, 2006; Odds *et al.* 2006; Barbedo & Sgarb 2010).

Geralmente, as mucosas e a pele, são barreiras primárias eficazes contra a infecção por *Candida* sp. Porém, se alguma destas barreiras estiver enfraquecida ou danificada, poderão surgir infecções superficiais na pele, nas mucosas oral, gastrointestinal e vaginal. Habitualmente, em indivíduos imunocompetentes a resposta do sistema imunitário é suficiente para combater as leveduras (Bougnoux *et al.* 2006; Webster & Weber 2007; Barbedo & Sgarb 2010). Esta imunidade provém do comensalismo da levedura na pele e mucosas do hospedeiro e abrange a presença de linfócitos contra os antígenos de *C. albicans* e a presença de anticorpos específicos no sangue e nas mucosas (Costa *et al.* 2008).

As infecções na pele surgem frequentemente após um tratamento antibacteriano, o qual, ao ser dirigido para bactérias patogénicas, actua também nas bactérias comensais da flora que competem com as leveduras igualmente presentes, permitindo a sua proliferação por falta de competidores (Prescott *et al.* 2002; Webster & Weber 2007; Barbedo & Sgarb 2010).

Uma vez que a pele intacta se encontra protegida por células queratinizadas e as mucosas possuem mucinas e IgA, tratamentos como corticoterapia, quimioterapia, cirurgias, cateterismos, sondas e cateteres podem modificar também o equilíbrio destas barreiras naturais, influenciando a invasão por leveduras (Costa *et al.* 2008).

Os macrófagos e os neutrófilos, assim como as células dendríticas, pertencentes à imunidade inata, desempenham um papel fundamental na defesa contra os fungos, nomeadamente contra *C. albicans*. Os macrófagos são usualmente os primeiros a interagir com substâncias estranhas ao organismo e podem produzir citocinas e quimiocinas que recrutam outras células. Os neutrófilos, como células fagocíticas que são, actuam tanto em blastoconídios como em hifas, sendo por isso um dos principais mecanismos de defesa contra candidose invasiva disseminada. As células dendríticas são especializadas na apresentação de antígenos e como tal, têm a capacidade de reconhecer blastoconídios e hifas e desta forma direccionar a resposta imune (Costa *et al.* 2008).

Contudo, *C. albicans* pode disseminar-se facilmente se à fagocitose não se seguir a destruição das células fúngicas (Costa *et al.* 2008). A actividade fagocítica é estimulada por opsoninas e citocinas derivadas das células T e pertencem à imunidade adaptativa celular. Consequentemente, a coordenação entre as imunidades inata e adaptativa proporciona um melhor panorama de combate à infecção por *C. albicans* (Costa *et al.* 2008).

As infecções por *C. albicans* surgem também, claramente, quando existe uma redução ou perda severa das funções das células participantes na resposta imune inata e adaptativa, ou seja, quando o doente entra em fase de imunodepressão (Gillespie & Bamford 2000; Costa *et al.* 2008).

Nestas situações, as leveduras facilmente se multiplicarão e o desenvolvimento de micoses de carácter invasivo é propício uma vez que as leveduras se podem disseminar através da corrente sanguínea, vir a colonizar órgãos e gerar hifas que vão invadir os tecidos (Webster & Weber 2007; Barbedo & Sgarb 2010).

Esta situação é muito frequente em doentes imunocomprometidos hospitalizados como doentes transplantados, doentes sujeitos a quimioterapia, recém-nascidos com baixo peso, idosos, e doentes com HIV, e está associada a uma elevada taxa de mortalidade (Sampaio *et al.* 2005; Bougnoux *et al.* 2006; Barbedo & Sgarb 2010).

A transição de organismo comensal para organismo patogénico requer não só um hospedeiro susceptível, como já foi referido anteriormente, como também um processo de activação, mediado pela expressão génica e regulada pela interacção hospedeiro-organismo (Barbedo & Sgarb 2010).

Os programas transcripcionais associados à transformação do estado leveduriforme em estado filamentosos contribuem igualmente para a invasão no hospedeiro. A hifa é a estrutura que melhor atravessa barreiras devido à sua organização filamentososa com maior capacidade invasiva, enquanto que a levedura é a estrutura perfeita para uma boa disseminação através de fluidos devido à sua morfologia arredondada e unicelular (Barbedo & Sgarb 2010).

A patogénese de *Candida albicans*

A patogenicidade de um organismo depende da manifestação organizada de vários genes bem como de outros factores ligados ao hospedeiro, não existindo, por isso, um factor de virulência dominante (Barbedo & Sgarb 2010).

Actualmente conhece-se a existência de numerosos factores de virulência de *C. albicans*: (i) aderência às células do hospedeiro pelas adesinas, como a família do gene *ALS* (*agglutinin-like sequence*) que codifica diversas glicoproteínas de superfície celular implicadas no processo de adesão; (ii) o dimorfismo fúngico que se manifesta através de diferentes morfologias, tais como levedura, pseudohifa, hifa verdadeira e clamidósporos, (iii) variação fenotípica através do fenómeno de switching; (iv) a capacidade de sobrevivência dentro de células fagocitárias; (v) a modulação do sistema imunitário com uma acção mais intensa em relação aos mananos e manoproteínas que regulam a acção das defesas do hospedeiro, activando-as e desactivando-as; (vi) a adaptação ao ambiente oxidativo determinado pelo genoma de estirpes selvagens de *C. albicans* em que genes são temporariamente induzidos ou reprimidos em função do óxido nítrico; (vii) a captação de ferro a partir da transferrina nas candidoses com disseminação sanguínea; (viii) a capacidade de suportar variações de temperatura e de pH intoleráveis a outros microrganismos patogénicos; (ix) a produção de toxinas; (x) a produção de enzimas hidrolíticas, como as proteinases, que hidrolisam ligações peptídicas e as fosfolipases, que hidrolisam os fosfolípidos do meio ambiente onde a levedura cresce, as quais se localizam na superfície da levedura e na extremidade do tubo germinativo dando origem à acumulação de lisofosfolípidos que, por sua vez, causam danos à célula epitelial (Avrella & Goulart 2008; Barbedo & Sgarb 2010; Benedetti *et al.* 2011).

Contudo, e apesar de todo este conhecimento, a extensão com que os factores de virulência contribuem para a colonização, ou para o processo de doença, ainda não se encontra completamente definida (Barbedo & Sgarb 2010).

Morfologia e Ciclo Celular de *Candida albicans*

A levedura da espécie *C. albicans* é um fungo dimórfico podendo existir no estado leveduriforme ou no estado filamentoso (Webster & Weber 2007).

A fase leveduriforme, unicelular, pode eventualmente gerar uma gémula e formar tubos germinativos, ou hifas verdadeiras (septadas), evoluindo assim para a forma filamentosa (Figura 1). Entre esses dois extremos, de gemulação e de filamentação, o fungo pode ainda manifestar uma variedade de morfologias durante o seu crescimento, formando assim as pseudohifas (não septadas), que são na realidade leveduras alongadas unidas entre si e que correspondem a um estado intermediário entre os dois estados, o leveduriforme e o filamentoso (Webster & Weber 2007; Barbedo & Sgarb 2010).

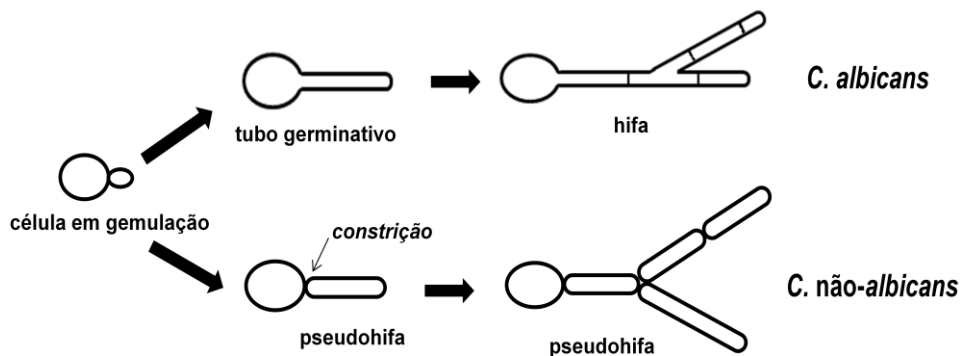


Figura 1. Representação das diferentes morfologias de *C. albicans*: blastoconídio, hifas e pseudohifa.

A hifa que se projecta após o primeiro ciclo celular, antes da formação do septo, denomina-se de tubo germinativo. O termo hifa refere-se aos filamentos que contêm mais de um septo e ausência de constricções. As pseudohifas distinguem-se das hifas verdadeiras pela existência de uma constricção entre a célula mãe e a célula filha, assim como na organização dos seus ciclos celulares. No primeiro ciclo celular da pseudohifa, antes de surgir a gémula, forma-se o anel do septo entre a célula mãe e a célula filha. Ocorre então a mitose e quando este processo se completa, as células separam-se completando-se a formação da parede celular em ambas as células que, exteriormente,

podem permanecer ligadas. Na realidade, o processo de mitose e o processo de formação de pseudohifa não contêm muitas diferenças, à excepção do alongamento e da separação da célula por completo, permitindo a formação do septo, sendo que na pseudohifa as formações do septo e da constricção coincidem no mesmo ponto (Barbedo & Sgarb 2010).

Na formação da hifa verdadeira o tubo germinativo surge no início do ciclo celular, a partir da levedura, havendo formação do primeiro septo no alongamento da gémula e não entre a célula mãe e a célula filha (leveduras) ou entre pseudohifas. Como o núcleo migra para fora da célula mãe, a primeira divisão celular ocorre no prolongamento, formando-se no seu final, o septo no tubo germinativo (Barbedo & Sgarb 2010). Este possui um poro septal que permite o contacto dos protoplasmas entre células adjacentes.

A orientação do tubo germinativo é determinada pelo polarissoma, um complexo de proteínas envolvidas na orientação do crescimento do tubo germinativo e das hifas verdadeiras, bem como pelo *spitzenkorper*, uma estrutura responsável pelo crescimento e desenvolvimento polarizado (Barbedo & Sgarb 2010).

Das hifas e pseudohifas podem igualmente formar-se clamidósporos (Webster & Weber 2007). Os clamidósporos são estruturas de resistência que se formam quando a levedura se encontra num local que carece de algum dos nutrientes essenciais para o seu desenvolvimento. A sua formação sob condições específicas permite fazer a distinção entre *C. albicans* e *C. dubliniensis* (Barbedo & Sgarb 2010).

O dimorfismo é um importante indicador de patogenicidade dos fungos, sendo que o desenvolvimento de hifas está geralmente associado ao estado patogénico, enquanto que a presença de *C. albicans* no seu estado leveduriforme é indicativa de crescimento saprofítico. Enquanto outros fungos dimórficos se encontram na natureza na forma filamentosa e são patogénicos na forma leveduriforme, *C. albicans* comporta-se de forma contrária, apresentado por isso dimorfismo fúngico invertido. A mudança de um estado para outro é reversível e é influenciada pela interacção de vários factores (Tabela 1), tais como a temperatura corporal, o pH, e o equilíbrio nutricional (Webster & Weber 2007; Barbedo & Sgarb 2010).

Tabela 1. Factores que influenciam a mudança entre os estados leveduriforme e filamentoso (Webster & Weber 2007).

Factores que influenciam a mudança entre o estado leveduriforme e filamentoso		Estado
Temperatura	≥ 37° C	Hifa
	< 37° C	Levedura
pH	Neutro	Hifa
	Ácido	Levedura
Nutrição	Carência	Hifa
	Abundância	Levedura

Deste modo, as circunstâncias ambientais que se assemelhem às condições sanguíneas promovem o crescimento de hifas, enquanto que as condições encontradas na pele ou na mucosa gastrointestinal promovem o crescimento de leveduras. As alterações micromorfológicas, pelo contrário, ocorrem em função da expressão genética e influenciam as características macromorfológicas durante o desenvolvimento das colónias em relação à cor, podendo ir do branco ao creme, e em relação ao seu aspecto, que pode ser pastoso, brilhante ou opaco (Webster & Weber 2007; Barbedo & Sgarb 2010).

As Infecções por *Candida albicans*

As infecções por *C. albicans*, também denominadas de candidíases ou candidoses, são classificadas de acordo com o tipo de tecido e órgão afectado: as infecções superficiais em que ocorre invasão da pele, unhas ou mucosas e as infecções sistémicas, ou profundas, que atingem órgãos e diferentes tecidos internos (Somenzi *et al.* 2007).

As leveduras do género *Candida* são o quarto microrganismo mais isolado a partir do sangue de doentes com infecção nosocomial, sendo *C. albicans* a espécie com maior prevalência. Em alguns hospitais, cerca de 10% das infecções nosocomiais são causadas por *C. albicans* e é frequente que estas infecções contribuam para o aumento do tempo de hospitalização, bem como de mortalidade, em número duas a três vezes superior às causadas por infecções bacterianas. Desta forma, a morbidade e

mortalidade associadas às infecções causadas por *C. albicans* constituem não só um problema sério de saúde pública como um problema a nível de despesas para os orçamentos hospitalares (Chang *et al.* 2000; Prescott *et al.* 2002; Shepard *et al.* 2008; Lyon *et al.* 2010).

As infecções nosocomiais podem ser de origem endógena, devido ao fenómeno de translocação recíproca, o qual pode originar polimorfismos genéticos de *C. albicans*. Podem igualmente ser de origem exógena, por transmissão horizontal, devido ao uso de cateteres, soluções glicosiladas e pelas das mãos colonizadas dos profissionais de saúde que prestam cuidados ao doente (Webster & Weber 2007; França *et al.* 2008).

Agentes Antifúngicos

Infelizmente, torna-se complicado tratar este tipo de infecções uma vez que, tanto o ser humano como *Candida albicans* são ambos organismos eucariotas e possuem vias metabólicas muito semelhantes na medida em que são filogeneticamente relativamente próximos e conseqüentemente têm muitas semelhanças metabólicas. Assim, torna-se difícil a definição de alvos para os antifúngicos actuarem de forma a não causarem dano ao hospedeiro. Deste modo, muitos antifúngicos possuem como alvo o ergosterol, apenas existente na membrana dos fungos (Webster & Weber 2007).

Existem várias classes de antifúngicos para o tratamento de micoses invasivas sendo os mais usados os polienos (Anfotericina B e Niasina), os azóis (Miconazol, Cetoconazol, Fluconazol, Voriconazol, Itraconazol), os nucleósidos análogos (5-fluorocitosina), pneumocandinas-equinocandinas, pradimicinas-benanomicinas, nicomicinas, alilaminas e tiocarbamatos. A 5-fluorocitosina inibe a biossíntese de RNA e DNA, porém, a resistência a este composto relaciona-se com uma capacidade, ainda que reduzida, de os fungos metabolizarem a droga. As pneumocandinas e as equinocandinas são antifúngicos constituídos por lipopéptidos cíclicos que actuam na síntese da parede celular pela inibição da enzima 1,3- β -D-glucano sintetase que se encontra ausente nos mamíferos. Posteriormente, anomalias na síntese da parede celular originam zonas de ruptura e a célula fúngica acaba por morrer. As pradimicinas e as benanomicinas ligam-se às manoproteínas da parede celular fúngica alterando o

equilíbrio osmótico e levando à morte celular. As nicomicinas funcionam como inibidores competitivos com enzimas sintetase da quitina, a qual é necessária para a síntese da parede celular. A quitina sintetase catalisa a polimerização da N-acetilglucosamina na formação de quitina. A Terbinafina, derivada da alilamina, actua contra a esceleno epoxidase, uma outra enzima envolvida na biossíntese de ergosterol. Este antifúngico é utilizado em conjunto com outros medicamentos para tratar infecções causadas por estirpes resistentes de *Candida* spp.

O modo de acção dos polienos consiste na associação com o ergosterol levando à formação de poros na membrana plasmática e ao aumento da permeabilidade. Consequentemente, ocorre ruptura da membrana plasmática fúngica resultando no extravasamento dos conteúdos da célula e, consequentemente, na sua morte. A resistência é verificada quando ocorre uma redução do ergosterol na membrana plasmática, ou quando é substituído por uma molécula precursora. A Anfotericina B é o antifúngico mais indicado para tratar infecções invasivas sendo por isso considerado como o *gold standard* uma vez que possui maior actuação em células que contenham ergosterol, como as fúngicas, do que as que possuem colesterol, como as de mamífero. Porém, possui muitos efeitos adversos e a sua toxicidade a nível hepático e renal limita o seu uso (Andriole, 1999; Zardo & Mezzari 2004; Webster & Weber 2007).

Desta forma tornou-se necessário a introdução de antifúngicos azólicos como o Fluconazol e o Voriconazol, que possuem boa biodisponibilidade via oral e baixa incidência de efeitos adversos. Os antifúngicos azólicos inibem a enzima 1,4- α -desmetilase do citocromo P-450, o qual está envolvido na conversão de lanosterol a ergosterol, ou seja, actuam na biossíntese do ergosterol. Isto leva à depleção de ergosterol na membrana celular fúngica (Andriole, 1999; Zardo & Mezzari 2004; Webster & Weber 2007).

O fluconazol é um composto metabolicamente estável, solúvel em água, com baixa ligação às proteínas plasmáticas. Pode ser administrado tanto por via oral como por via intravenosa uma vez que ambas possuem uma farmacocinética semelhante. Os níveis de fluconazol no sangue são equilibrados de forma rápida, sendo a droga bem distribuída pelos tecidos. O fluconazol é um antifúngico de largo espectro e é bem tolerado pelo organismo humano possuindo uma incidência muito baixa de efeitos

secundários. É muito recomendado na terapêutica de candidose orofaríngea, esofágica, vaginal e invasiva. É recomendado também o seu uso como profilaxia em doentes neutropênicos. Porém, algumas das limitações mais relevantes do Fluconazol incluem a sua inactividade contra fungos filamentosos, a resistência intrínseca de *C. krusei*, a resistência adquirida em certas espécies de *Candida*, e a necessidade de ajustes de doses em doentes com deficiência renal e as interferências com outros medicamentos. Como tal, tornou-se necessário desenvolver novas drogas como o voriconazol, um derivado triazólico que possui actividade fungicida de largo espectro contra as espécies de *Candida*, incluindo as estirpes resistentes ao fluconazol (Andriole, 1999; Pelletier *et al.* 2002; Bagg *et al.* 2005; Santos Jr. *et al.* 2005).

O voriconazol é actualmente uma boa escolha para o tratamento de micoses possuindo a mesma actividade, ou até mesmo mais superior, que a Anfotericina B, com a vantagem de não ser tóxico para os rins e o fígado e de poder ser administrado por via oral ou parentérica (Pelletier *et al.* 2002; Bagg *et al.* 2005; Linares *et al.* 2005).

Mecanismos de resistência

A diminuição da susceptibilidade ou a resistência aos antifúngicos tem sido observada cada vez com maior frequência, tanto *in vivo* como *in vitro*. A resistência *in vivo* pode dever-se à imunodepressão do doente ou à interacção entre vários medicamentos, o que faz baixar o nível do fármaco no tecido e no sangue. A resistência *in vitro* pode dever-se a um contacto prévio no hospedeiro das estirpes com o fármaco, estimulando a passagem de estirpes sensíveis a resistentes. A resistência aos antifúngicos depende da interacção entre hospedeiro, fármaco e estirpe. Estudos anteriores demonstram que a resistência ao fluconazol pode ocorrer nas mesmas estirpes que anteriormente lhe eram sensíveis, confirmando o facto de que as estirpes podem sofrer alterações ao longo da exposição do doente aos antifúngicos. Desta forma, tem-se verificado um crescente aumento da resistência aos azóis devido à sua frequente utilização na terapêutica (Zardo & Mezzari 2004).

C. albicans possui vários mecanismos de resistência, sendo o mais comum (verifica-se em 85% dos isolados resistentes) baseado na expulsão activa do antifúngico

por meio de proteínas transportadores ABC. Outro mecanismo de resistência, contra os azóis (65 %) consiste na ocorrência de mutações no alvo, como por exemplo, mudanças no local de ligação entre o fármaco e a enzima 1,4- α -desmetilase. Pensa-se que 75 % de isolados de *C. albicans* possuam estes dois mecanismos de resistência. Um terceiro mecanismo de resistência (verifica-se em 35 % dos isolados resistentes) é a superexpressão do gene ERG11, que leva a uma maior produção de 1,4- α -desmetilase (Webster & Weber 2007; Espinel-Ingroff, 2008).

O tratamento de infecções fúngicas geralmente é feito de forma empírica, sem o diagnóstico específico do fungo causador devido às dificuldades relacionadas com os problemas do diagnóstico e dos testes de susceptibilidade. Há no arsenal terapêutico um número limitado de fármacos antifúngicos em uso, e se se comparar com o número de antibióticos antibacterianos disponíveis, na maioria das vezes, apresentam limitações tanto na eficácia ou na toxicidade do tratamento.

Uma vez que os métodos convencionais tendem a ser tardios na identificação dos fungos que causam as infecções, os médicos em geral optam por terapêuticas antifúngicas de largo espectro no tratamento das hemoculturas positivas, sem que haja conhecimento da identificação da levedura, nem da sua susceptibilidade ou resistência ao medicamento (Shepard *et al.* 2008). Torna-se importante não só a investigação na área da farmacologia, como também a genotipagem correcta das estirpes de *Candida albicans*. Esta diferenciação permitirá averiguar quais as estirpes resistentes e/ou sensíveis a determinados fármacos, e deste modo realizar um estudo aprofundado sobre os mecanismos de resistência, e determinar a incidência de recidivas ou novas infecções.

Diagnóstico Convencional

Com a finalidade de instituir a terapêutica mais adequada e atempada, torna-se imprescindível a utilização de métodos de diagnóstico que sejam rápidos, mas eficazes. Os laboratórios de microbiologia clínica usam com frequência testes fenotípicos, manuais ou automatizados, para identificar a espécie das leveduras isoladas a partir das amostras biológicas provenientes dos doentes com infecção (Shepard *et al.* 2008).

O sucesso do isolamento e da identificação do agente etiológico depende em muito do tipo e da qualidade da amostra biológica. É deveras importante a manutenção da assepsia durante a colheita e o transporte dos produtos, assim como o assegurar de uma quantidade de amostra passível de ser trabalhada. Dependendo da sintomatologia clínica, é estabelecido o procedimento mais adequado para a colheita de cada produto biológico (pele, unhas, exsudado oral, vaginal ou anal, secreções brônquicas, sangue, LCR, urina ou fezes) (Barbedo & Sgarb 2010).

O exame directo é utilizado para todos os produtos biológicos, excepto sangue, e tem como finalidade a observação directa de elementos fúngicos: células leveduriformes (blastoconídios ou blastosporos), hifas e/ou pseudohifas (Barbedo & Sgarb 2010). Em amostras de descamação cutânea, fragmentos de unhas ou tecidos pode utilizar-se KOH 20% que, após a destruição das células do hospedeiro, permite a visualização directa e a fresco, dos elementos fúngicos, sem ser necessário realizar qualquer coloração.

Dependendo do tipo de amostra, podem-se utilizar ainda diferentes tipos de coloração como Gram, Giemsa, PAS (*Periodic Acid Schiff*) ou outras utilizadas para cortes histológicos. A coloração de Gram permite observar bem as mesmas estruturas fúngicas, as quais apresentam coloração roxa, sendo por isso consideradas como Gram positivas (Costa & Candido 2007; Barbedo & Sgarb 2010).

Paralelamente, a inoculação das amostras biológicas em meios de cultura adequados permite o isolamento do agente etiológico para a sua identificação. No caso das hemoculturas o diagnóstico pode mostrar-se desafiante, pois requer métodos automatizados de incubação, como por exemplo o BactAlert[®], e é imprescindível que o tempo de incubação seja superior a 5 dias, caso contrário as leveduras não terão tempo necessário para se desenvolver (França *et al.* 2008). Todas as hemoculturas positivas e os restantes produtos biológicos devem ser semeados em meio de cultura sólido, em tubo ou em placa de Petri. O meio mais utilizado no isolamento primário de *Candida* é o agar de Sabouraud Dextrose contendo cloranfenicol e gentamicina para permitir o crescimento das leveduras e inibir o crescimento de bactérias que, tendo uma taxa de crescimento mais rápida, impediriam o desenvolvimento das colónias fúngicas. Por norma, as culturas em Sabouraud são incubadas a 37°C e a 25°C em aerobiose, durante

24 a 48 horas. Nestas condições as colónias das espécies do género *Candida* tendem a apresentar coloração branca ou creme, com textura homogénea, aspecto cremoso e superfície lisa ou rugosa (Costa & Candido 2007; Barbedo & Sgarb 2010).

Após o crescimento das colónias em meio sólido torna-se necessário realizar a identificação dos isolados. Para a observação da micromorfologia das colónias, utiliza-se por norma azul de lactofenol que permite a visualização directa de diferentes estruturas, sejam elas hifas, pseudohifas ou células leveduriformes isoladas ou em gemulação. Contudo, nem a macromorfologia nem a micromorfologia das colónias são suficientemente diferenciadoras para identificar a espécie a que pertencem. Existem testes rápidos para a identificação presuntiva de *C. albicans*, como a Prova da Filamentação ou Teste da Blastese, o Bichro-Latex *Albicans*[®] (Fumouze) e meios de cultura cromogénicos como chromID *Candida*[®] (bioMérieux), CandiSelect[®] (BIO-RAD) e CHROMagar[®] *Candida* (BD Diagnostic Systems) (Shepard *et al.* 2008).

Na Prova da Filamentação, a presença de tubo germinativo sem a formação de uma constricção entre a célula mãe e o tubo (Figura 1), permite a identificação presuntiva de *C. albicans*. Neste teste, o tempo de incubação é muito importante porque, se forem ultrapassadas as 3 horas, outras espécies de *Candida*, além de *C. albicans*, podem formar pseudofilamentos de tal forma semelhantes a tubos germinativos que podem facilmente induzir a falsos resultados (Barbedo & Sgarb 2010). Contudo, alguns estudos têm demonstrado que 5% de leveduras *C. albicans* não formam tubo germinativo nas condições indicadas para a realização do teste, tornando-se necessária a realização de outros testes de identificação (Trnovsky *et al.* 2008).

O teste Bichro-Latex *Albicans*[®], Fumouze, consiste num teste de aglutinação de partículas de látex sensibilizadas com anticorpos monoclonais específicos para *C. albicans*. Possui a vantagem de ser um método rápido, com aglutinação visível após 5 minutos de agitação orbital, e de poder ser realizado directamente a partir de colónias isoladas. Tem a desvantagem de a positividade não ser exclusiva para *C. albicans*, havendo aglutinação também com *C. dubliniensis* que é geneticamente muito próxima havendo assim, a necessidade de diferenciar as duas espécies (Quindos *et al.* 1997; Fumouze, 2009).

Entre os vários meios cromogénicos disponíveis, que têm como princípio a produção de pigmento durante o desenvolvimento das colónias devido a reacções enzimáticas de hexaminidases específicas de cada espécie com um substrato do meio, o meio de cultura chromID *Candida*[®] constitui uma boa opção para a identificação rápida e directa de *C. albicans*. Contudo, para a identificação de outras espécies, como *C. tropicalis*, esta metodologia não é suficiente sendo necessário a intervenção de outros métodos (Araújo *et al.* 2005; Barbedo & Sgarb 2010; Guzel *et al.* 2011). O meio CHROMagar[®] *Candida* é um meio acessível e confiável na identificação presuntiva das espécies de *Candida* (Costa & Candido 2007). Este meio permite distinguir entre *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* devido às diferentes colorações que as colónias geram. Porém, tal como o chromID *Candida*[®], não consegue distinguir outras espécies sendo necessário a realização de outros testes para a diferenciação ao nível de espécie (Barbedo & Sgarb 2010). O meio CandiSelect[®] é um outro meio cromogénico disponível que permite a identificação directa de *Candida albicans* e a identificação presuntiva de *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* and *Candida krusei*. Porém, tal como o meio chromID *Candida*[®] e o CHROMagar *Candida*[®], apenas permite fazer uma identificação directa de *C. albicans* sendo preciso e realização de outros testes, como provas bioquímicas, para identificar as outras espécies (BIO-RAD, 2008; Sendid *et al.* 2007). As provas bioquímicas englobam vários testes, como o auxanograma, que se baseia na assimilação de compostos, e o zimograma, que se baseia na fermentação de açúcares.

No auxanograma, a levedura é colocada em contacto com diferentes fontes de carbono e de azoto. Após incubação em condições adequadas, se a levedura assimilar, irá crescer de acordo com as exigências metabólicas características da sua espécie, permitindo a sua identificação por visualização de turvação na zona do inóculo ou por processos colorimétricos. Actualmente este processo já se encontra comercializado sob a forma de *kits* API. No zimograma, as leveduras são colocadas em contacto com diferentes fontes de açúcar em tubos contendo meio básico líquido. Após um período de incubação, a fermentação é revelada pela formação e libertação de bolhas de gás. Os resultados do auxanograma e do zimograma para cada isolado clínico são comparados a tabelas existentes na bibliografia, tal como especificado na Tabela 2, e, uma vez que as

diferentes espécies possuem distintos perfis de assimilação e fermentação, é possível fazer a identificação da espécie de cada isolado (Barbedo & Sgarb 2010).

Tabela 2. Resultados do auxanograma e zimograma para diferentes espécies de *Candida* (Levy, 2004).

Levedura	Auxanograma									Zimograma					
	Sa	Ma	La	Ce	Tr	Ra	X	In	NO ₃	Gl	Sa	Ma	La	Ra	Tr
<i>C. albicans</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	V
<i>C. tropicalis</i>	+	+	-	V	+	+	+	-	-	+	V	+	-	-	+
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	-	V	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	V
<i>C. krusei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	V
<i>C. glabrata</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+

Legenda: Sa (sacarose), Ma (maltose), La (lactose), Ce (celobiose), Tr (trealose), Ra (rafinose), X (xilose), In (inositol), NO₃ (nitrato), Gl (glicose), + (positivo), - (negativo), V (variável)

Actualmente existem outros testes que determinam a capacidade de assimilação de um maior número de compostos, para além dos apresentados na Tabela 2, como o API ID 32C® (bioMérieux).

Os sistemas padronizados manuais e automatizados, também se baseiam essencialmente em provas de assimilação de compostos. Os sistemas manuais mais conhecidos incluem o API 20C® (bioMérieux) e ID 32C® (bioMérieux), o Auxacolor® (Sanofi Diagnostic Pasteur), e o RapID Yeast Plus System® (Inovative Diagnostic Systems) (Costa & Candido 2007; Barbedo & Sgarb 2010).

O kit ID 32C®, testa a assimilação de 30 fontes de carbono e azoto e a sensibilidade ou resistência à cicloheximida, e consiste em 31 pocetos, cada um contendo substratos liofilizados que são rehidratados com a suspensão da levedura, mais um para controlo negativo. Após a incubação em condições padronizadas, é realizada a leitura das provas positivas, as quais são demonstradas pela turvação das suspensões. A identificação da espécie obtém-se por comparação dos resultados com uma base de dados fornecida pelo fabricante. Segundo estudos efectuados, o kit ID 32C® identifica correctamente 87% das leveduras ao nível de género ou espécie, falhando na identificação das restantes 13% (Alves *et al.* 2005; Leaw *et al.* 2007).

Os métodos bioquímicos manuais têm a desvantagem de a leitura ser visual (não automática) e possuir um carácter relativo que depende da óptica do observador. Desta forma, um resultado positivo para um utilizador pode adquirir um carácter negativo para outro utilizador e conseqüentemente gerar resultados divergentes.

Os métodos automatizados mais utilizados são o MicroScan WalkAway[®] (Dade Behring) e o VITEK[®] (bioMérieux). São sistemas que permitem a identificação de uma vasta gama de microrganismos, entre estes leveduras, e a avaliação de sensibilidade aos antibióticos, através da incubação de cartas que contêm pocetos desidratados que são posteriormente rehidratados com a suspensão da levedura. Sendo controlados por computador os resultados são interpretados automaticamente (Barbedo & Sgarb 2010), diminuindo um possível erro humano. São recomendados para laboratórios de unidades hospitalares com grande movimento, como o Hospital de Santa Maria E.P.E. e o Instituto Português de Oncologia Dr. Francisco Gentil, ambos em Lisboa.

O MicroScan WalkAway[®] é um equipamento completo e flexível, totalmente automatizado para microbiologia clínica que permite obter resultados de um elevado número de amostras em apenas 4 horas, com um mínimo de trabalho humano (St. Germain & Beauchesne 1991). A partir de primoculturas com 24 a 48 horas de crescimento em Sabouraud, a identificação e a susceptibilidade antimicrobiana, bem como o cálculo das concentrações mínimas inibitórias de uma ampla variedade de antibióticos, é realizado por colorimetria e por fluorometria. Incuba automaticamente a suspensão microbiana durante o tempo apropriado, adiciona os reagentes necessários e executa a leitura dos painéis apresentando os resultados em formato digital. Seguindo as instruções do fabricante, o WalkAway[®] 96 tem a capacidade de processar, simultaneamente, 96 painéis, ou seja, 96 isolados clínicos de uma só vez. Os resultados são apresentados no final em formato digital.

O AutoScan-4 é um equipamento semi-automatizado para microbiologia clínica e realiza automaticamente a leitura de um painel inoculado com uma suspensão microbiana padronizada. Utiliza a tecnologia de fibras ópticas que permitem a leitura espectrofotométrica de todo o painel simultaneamente, garantindo grande precisão nos resultados, os quais são dados em 5 segundos. (Dade Behring, 2006).

O painel de identificação rápida de leveduras (RYI) consiste numa placa de microdiluição com 96 pocetos, com 27 substratos desidratados e foi concebido para a identificação rápida das leveduras isoladas a partir de amostras clínicas (St. Germain & Beauchesne 1991; Dade Behring, 2004). O painel "*Rapid Yeast ID B1017-70*" está preparado para identificar as seguintes espécies: *B. capitatus*, *C. albicans*, *C. catenulata*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. humicola*, *C. inconspicua*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lambica*, *C. lipolytica*, *C. lusitaniae*, *C. pintolopesii*, *C. parapsilosis*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *C. viswanathii*, *C. zeylanoides*, *C. albidus*, *C. laurentii*, *C. melibiosum*, *C. neoformans*, *C. terreus*, *C. uniguttulatus*, *Geotrichum sp.*, *H. anómala*, *H. polymorpha*, *K. lactis*, *P. farinosa*, *P. wickerhamii*, *Prototheca sp.*, *R. glutinis*, *R. minuta*, *R. rubra*, *R. mucilaginosa*, *S. salmonicolor*, *T. beigelii*.

O sistema VITEK[®] efectua de forma automática os passos essenciais para a realização de testes de identificação e susceptibilidade utilizando as cartas de leveduras YST[®]. Estas baseiam-se em métodos bioquímicos e possuem 46 testes que medem a utilização da fonte de carbono, a utilização da fonte de azoto e a actividade enzimática (Pereira, 2010).

O sistema VITEK[®] tem a capacidade para executar entre 32 a 480 cartas, dependendo do modelo e inclui um inoculador/selador que permite a inoculação de cartas em poucos minutos e um incubador/leitor que incuba e lê em simultâneo as cartas. Consiste num método rápido, cuja leitura é feita colorimetricamente e cujos resultados estão disponíveis entre quatro a dezoito horas (Huang *et al.* 2001; Oliveira *et al.* 2006; Pereira, 2010).

A automatização deste sistema proporciona maior segurança e elimina os erros inerentes às operações manuais, além de que, ao facultar os resultados de uma forma mais rápida, diminui o tempo de resposta, quando comparado com as técnicas manuais (Pereira, 2010).

Os métodos automatizados, em relação aos métodos manuais, possuem a vantagem de, por permitirem o processamento de um número muito elevado de amostras em pouco tempo, rentabilizar o pessoal técnico e a impressão dos resultados obtidos. Deste modo, a fiabilidade é maior e os resultados podem ser usados futuramente em estudos epidemiológicos ou em estudos estatísticos. Apresentam

contudo algumas desvantagens: os resultados são expressos em percentagens, são bastante mais dispendiosos em relação aos equipamentos envolvidos e aos *kits* de cartas onde são inseridas as amostras, existe a necessidade de separação entre cartas de identificação e de sensibilidade, há muitas vezes a necessidade de usar alguns testes manuais para confirmação da identificação e, finalmente, existe dificuldade em aplicar um controlo de qualidade. Além disso, alterações na concentração do inóculo, contaminação da amostra, falta de manutenção dos aparelhos, utilização de poucas quantidades de reagente, uma base de dados insuficiente para a identificação de espécies menos frequentes e erros na leitura colorimétrica, limitam muito uma correcta identificação de muitos microrganismos, nomeadamente de leveduras do género *Candida* (Oliveira *et al.* 2006).

Segundo numerosos estudos realizados nas últimas décadas, a metodologia convencional baseada em testes de assimilação e fermentação de açúcares, na morfologia e em testes enzimáticos parece ter uma imprecisão em cerca de 4,6 % dos casos. Torna-se desta forma necessário tomar medidas para melhorar a eficácia dos métodos de diagnóstico, sendo uma delas a inclusão de testes moleculares no diagnóstico das infecções fúngicas humanas (Shepard *et al.* 2008).

Em certos grupos de doentes, um atraso de apenas 24 horas no início da terapêutica pode ter repercussões muito graves, agravar irremediavelmente o seu estado e consequentemente levá-lo à morte. Nestes últimos anos têm sido propostos vários testes moleculares para o diagnóstico clínico de candidoses. Contudo, relativamente à prevenção, nomeadamente para detectar possíveis infecções nosocomiais, a identificação ao nível de espécie não é suficiente, pelo que se torna necessário diferenciar *C. albicans* ao nível de estirpe (Iwata *et al.* 2006; Muir *et al.* 2009).

Assim, em consequência do contexto clínico e epidemiológico de numerosas situações surgiu a necessidade de desenvolver métodos de tipagem molecular que permitissem distinguir os isolados de *Candida albicans* entre si, através da detecção da variabilidade intraespecífica de isolados da mesma espécie, a qual se torna crucial para a administração de terapêutica antifúngica de uma forma célere e adequada, assim como também para a prevenção e vigilância de novas infecções (Dalle *et al.* 2000; Iwata *et al.* 2006; Lyon *et al.* 2010).

Determinação da Sensibilidade aos Antifúngicos

Actualmente, a pesquisa realizada na área da sensibilidade a antifúngicos encontra-se muito menos desenvolvida quando comparada com os antibióticos antibacterianos. Por esta razão torna-se urgente o seu estudo. Para além da realização de estudos epidemiológicos, os testes de sensibilidade a antifúngicos são realmente importantes para decidir sobre uma nova terapêutica mais ajustada ou para a aplicação de novas drogas em substituição de outras que se tornaram entretanto ineficazes. Assim, a determinação da sensibilidade aos antifúngicos *in vitro* é efectuada de acordo com comportamento das leveduras, quando estas crescem em contacto com o fármaco (Cardoso, 2004).

Existem vários métodos para a realização deste teste e por isso, com o intuito de uniformizar as metodologias usadas, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, antigo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* ou NCCLS) estabeleceu um conjunto de procedimentos padrão para os testes de sensibilidade aos fármacos, no que diz respeito ao tempo e temperatura de incubação, à dimensão do inóculo, ao meio de cultura e ao tempo actuação do antifúngico. Estes factores são importantes uma vez que o aumento da concentração do inóculo, o aumento do tempo e temperatura de incubação, e um meio de cultura com um pH baixo, podem levar ao aumento da Concentração Mínima Inibitória, ou CMI e, conseqüentemente, a falsos resultados (Chen *et al.* 1996; Cardoso, 2004). A Norma desenvolvida pelo CLSI define o conceito de CMI como sendo “*a mais baixa concentração de um agente antimicrobiano que inibe o crescimento visível de um microrganismo em meio sólido com agar ou numa diluição feita em meio líquido*” (Cardoso, 2004).

O método Kirby-Bauer é um método de difusão que utiliza discos impregnados com o antifúngico que se quer testar de forma a determinar a susceptibilidade ou a resistência do microrganismo em estudo. Após a incubação do fungo nas condições adequadas, é possível verificar se a estirpe em estudo é Sensível (S), Resistente (R) ou se por outro lado possui um comportamento Intermédio (I) em relação ao antifúngico testado. A susceptibilidade é verificada pelo aparecimento de um halo em redor do disco, denominado de zona de inibição, que demonstra a ausência de crescimento da

levedura. O diâmetro do halo é expresso em milímetros (mm) e comparado com tabelas predefinidas, definindo-se se a estirpe é S, R ou I (Pereira, 2010).

Diagnóstico molecular de *Candida albicans*

Sabe-se que o ser humano pode estar naturalmente colonizado por uma grande diversidade de estirpes da espécie *C. albicans* na medida em que esta levedura faz parte da nossa flora microbiana. Uma análise detalhada da distribuição alélica desta espécie, tem mostrado que a herança genética é de origem predominantemente clonal (Webster & Weber 2007).

Para o diagnóstico clínico das candidoses, têm sido empregues técnicas comuns de biologia molecular, como o PCR, *Southern Blotting*, amplificação aleatória de polimorfismos de DNA (RAPD) ou hibridização *in situ* (FISH), técnicas que têm sido adaptadas para a detecção e identificação de numerosas espécies de fungos em amostras clínicas (Iwata *et al.* 2006). No entanto, para prevenção e melhor controlo da candidose, surgiu a necessidade de identificar vias de infecção e de transmissão de *C. albicans* (incluindo a fonte de infecção) só que, para isso, foi necessário encontrar uma forma de distinguir os isolados ao nível de estirpe em vez da simples identificação ao nível de espécie (Garcia-Hermoso *et al.* 2007). Têm sido então aplicadas várias técnicas como *Multilocus Sequence Typing* (MLST), *Southern Blot*, *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE), *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Microsatellite Length Polymorphism* (MLP) e *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) que permitiram distinguir diversos genótipos nesta espécie (Hattori *et al.* 2006; Costa & Candido 2007).

Para *C. albicans*, o desenvolvimento de um método de genotipagem reprodutível e discriminatório é um benefício não só para o tratamento clínico, como também para estudos epidemiológicos. Estes permitem obter informações sobre a origem, o transporte e o modo de transmissão das infecções. Possibilitam ainda avaliar a relação entre estirpes, identificar surtos de infecção, e detectar estirpes virulentas e/ou resistentes a antifúngicos (Sampaio *et al.* 2005; Hattori *et al.* 2006; Odds *et al.* 2006; Garcia-Hermoso *et al.* 2007; Lyon *et al.* 2010).

Os métodos moleculares de tipagem permitem, por exemplo, verificar se a infecção invasiva é de origem endógena, como por exemplo infecções oportunistas invasivas derivadas de candidose oral, ou exógena, por transmissão através do meio ambiente ou de pessoal do hospital. A genotipagem tem vindo a demonstrar que a maior parte das infecções é proveniente de fontes endógenas e, em menor número, de fontes exógenas sendo estas, principalmente transmitidas pelas mãos dos profissionais de saúde (Dalle *et al.* 2000; Zardo & Mezzari 2004).

Estudos ao nível da epidemiologia molecular mostraram que indivíduos saudáveis podem ser colonizados simultânea ou sequencialmente por diferentes estirpes de *C. albicans*, levando a crer que existe um processo infeccioso dinâmico, ou seja, que se altera constantemente. Durante a vida do indivíduo os isolados de *C. albicans* podem persistir, evoluir através de variações genéticas (microevoluções) ou ser substituídas por outros isolados diferentes (Bougnoux *et al.* 2006).

A levedura da espécie *C. albicans* é um ser diplóide com uma heterozigotia marcante mas que, predominantemente, se reproduz de uma forma clonal. As microvariações genómicas ocorrem devido a recombinações, *crossing over* mitótico e a alterações morfológicas de cromossomas, levando a mudanças na expressão génica necessárias à manutenção celular. Estas alterações levam ao aparecimento de novas estirpes, com novas características de virulência e reflectem-se na expressão de certas características como a morfologia das colónias, a assimilação de açúcares e a sensibilidade aos antifúngicos. A identificação destas microvariações entre estirpes ajuda, portanto, na compreensão desta dinâmica envolvida na microevolução genética de *C. albicans* e na sua relação com a emergência de estirpes resistentes aos antifúngicos (Chindamporn *et al.* 1998; Lyon *et al.* 2010).

Os métodos moleculares de tipagem podem fornecer informações sobre a diversidade genética de uma espécie, assim como os mecanismos genéticos que levaram à aquisição dessa multiplicidade. Idealmente, os métodos utilizados na diferenciação de estirpes devem ser altamente discriminatórios, reprodutíveis e passíveis de ser usados num grande número de isolados (Bougnoux *et al.* 2006; McManus *et al.* 2008).

Determinação de genótipos de *Candida albicans*

Com o objectivo de diferenciar possíveis fontes de infecção e/ou vias de infecção, através da distinção de estirpes diferentes de *C. albicans*, tem-se procurado nestes últimos anos desenvolver sistemas de elevada resolução.

O método RAPD foi uma das primeiras metodologias moleculares utilizadas na genotipagem de microrganismos e igualmente aplicada em *C. albicans*. Este método baseia-se na amplificação aleatória de sequências de DNA usando *primers* curtos de sequências arbitrárias que podem detectar, por exemplo, polimorfismos sem qualquer conhecimento prévio da sequência de DNA alvo. Os marcadores de RAPD têm-se revelado adequados para o estudo da variabilidade genética de populações (Borges *et al.* 2000). Este método também se tem revelado vantajoso no estudo de regiões alargadas do genoma de *C. albicans*, apesar de possuir como desvantagens a reprodutibilidade e a incapacidade de diferenciar estirpes heterozigóticas (Garcia-Hermoso *et al.* 2007; McManus *et al.* 2008).

O MLST, que recai na análise das sequências de polimorfismos de nucleótidos em genes conservados, revelou ser igualmente um método altamente discriminatório (Bougnoux *et al.* 2006; Garcia-Hermoso *et al.* 2007; McManus *et al.* 2008). Este método é usado para a tipagem de vários *loci* do DNA genómico e envolve a amplificação de DNA por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) seguido de sequenciação das regiões amplificadas, a qual vai detectar variações em genes conservados e caracterizar, desta forma, as estirpes pelos seu perfis alélicos únicos. Esta caracterização é feita com base na análise de polimorfismos dos nucleótidos existentes em sequências de fragmentos de genes conservados com dimensões entre 450 a 500 pares de bases. Para cada *locus* conservado, as sequências diferentes dentro da mesma espécie são consideradas como sendo alelos distintos. A análise de um grande número de alelos de cada gene conservado permite a construção de diferentes perfis alélicos, e assim a construção de um dendrograma. Os dados obtidos através do MLST podem ser partilhados via Internet no site www.mlst.net, o que permite uma análise epidemiológica global (Lyon *et al.* 2010). Para a análise de dados de MLST é usado o método estatístico eBURST que compila *clusters* de isolados que diferem uns dos outros nas

sequências de um dado *loci*. Porém, este método estatístico, o eBURST, possui a desvantagem de não distinguir se os isolados diferem num só SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) ou em vários SNP's (Odds *et al.* 2006). Esta técnica tem contribuído em muito para a compreensão da evolução de diferentes estirpes de *C. albicans*. Por ser um método capaz de diferenciar estirpes heterozigóticas, o que é muito importante com microrganismos diplóides (McManus *et al.* 2008) e bastante reprodutível (99,72 %), tornou-se uma técnica muito adequada para genotipagem de *C. albicans*. Contudo, este método apresenta duas desvantagens, uma prende-se com o facto de somente permitir estudar regiões muito pequenas do genoma de *C. albicans* e, por outro, de ser um método muito laborioso e dispendioso para que seja utilizado em laboratórios clínicos (Garcia-Hermoso *et al.* 2007; Lyon *et al.* 2010).

O MLP tem sido outro método usado para genotipar estirpes e consiste na amplificação de sequências microssatélites. Os microssatélites ou *Simple Tandem Repeats* (STRs) são pequenas sequências repetidas e intercaladas aleatoriamente através do genoma nuclear e de organitos, sendo que a unidade de repetição consiste em fragmentos menores que 10 pares de bases (Garcia-Hermoso *et al.* 2007; Lyon *et al.* 2010). Entre indivíduos diferentes existe uma variação no número das unidades de repetição dos microssatélites que contribui para a existência de polimorfismos alélicos. No entanto sabe-se que as unidades microssatélites são instáveis e altamente polimórficas, expandindo-se ou contraindo-se, dando origem a mutações pontuais. Deste modo, o comprimento dos *loci* de microssatélites pode variar entre organismos diferentes, tal como sucede em *C. albicans* (Sampaio *et al.* 2005; Lyon *et al.* 2010). Os microssatélites possuem uma herança co-dominante mendeliana que aliada à simplicidade da amplificação por PCR permite a identificação de relações hereditárias entre estirpes e a sua genotipagem. Permitem ainda diferenciar organismos heterozigóticos, uma vez que testa a presença de alelos diferentes para um dado *locus*. (Sampaio *et al.* 2005; Garcia-Hermoso *et al.* 2007; Lyon *et al.* 2010). A tipagem de microssatélites do DNA de *C. albicans* pode fornecer, deste modo, informações epidemiológicas importantes ao nível de correlações entre os genótipos de isolados e a origem das infecções bem como o grau de virulência e/ou a susceptibilidade aos antifúngicos. Porém, a análise por MLP tem o inconveniente de se estudar regiões muito

pequenas do genoma de *C. albicans* podendo induzir a imprecisões na interpretação (Garcia-Hermoso *et al.* 2007; Lyon *et al.* 2010).

Contudo, todos estes métodos se têm revelado trabalhosos e demorados, para além de que envolvem custos elevados na aquisição de equipamentos, o que tem constituído um entrave à sua aplicação mais alargada. Sabendo que, para uma melhor identificação da fonte de infecção ou das vias de infecção se torna fundamental desenvolver um método de genotipagem de *C. albicans*, procurou-se uma alternativa mais acessível e exequível de diferenciação ao nível das estirpes (Iwata *et al.* 2006).

Os genótipos de *Candida albicans*

Têm sido efectuados numerosos estudos de determinação dos genótipos de *C. albicans* utilizando técnicas de *Southern Blotting*, PFGE, RFLP ou RAPD na medida em que têm revelado ser muito discriminatórias ao nível de estirpe. Consequentemente, tem-se detectado a existência de cinco genótipos desta espécie, A, B, C, D e E, sendo o tipo A o mais frequentemente isolado de infecções humanas e o genótipo D correspondente a *Candida dubliniensis*, uma espécie filogeneticamente muito próxima de *C. albicans*. No entanto, todos esses métodos têm mostrado ser muito elaborados, demorados e de custo demasiado elevado, para além de requererem por vezes a aquisição de equipamentos especiais, constituindo um entrave à genotipagem mais alargada de estirpes de *C. albicans* (Millar *et al.* 2002; Hattori *et al.* 2006; Iwata *et al.* 2006; Adachi *et al.* 2009).

Em 2006 um grupo japonês desenvolveu uma metodologia mais acessível, facilmente implementável em laboratórios com menos recursos. Através do seu método baseado em simples amplificações por PCR, confirmou uma vez mais a existência dos quatro genótipos de *C. albicans*. O alvo utilizado foi a subunidade maior do DNA que codifica os ribossomas, também designada por 25S rDNA, em virtude de possuir um elevado grau de conservação (Millar *et al.* 2002; Iwata *et al.* 2006).

Iwata e colaboradores (2006) partiram do conhecimento prévio de que os cromossomas de *C. albicans* contêm sequências repetitivas denominadas RPS's e que

cada uma delas é formada pela repetição em tandem de uma curta unidade de 172 bases que se repete igualmente em tandem, e se designa por fragmento ALT.

O número variável de sequências ALT em cada estirpe traduz-se numa variação molecular das dimensões das RPS's, e estas características moleculares dos diferentes tamanhos e do número de cópias das sequências ALT revelaram ser um alvo atraente para a realização da genotipagem de *C. albicans*. Posteriormente, descobriu-se que *C. stellatoidea* e *C. dubliniensis* também continham sequências RPS's semelhantes às de *C. albicans*, mas que as RPS's de *C. albicans* eram mais variáveis quando comparadas com as de *C. dubliniensis* e *C. stellatoidea* (Iwata *et al.* 2006).

Neste estudo, foi projectado um par de *primers*, denominado de P-II, específico para as sequências ALT de *C. albicans* (*primers* ASDcF e pCSCR) e, através de uma simples amplificação por PCR, foi possível fazer a genotipagem de isolados de *C. albicans* de uma forma muito simples, rápida e precisa (Figura 2A).

Para além dos *primers* que amplificam as sequências ALT, foi utilizado um segundo par de *primers*, denominado de AS-I, no sentido de aumentar o poder discriminatório: o *primer forward* ASaF13 dirigido às sequências ALT do tipo “a” e o *primer reverse* AScR135 dirigido às sequências ALT do tipo “c” (Hattori *et al.* 2009). Este último par de *primers* reflecte o modo de arranjo das sequências ALT dentro de cada unidade RPS (Figura 2B).

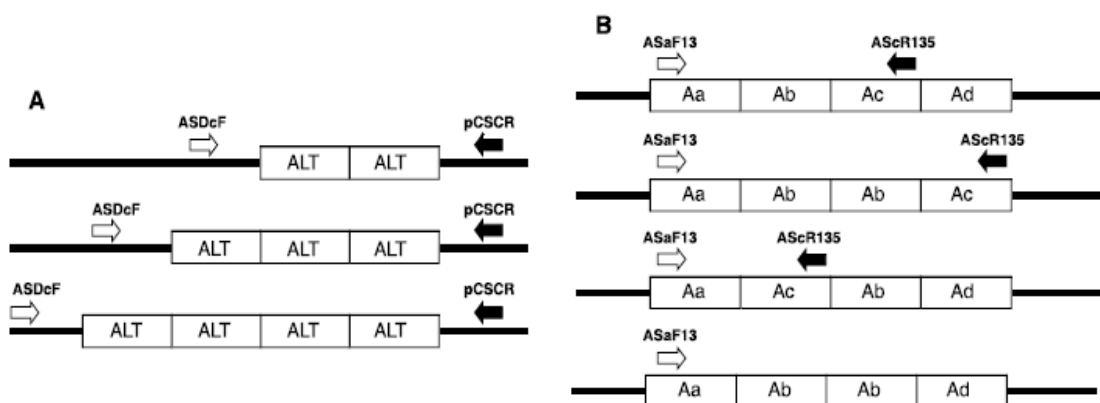


Figura 2. Esquema representativo dos locais de annealing para: (A) o conjunto de primers P-II, e (B) o set de primers AS-I (ASaF13 e AScR135). As setas a branco indicam o sentido *forward* do *primer* e as setas pretas o sentido *reverse* (Hattori *et al.* 2009).

Os trabalhos efectuados por Adachi *et al.* (2009) e por Hattori *et al.* (2009) comprovam que as informações fornecidas pelo uso de PCR com o par de *primers* P-II conjuntamente com outro PCR com o par de *primers* AS-I são úteis na tipagem de *C. albicans* uma vez que subdivide os genótipos 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 em tipo “a” ou tipo “c”.

Comparando com os outros métodos moleculares baseados em RAPD, *Southern Blot*, MLST, RFLP, PFGE este método de genotipagem por PCR utilizando *primers* dirigidos à região 25S rDNA e às sequências RPS/ALT mostrou ser mais simples, rápido e de baixo custo. O seu poder discriminatório é elevado, fazendo deste método uma ferramenta útil para uma genotipagem acessível de *C. albicans* e para a diferenciação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*, situação que não é fácil devido à proximidade filogenética das duas espécies (Hattori *et al.* 2006; Iwata *et al.* 2006; Adachi *et al.* 2009; Hattori *et al.* 2009).

De uma forma simples e rápida tornou-se possível tipificar *C. albicans* no sentido de permitir detectar a fonte endógena ou exógena de infecções nosocomiais. Com base em resultados de estudos realizados no Japão, verificou-se que a colonização endógena provinha da flora saprofítica em que as estirpes comensais de *C. albicans* passavam a oportunistas. Esta situação permitiu alertar para a necessidade premente de melhorar os cuidados na limpeza sanitária de infecções orais e genitais de doentes imunocomprometidos no sentido de prevenir as infecções por *C. albicans* (Hattori *et al.* 2006).

Determinação dos Genótipos de *Candida albicans* baseada nas Sequências RPS/ALT

As *Repeated Sequences* (RPS) são sequências homólogas repetitivas, altamente conservadas, com aproximadamente 2.1 kb. Possuem alto grau de incidência nos genomas dos organismos eucarióticos, inclusivamente no de *C. albicans* estando presentes em todos os cromossomas, à excepção do cromossoma 3. Sabe-se que as RPS não se encontram dispersas pelos cromossomas mas sim confinadas a uma dada região de cada cromossoma. Além disso, cada cromossoma contém um ou dois tipos diferentes

de RPS, como o caso do cromossoma 6 que possui várias cópias de um só RPS de 2.1 kb. (Chibana *et al.* 1994; Chibana & Magee 2009; Hattori *et al.* 2009).

A maior parte das RPS está associada a elementos genéticos móveis, enquanto algumas estão relacionadas com a regulação génica, sendo que outras não possuem ainda função conhecida. Embora existam sequências RPS similares em outras espécies de *Candida*, são as RPS de *C. albicans* as que possuem maior variabilidade (Iwata *et al.* 2006; Chibana & Magee 2009).

A unidade RPS é constituída por uma sequência ALT com 172 bases, e é flanqueada por duas sequências conservadas, HOK e RB2, de 7 a 8 kb e 6 a 7 kb respectivamente. Em *C. albicans*, à unidade constituída por RB2-n(RPS)-HOK é dado o nome de *Major Repeat Sequence* (MRS). O MRS de *C. albicans* é uma porção de DNA repetido que está associado a translocações de cromossomas (Chindamporn *et al.* 1998; Chibana & Magee 2009) e a sua estrutura encontra-se representada na Figura 3.

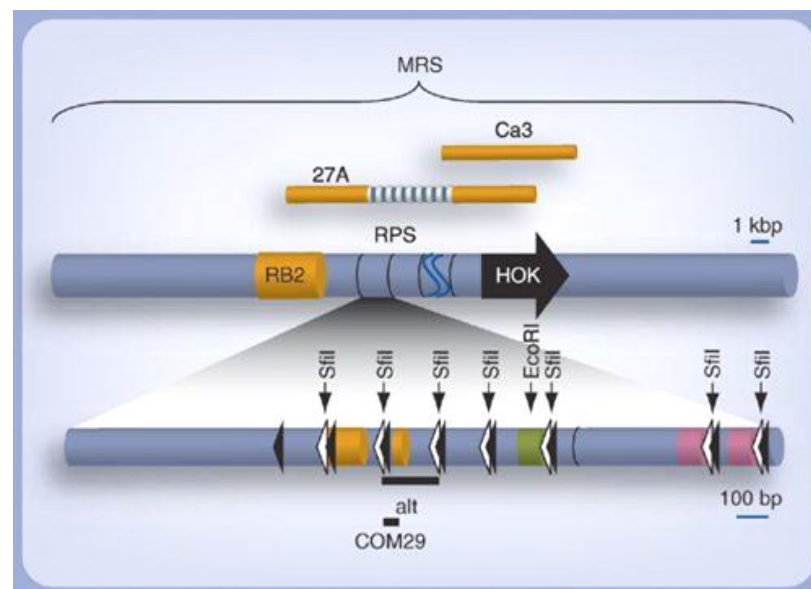


Figura 3. Esquema representativo da MRS e da RPS de *C. albicans* (Chibana & Magee 2009).

O número de repetições de RPS varia entre os cromossomas homólogos. Dependendo desta variação numérica de RPS, os dois homólogos do mesmo cromossoma podem diferir entre si por dezenas de milhares de pares de bases. Estas

diferenças levam à ocorrência de alterações no cariótipo¹ e conseqüentemente à existência de polimorfismos. Outro fenómeno que pode explicar os polimorfismos encontrados entre as estirpes de *C. albicans* é a translocação recíproca. Neste tipo de translocação existe troca mútua de segmentos resultantes de quebra cromossômica sem que haja perda de material genético (Chibana & Magee 2009; Pereira *et al.* 2011).

A elevada frequência de translocações na região MRS pode ser devida ao emparelhamento de cromossomas heterólogos (não homólogos) ou das zonas homólogas da RPS. Assim, a recombinação mitótica normal ocorre nas regiões emparelhadas resultando assim em translocações, que por sua vez originam os polimorfismos. Deste modo, devido ao facto de sequência MRS ser uma zona muito polimórfica, constitui uma ferramenta muito boa para usar em estudos epidemiológicos e taxonómicos (Chibana & Magee 2009).

O número de cópias das sequências ALT conduz a variações nas dimensões moleculares das RPS. Estas variações moleculares permitem a genotipagem de estirpes diferentes de *C. albicans*. O par de *primers* ASDcF/pCSCR, denominado por P-II, é utilizado para determinar o número de repetições de ALT de *C. albicans* nas sequências RPS. Consoante o número de repetições, os tipos de ALT dividem-se em: 1 (apenas uma repetição ALT), 2 (duas repetições), 3 (três repetições), 4 (quatro repetições), 5 (cinco repetições) e 6 (seis repetições) (Hattori *et al.* 2006; Iwata *et al.* 2006).

Como referido anteriormente, foi demonstrado que a associação do conjunto de *primers* P-II (direccionado às sequências ALT) ao set de *primers* P-I (direccionado à região 25S rDNA) oferecia ainda melhores resultados ao nível da diferenciação de estirpes de *C. albicans*, comparativamente à tipagem por PFGE ou por RAPD, para além de uma maior rapidez na obtenção da resposta e de maior facilidade de execução. Para além de ter permitido a subdivisão dos génotipos de *C. albicans* já conhecidos, A, B, C e E, possibilitou a detecção de mais génotipos desta espécie: 1, 2, 3, 4, 5 e 6, permitindo ainda um maior grau de diferenciação ao nível de estirpe (Iwata *et al.* 2006; Hattori *et al.* 2009).

¹ Aspecto, dimensão, forma e número, do conjunto de cromossomas de uma célula somática.

Objectivos do Trabalho e Plano da Dissertação

Nas últimas duas décadas, o número de infecções por *Candida albicans* tem aumentado de forma flagrante entre os doentes hospitalizados. A imunodepressão contribuiu em muito para a invasão e instalação de fungos comensais dando origem a micoses oportunistas e nosocomiais, e como tal para o aumento da morbidade e da mortalidade dos doentes. Desta forma torna-se imperativo que a terapêutica seja iniciada o mais célere possível e como tal muitos profissionais de saúde preferem actuar antes de saber o resultado do exame micológico. Porém, a administração de antifúngicos inadvertidamente, além de ser extremamente tóxica para o doente, levanta problemas sérios ao nível do desenvolvimento de resistências.

Torna-se por isso necessário a tipagem de *C. albicans* de forma a avaliar quais as estirpes susceptíveis ou resistentes aos fármacos utilizados em meio hospitalar de forma a implementar a terapêutica mais apropriada.

De forma a prevenir ou controlar infecções nosocomiais torna-se igualmente útil a genotipagem de *C. albicans* de forma a identificar a prevalência de uma dada estirpe em dado local ou doente(s).

Neste contexto, destacando o quão fundamental constitui o diagnóstico micológico na área clínica, o presente trabalho possui como objectivos:

- Desenvolvimento de um método de genotipagem de estirpes de *Candida albicans* que seja simples, rápido e económico, passível de ser implementado em laboratórios de diagnóstico hospitalar;
- Realização de um estudo epidemiológico entre diferentes grupos de isolados clínicos de *Candida albicans* provenientes de três diferentes zonas de Portugal: Covilhã (Hospital Cova da Beira, E.P.E.), Lisboa (Instituto Português de Oncologia e Hospital Santa Maria, E.P.E.) e Viseu (UCIP do Hospital de São Teotónio);
- Avaliação do modo de transmissão de infecções nosocomiais de estirpes de *Candida albicans*;

- Aquisição de conhecimentos que permitam uma correcta genotipagem de estirpes de *Candida albicans* causadoras de infecção invasiva;
- Comparação dos padrões de susceptibilidade a dois dos antifúngicos mais comumente usados na área da Medicina, o Fluconazol e Voriconazol, utilizando o Método de Difusão em disco Kirby-Bauer para a determinação da sensibilidade ou da resistência dos isolados clínicos.

Este estudo foi realizado no Laboratório de Micologia no Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa. O trabalho baseou-se na genotipagem de estirpes de *Candida albicans* por um método molecular (detecção de polimorfismos nas regiões 25S rDNA e RPS/ALT) inovador, nunca antes efectuado na Europa.

Esta dissertação encontra-se dividida em quatro capítulos.

No primeiro capítulo é feita uma introdução geral sobre as leveduras patogénicas realçando a espécie *Candida albicans*, quais os seus factores de virulência, a sua importância em meio hospitalar, os métodos convencionais disponíveis para a sua identificação e quais os testes moleculares utilizados na genotipagem de *Candida albicans*, bem como os seus mecanismos de resistência a antifúngicos.

No segundo capítulo são descritos os métodos empregues no diagnóstico convencional para identificação de espécie (exame directo, caracterização fenotípica e morfológica, teste da blastese, testes serológicos e testes bioquímicos) e o diagnóstico molecular para diferenciação de estirpes por um método baseado em PCR que permite a avaliação das regiões 25S do rDNA e das sequências RPS/ALT. No segundo capítulo é ainda descrita a metodologia empregue no estudo da sensibilidade *in vitro* de estirpes de *Candida albicans* aos antifúngicos Fluconazol e Voriconazol.

No terceiro capítulo são apresentados os resultados obtidos no decorrer do estudo, assim como a sua discussão.

Por fim, no quarto capítulo são apresentadas as conclusões e considerações finais sobre os resultados obtidos neste trabalho.

MATERIAIS E MÉTODOS

Origem das estirpes estudadas

Para a realização deste estudo foram seleccionados um total de 60 isolados clínicos de leveduras *Candida albicans* obtidas a partir de duas colecções do Laboratório de Micologia do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, que são mantidas conservadas a -80 °C. Da colecção “CAN”, que inclui somente leveduras isoladas de amostras clínicas de locais à partida estéreis, como sangue e aspirado brônquico, foram seleccionados dois grupos de isolados clínicos de diferentes origens geográficas: Lisboa (Hospital Santa Maria E.P.E. e Instituto Português de Oncologia) e Viseu (Hospital de São Teotónio) e da colecção “Ana Pereira” um grupo de isolados clínicos provenientes da Covilhã (Centro Hospitalar Cova da Beira E.P.E.).

As diferentes amostras biológicas a partir de onde foram isoladas as estirpes encontram-se representadas na Tabela 3. Na Tabela 4 apresenta-se a distribuição relativamente ao sexo, dos doentes nos três locais do país.

Tabela 3. Número de isolados clínicos obtidos a partir das diferentes amostras clínicas enviadas para diagnóstico laboratorial.

Produto biológico	Número de amostras		
	Covilhã	Lisboa	Viseu
Aspirado brônquico	1	0	20
Cateter	1	0	0
Expectoração	5	0	0
Exsudado	3	0	0
Exsudado vaginal	2	0	0
Fezes	1	0	0
Hemocultura	1	20	0
Urina	6	0	0
Total	20	20	20

Tabela 4. Número de isolados clínicos estudados em relação à localidade de origem e ao sexo dos doentes.

Sexo	Número de isolados clínicos			
	Covilhã	Lisboa	Viseu	Total
Feminino	9	7	10	26
Masculino	11	13	10	34

Identificação das leveduras isoladas de infecções pelos métodos convencionais

As leveduras dos isolados clínicos pertencentes às três diferentes zonas geográficas de Portugal, Covilhã, Lisboa e Viseu, foram identificadas convencionalmente de acordo com a rotina laboratorial de cada hospital onde foram isoladas (Tabela 5).

Tabela 5. Testes realizados na identificação convencional dos isolados seleccionados para este trabalho, provenientes dos três diferentes locais geográficos.

	Isolados da Covilhã	Isolados de Lisboa	Isolados de Viseu
Exame Microscópico	Exame a fresco com KOH	Após isolamento em Sabouraud: com azul de lactofenol	Exame a fresco com KOH Exame directo com azul de lactofenol
Isolamento	Em meio de cultura Sabouraud	Em meio de cultura Sabouraud a partir de hemoculturas positivas	Em meio de cultura Sabouraud
Identificação presuntiva	Inoculação em meio CHROMagar Candida® Teste da Filamentação BICHRO-LATEX ALBICANS®	Inoculação em meio CHROMagar Candida® ou em Candiselect® Teste da Filamentação	Inoculação em meio chromID Candida®
Identificação bioquímica	VITEK®	MicroScan WalkAway System®	VITEK®

Exame a fresco com Hidróxido de Potássio (KOH)

As amostras biológicas provenientes da Covilhã e de Viseu foram observadas em exame directo com KOH a 20% para clarificar a preparação, devido à natureza densa dos produtos.

O procedimento adoptado foi o seguinte: numa lâmina de microscopia aplicou-se uma porção da amostra a ser analisada tendo-se adicionado posteriormente uma gota de KOH 20%. Seguidamente, cobriu-se a preparação com lamela e aguardou-se entre 30 a 50 minutos para que ocorresse a destruição das estruturas não fúngicas. Em alternativa pode-se aquecer ligeiramente à chama do Bico de *Bunsen*, sem deixar ferver, para acelerar o processo de clarificação. Após este procedimento que permite a actuação do KOH, esmagou-se gentilmente a preparação contra um papel de filtro para diminuir a espessura da amostra e observou-se ao microscópio óptico de fundo claro, primeiro com as objectivas de 10x e depois com a de 40x, procurando estruturas fúngicas: células leveduriformes isoladas ou em gemulação, pseudofilamentos ou filamentos verdadeiros.

Isolamento dos produtos biológicos

Todas as amostras clínicas provenientes dos hospitais incluídos neste estudo, tanto os produtos biológicos provenientes da Covilhã e de Viseu, como todas as hemoculturas positivas² (de Lisboa e da Covilhã), foram semeadas em meio Sabouraud, adicionado de cloranfenicol e gentamicina, e incubadas a 37° C durante 24 a 48 horas. Este meio de cultura possui peptona e glucose, os quais favorecem o crescimento das leveduras, e possui um pH moderadamente ácido, entre 5 e 5,6 que dificulta o crescimento de bactérias. A gentamicina inibe o crescimento da maioria das bactérias Gram positivas e Gram negativas e o cloranfenicol inibe algumas espécies bacterianas como *Streptococcus* e *Proteus* que possam ser resistentes à gentamicina. Esta composição permitiu o isolamento selectivo das leveduras incluídas neste estudo, inibindo o crescimento da flora bacteriana mista das mucosas, da expectoração ou da urina.

Terminado o tempo de incubação, embora as características morfológicas das leveduras sejam pouco diferenciáveis na identificação das espécies, observou-se a

² As hemoculturas foram previamente incubadas no sistema BacT/ALERT a 37° C, durante 7 dias. Após positividade, as hemoculturas foram semeadas em meio Sabouraud adicionado de cloranfenicol e gentamicina.

morfologia macroscópica das leveduras das três colecções: Covilhã, Lisboa e Viseu, em relação à cor, textura, superfície, relevo e margem das colónias.

Observação Morfológica dos Isolados

Foi observado e registado o aspecto morfológico das colónias de todos os isolados incluídos neste estudo. A observação macroscópica das colónias foi realizada após crescimento em meio de Sabouraud, o meio padrão para o estudo dos fungos de interesse médico. Foi observada a cor, forma, relevo, textura da superfície e tipo de margem de todas as colónias. Para observação da micromorfologia, colocou-se uma gota de azul de lactofenol numa lâmina de microscopia e, com o auxílio de uma ansa esterilizada, retirou-se uma pequena porção de colónia da levedura crescida no meio de cultura Sabouraud. Homogeneizou-se a porção de colónia na gota do corante e colocou-se a lamela em cima desta preparação. Em seguida observou-se ao microscópio óptico de fundo claro. Contudo, uma vez que o exame morfológico macroscópico e microscópico não permite a identificação das leveduras ao nível de espécie, tornou-se necessário avançar com metodologias mais discriminantes.

Identificação Presuntiva

CandiSelect[®] 4

Algumas amostras da Colecção Lisboa foram semeadas no meio cromogénico CandiSelect[®] 4 de forma a permitir uma identificação presuntiva de *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei*, ou uma identificação directa de *Candida albicans*. Tal como demonstrado na Tabela 6, as colónias de *C. albicans* são identificadas pelo tom rosado que ostentam, e as restantes três abordadas na frase anterior pela cor azul turquesa, mais ou menos intenso, e pelo aspecto liso ou rugoso das colónias. As restantes espécies originam colónias de cor branca. A leitura dos resultados pode ser efectuada após 24 horas de incubação, contudo, corre-se o risco de não haver crescimento suficiente ou mudança do marcador pela hidrólise do substrato. Assim, uma

leitura correcta e fiável deve ser realizada às 48 horas. Este método é muito directo para a identificação de *C. albicans*, já que é a única espécie a produzir colónias de tom rosado a lilás. Contudo, este meio não consegue diferenciar as restantes espécies, sendo necessário a realização de mais testes para a diferenciação ao nível de espécie (BIO-RAD, 2008).

Tabela 6. Cor desenvolvida e aspecto das leveduras do género *Candida* crescidas no meio CandiSelect® 4 (BIO-RAD, 2008).

Levedura	Coloração e aspecto das colónias
<i>C. albicans</i>	Rosa a Lilás
<i>C. tropicalis</i>	Azul turquesa intenso, esféricas e lisas
<i>C. glabrata</i>	Azul turquesa pálido com centro negro, brilhantes, achatadas e lisas
<i>C. krusei</i>	Azul turquesa, rugosas e irregulares
Outras espécies	Branco

ChromID *Candida*®

Todas as amostras clínicas provenientes da U.C.I.P. do Hospital de São Teotónio, Viseu, foram semeadas em meio chromID *Candida*®. As colónias de *C. albicans* são identificadas pela cor azul (Tabela 7) produzida devido à hidrólise do substrato pela hexaminidase correspondente.

Tabela 7. Cor desenvolvida pelas leveduras do género *Candida* crescidas no meio chromID *Candida*® (Guzel et al. 2011).

Levedura	Coloração das colónias
<i>C. albicans</i>	Azul
<i>C. tropicalis</i> , <i>C. lusitaniae</i> e <i>C. kefyr</i>	Rosa
Outras espécies	Branco

As espécies *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* e *C. kefyr* geram colónias de cor rosa e as restantes apresentam coloração branca. É um método muito rápido, sendo necessário apenas 24 horas de incubação a 37° C, e constitui um método muito directo para a

identificação de *C. albicans*, uma vez que é a única espécie que produz colónias azuis. Contudo, este meio não consegue diferenciar as restantes espécies, sendo necessário a realização de mais testes para a diferenciação ao nível de espécie (Guzel, 2011).

CHROMagar *Candida*[®]

Todas as amostras clínicas provenientes da Covilhã, e algumas amostras da Colecção Lisboa começaram por ser semeadas em meio CHROMagar *Candida*[®] que permite uma identificação presuntiva da espécie em causa, caso pertençam a uma das três espécies, *C. albicans*, *C. tropicalis* ou *C. krusei*. Cada uma destas espécies é directamente diferenciada pela sua coloração, derivada da redução do substrato pelas enzimas específicas de cada espécie (Tabela 8). *C. albicans* desenvolve colónias de cor verde distinguindo-se de *C. tropicalis* e de *C. krusei* por estas gerarem colónias de cor azul e rosa rugosa respectivamente. As restantes espécies originam colónias com coloração branca a rosa, como é o caso de *C. parapsilosis* e *C. glabrata*, o que dificulta a interpretação deste teste (Araújo *et al.* 2005; Barbedo & Sgarb 2010).

Tabela 8. Cor desenvolvida pelas leveduras do género *Candida* crescidas no meio CHROMagar *Candida*[®] (Barbedo & Sgarb 2010).

Levedura	Coloração das colónias
<i>C. albicans</i>	Verde
<i>C. tropicalis</i>	Azul
<i>C. krusei</i>	Rosa, rugosa
Outras espécies	Branco a violeta

No entanto, após 24 a 48 h de incubação, o teste permite realizar uma identificação presuntiva de algumas espécies mais frequentemente isoladas de infecções com base na cor e na textura das colónias (Shepard *et al.* 2008). Uma vez que este tipo de metodologia depende por vezes da interpretação do observador, e que as espécies próximas *C. albicans* e *C. dublinensis* podem ser muito facilmente confundidas devido a ambas desenvolverem pigmento verde, torna-se necessário realizar o Teste da Filamentação para confirmação da identificação.

Teste da Filamentação

As leveduras provenientes dos quatro hospitais (Covilhã, Lisboa e Viseu) foram então submetidas ao Teste da Filamentação para identificar as estirpes capazes de produzir tubo germinativo.

Num tubo *ependorf* de 1,5 mL com cerca de 200 μ L de soro humano, inoculou-se uma pequena porção de cultura da levedura com uma ansa esterilizada, desfazendo lentamente a levedura num pouco de soro, de forma a obter uma suspensão homogénea. Para tal, humedeceu-se a levedura na parede interior do tubo *ependorf*, na zona mais próxima da superfície do líquido e, aos poucos, liquefez-se a porção da colónia da levedura, adicionando pequenas quantidades de soro, até se obter uma suspensão cada vez mais líquida e homogénea. Em seguida, com o auxílio de uma ansa, homogeneizou-se toda a suspensão e agitou-se no vórtex. A suspensão foi então incubada à temperatura de 37°C durante um período de cerca de 2 horas e 30 minutos, sem nunca ultrapassar as 3 horas. Findo esse tempo, observou-se um pouco da suspensão ao microscópio, entre lâmina e lamela. As leveduras que desenvolveram tubo germinativo pertencem à espécie *C. albicans* (Figura 4A); as que não o apresentam (Figura 4B), pertencem a outra espécie e a sua identificação requer a realização de outros testes.

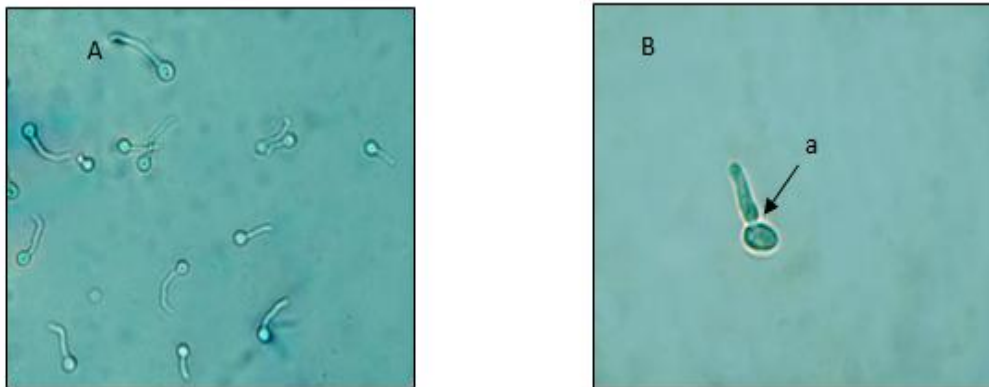


Figura 4. (A) Teste da blastese de uma estirpe de *C. albicans*. Observação de tubos germinativos após 2h30m de incubação em soro humano. (B) Teste da blastese de uma estirpe de *Candida* não-*albicans* (incubação >3h). A observação de pseudofilamentos (a) pode levar à identificação de falsos positivos de *C. albicans*.

Torna-se necessário ter alguns cuidados na realização desta prova para que os resultados sejam fidedignos: (i) as colónias utilizadas devem ser jovens para não transferir para o soro verdadeiras hifas, o que induziria a falsos positivos; (ii) a suspensão não deve ser demasiado densa uma vez que a capacidade de produção de tubos germinativos é inversamente proporcional à quantidade de inóculo de levedura; (iii) a incubação não deve exceder as 3 horas para que leveduras não-*albicans* produzam pseudofilamentos (que apresentam constrição) que induzem a falsas identificações de *C. albicans*.

Esta prova consiste num teste muito fácil, rápido e económico mas não constitui um método 100% fiável para identificar a espécie *C. albicans*, pois sabe-se que cerca de 5% das leveduras desta espécie não filamentam nestas condições.

Bichro-Latex *Albicans*[®]

A alguns isolados da cidade da Covilhã que deram resultados ambíguos ou inconclusivos com o Teste da Filamentação, foi confirmada a identificação de *C. albicans* utilizando o teste Bichro-Latex *Albicans*[®] (Fumouze). Este teste somente foi efectuado para um pequeno número de isolados, não só pelo seu custo ser elevado, como também por o teste da filamentação se ter revelado bastante eficiente na grande maioria dos casos.

O Bichro-Latex *Albicans*[®] está comercialmente disponível sob a forma de *kit* e a sua execução segue as instruções do fabricante. Retirou-se uma pequena porção da colónia a identificar e homogeneizou-se num pouco do agente dissociante incluído no *kit*. A esta suspensão adicionou-se o reagente contendo partículas de látex sensibilizadas por um anticorpo monoclonal específico para *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Caso a levedura seja de uma destas espécies, ocorre aglutinação entre os blastósporos que possuem o antígeno e as partículas de látex. A positividade da reacção é visível à vista desarmada quando se formam aglutininas vermelhas em contraste com a suspensão verde de base (Figura 5A), e demonstra a presença das espécies *C. albicans* ou *C. dubliniensis*. Com as restantes espécies do género *Candida* não se observa essa reacção

de aglutinação pelo que a suspensão mantém-se homogénea, com uma cor castanha (Figura 5B).

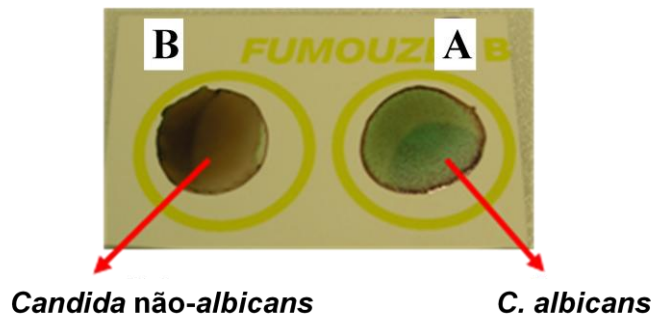


Figura 5. Identificação de *C. albicans* pelo teste Bichro-Latex Albicans[®]. (A) Reacção positiva identificadora de *C. albicans*. (B) Reacção negativa correspondente a *Candida não-albicans*.

Identificação Bioquímica

VITEK[®]

Os isolados clínicos provenientes dos Hospitais: da Covilhã (Centro Hospitalar Cova da Beira E.P.E.) e de Viseu (Hospital de São Teotónio) foram igualmente identificados usando o sistema comercial automatizado VITEK[®] (bioMerieux), como demonstrado nas figuras 6A e 6B. A carta de identificação de leveduras (YST) foi concebida para ser utilizada com o sistema VITEK[®], para a identificação das leveduras mais frequentemente isoladas.

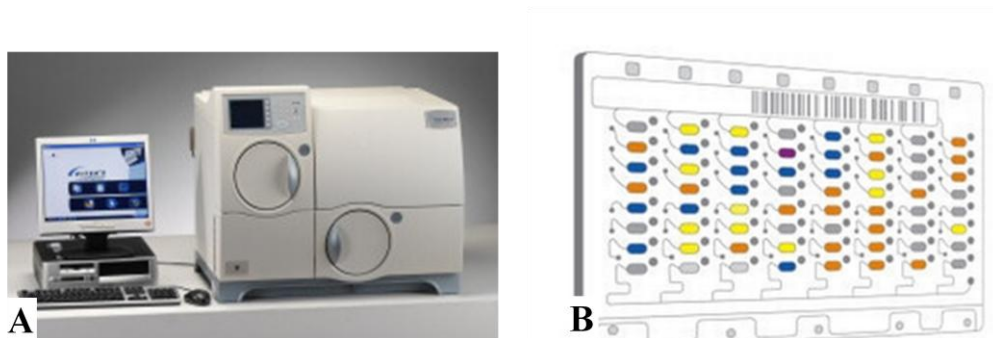


Figura 6. (A) Sistema automatizado VITEK[®], bioMerieux utilizado em hospitais para a identificação convencional de microrganismos. (B) Carta contendo os diferentes compostos utilizados na identificação dos microrganismos e sensibilidade aos antibióticos.

Preparação das amostras: as leveduras a identificar devem ter origem em culturas puras, com 18 horas no mínimo e 48 horas no máximo. Após obtenção da cultura, retira-se a carta YST da embalagem e identifica-se o tubo com o código de barras correspondente ao número da cultura a identificar.

Preparação do inóculo: é preparada uma suspensão com uma concentração entre 1,8 a 2,5 da escala de *McFarland*. Para tal, adiciona-se 3 mL de solução salina estéril a um tubo VITEK® e com uma ansa esterilizada, repicam-se colónias isoladas do meio sólido. Emulsiona-se um pouco da colónia da levedura na solução alcalina com um movimento circular e homogeneiza-se a suspensão no vortex. A turvação da suspensão é ajustada no colorímetro VITEK®.

Inoculação da carta de identificação: insere-se o tubo de transferência da carta VITEK® na suspensão, de forma a ficar completamente imerso. Coloca-se a carta na câmara de enchimento e pressiona-se em *Iniciar enchimento*. Aguarda-se a indicação sonora do aparelho, indicadora de que o processo de enchimento está terminado. Retira-se o módulo, verifica-se se o enchimento da carta foi correctamente efectuado e por fim transfere-se o módulo para a câmara de leitura/incubação das cartas VITEK®.

Incubação/Leitura de resultados: o Leitor/Incubador guarda as cartas de teste inoculadas com as amostras num ambiente de temperatura controlada e lê as cartas de hora a hora por meio de sensores fotométricos. O Leitor/Incubador detecta as alterações na cor e turvação indicando depois esses dados no computador que transmite automaticamente os resultados finais dos testes de cada carta.

MicroScan WalkAway®

Os isolados clínicos provenientes de Lisboa (Hospital Santa Maria E.P.E. e Instituto Português do Oncologia), além da identificação presuntiva (teste da blastese e meio cromogénico) foram igualmente identificados usando o sistema comercial automatizado MicroScan WalkAway®.

Preparação das amostras: as leveduras a identificar devem ter origem em culturas puras, em gelose de Sabouraud³, com 48 horas de incubação a 30°C, ou com 48 a 72 horas de incubação a 25°C (temperatura ambiente).

Preparação dos painéis: após a remoção do painel da bolsa maleável, permitir que os painéis atinjam a temperatura ambiente antes da rehidratação. Os painéis não deverão ser utilizados na ausência ou em caso de danos no dessecante ou se a integridade da embalagem tiver sido comprometida (não selada, perfurada ou rasgada).

Preparação do inóculo: com o auxílio de uma zaragatoa esterilizada ou uma ansa de inoculação, remove-se as colónias do meio de cultura e emulsiona-se em 3 mL de Água de inóculo. Cada suspensão deve ser comparada e ser equivalente ao Padrão de turvação de levedura MicroScan^{®4}. Posteriormente agita-se, manualmente ou no vortex, até que a suspensão se apresente homogénea. Pode acontecer que algumas estirpes de leveduras não se dispersam imediatamente em água. Assim, se tal suceder, deixa-se a suspensão repousar durante 10-15 minutos e agita-se novamente no vortex. A turvação do sobrenadante deve corresponder à do Padrão de turvação de levedura MicroScan[®]. Em caso negativo, transferir uma quantidade adicional de cultura para a água de inóculo e repetir o procedimento anterior.

Inoculação do painel de identificação: antes de os painéis serem inoculados, devem estabilizar à temperatura ambiente. Rotula-se o painel com a identificação da amostra e adiciona-se 50 µL de suspensão da levedura em cada um dos poços com substrato e nos poços de controlo BNAC e NPC. Não devem ser utilizadas pipetas Pasteur para a

³ O fabricante recomenda a não utilização de: meios cromogénicos, meios com antibióticos, sangue, gelose de Extracto de Levedura – Extracto de Malte (YM - Yeast Extract-Malt Extract) e meios com cicloheximida (IMA - Inhibitory Mold Agar), uma vez que podem influenciar os resultados no equipamento.

⁴ A comparação entre a suspensão de inóculo do teste e o Padrão de turvação de levedura deve ser efectuada utilizando uma fonte de luz adequada e através da comparação dos tubos contra um cartão branco com linhas negras contrastantes.

inoculação. Após a inoculação do painel aplicam-se ligeiras pancadas em ambos os lados do painel para ajudar a assegurar a mistura com o substrato.

Incubação: os painéis são incubados durante 4 horas a 35 - 37°C num incubador sem CO₂, em grupos de 3 a 5 com uma tampa sobre o painel do topo para evitar evaporação.

Leitura de resultados: A leitura dos painéis é efectuada utilizando luz reflectida numa superfície com fundo branco. O WalkAway[®] efectua a leitura dos poços que não necessitam da adição prévia de reagentes, de modo a prevenir a produção de resultados alterados devidos a vapores do reagente que possam ficar retidos sob a tampa do tabuleiro. Deste modo as reacções bioquímicas não podem ser verificadas manualmente. Passado o tempo de incubação, aos pocetos que necessitam, adiciona-se os reagentes Peptidase (colocado à temperatura ambiente previamente) e NaOH.

Adiciona-se 1 gota de Peptidase aos poços BNAC, HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY e HIS e aguardam-se 30 segundos para que a reacção cromática seja revelada. A leitura não deve ser efectuada mais do que 3 minutos após a adição da Peptidase porque as cores dos poços tendem a escurecer com o tempo. As cores devem ser comparadas ao poço BNAC (controlo de β-naftilamida) que deve possuir cor amarela. Caso contrário, não se deve usar este reagente. A presença de qualquer tonalidade rosa ou vermelho na solução através do poço inteiro ou qualquer porção do poço é interpretada como positivo. Alguns poços podem apresentar uma coloração laranja, mais escura que a do poço BNAC. Estes devem ser registados como negativos.

Aos poços AGL2, BDF, AGAL, NPC, NAG, CELL e NGAL adiciona-se 1 gota de NaOH. Aguarda-se pelo menos 5 segundos, mas não mais de 5 minutos, antes de registar os resultados. A comparação das cores deve ser feita com o poço NPC (controlo de nitrofenil), o qual deverá apresentar-se incolor. Qualquer tonalidade de cor amarela deve ser registada como um resultado positivo.

Após os períodos de espera posteriores à adição de reagentes, os painéis são colocados no AutoScan-4 para análise dos resultados. Esta leitura é efectuada com o auxílio do MicroScan Microdilution Viewer (St. Germain & Beauchesne 1991).

Para a identificação de organismos testados desconhecidos é utilizado o livro de código dos biótipos de levedura MicroScan[®]. O Livro de código de leveduras baseia-se numa análise informática dos 27 testes do Painel de identificação rápida de leveduras. Os resultados são alterados para um número de biótipo com 9 dígitos, que corresponde a uma identificação da espécie e uma probabilidade relativa cumulativa de identificação. São impressas todas as identificações possíveis por ordem descendente de probabilidade, até ser obtido um total cumulativo de 99.9%. Se existir um número de biótipo que não esteja presente no Livro de código, deve-se suspeitar de um erro de procedimento, como número de biótipo incorrecto ou uma determinada reacção registada de forma errónea. Se o número de biótipo estiver correcto, deve-se verificar a possibilidade de existência de uma cultura mista. Deste modo, o organismo deve ser novamente testado.

Tipagem de estirpes de *Candida albicans* pelo método de PCR, com base nos polimorfismos da região 25S rDNA e das sequências ALT/RPS

Extracção de DNA de fungos leveduriformes pelo método das microesferas

O DNA de cada isolado clínico foi extraído de acordo com o método das microesferas (SIGMA, ref^o: G8772-100G). Este método inclui dois tipos de lise que permitem a obtenção de DNA em grande quantidade: lise mecânica providenciada pelas microesferas de vidro, e lise química, provocada pelo tampão de lise.

A extracção foi realizada a partir de repicagens de amostras congeladas em meio líquido Sabouraud com 50% de glicerol. Estas culturas foram incubadas durante 48 horas, a 30°C e após o crescimento procedeu-se à extracção do DNA.

Num tubo Eppendorf de 1,5 mL, com um volume de 200 μ L de esferas de vidro de 0,4-0,6 mm de diâmetro, colocaram-se 500 μ L de Tampão de Lise⁵. Seguidamente efectuou-se uma suspensão celular muito densa a partir das culturas previamente repicadas. Esta suspensão foi submetida a uma agitação forte no vórtex durante 5 minutos, de forma a ocorrer lise mecânica. Após esta agitação, a suspensão foi colocada num banho a 65°C por 1 hora, desta vez para permitir a lise química. Terminado o tempo, a suspensão foi novamente agitada no vórtex durante 5 minutos para reforçar a lise mecânica, e centrifugada numa centrífuga de bancada *Heraeus Biofuge* durante 10 minutos a 13 000 rpm para separação dos resíduos celulares.

Finalmente, o sobrenadante resultante da centrifugação e que continha o DNA foi recuperado e colocado num novo tubo Eppendorf e guardado a -20° C. Nestas condições o DNA mantém-se estável por mais de um ano.

⁵ Tris 50 mM, NaCl 250 mM, EDTA 50 mM, SDS 0,3 % (p/v), pH 8

Preparação do DNA para PCR

De forma a usar o DNA extraído numa reacção de PCR realizou-se uma diluição de 1:750 em tampão Tris-HCl, ou seja, num tubo Eppendorf de 1,5 mL pipetou-se 1500 µl de água Braun e adicionou-se 20 µL do DNA. Posteriormente congelou-se esta diluição a -20° C de forma manter a sua estabilidade por alguns meses.

Primers utilizados na reacção de PCR

Para a amplificação da região 25S do rDNA usou-se um par de primers específico denominado P-I (CA-INT-L/CA-INT-R); para a determinação do número de repetições de ALT utilizou-se o par de primers específico ASDcF/pCSCR, denominado P-II; e para a determinação do rearranjo dos tipos Aa e Ac da região ALT nas estirpes estudadas utilizou-se o par de primers específico AS-I (ASaF13/AScR135). As sequências oligonucleotídicas referentes a cada par de primers encontram-se descritas na Tabela 9.

Tabela 9. Sequência oligonucleotídica dos primers P-I, P-II e AS-I (Hattori *et al.* 2009).

	Primers	Sequência nucleotídica (5'–3')
P-I	CA-INT-L (<i>forward</i>)	ATAAGGGAAGTCGGCAAATAGATCCGTAA
	CA-INT-R (<i>reverse</i>)	CCTGGCTGTGGTTTCGCTAGATAGTAGAT
P-II	ASDcF (<i>forward</i>)	TGATGAACCACATGTGCTACAAAG
	pCSCR (<i>reverse</i>)	CGCCTCTATTGGTCGAGCAGTAGTC
AS-I	ASaF13 (<i>forward</i>) ⁶	ATGTCCGTTGAAGACTGCGCGATGAAAAAT
	AScR135 (<i>reverse</i>) ⁷	GATGCAGTTAAATCTCGTTTTTAACAGTG

⁶ Primer específico para o tipo de ALT “a”

⁷ Primer específico para o tipo de ALT “c”

Condições para reacção de PCR

A mistura reaccional para a amplificação da região 25S do rDNA, para a determinação do número de repetições de ALT e para a determinação do arranjo dos tipos de ALT, Aa e Ac, presentes em cada isolado clínico, foi idêntica para cada uma das três reacções de PCR e encontra-se descrita na tabela 10.

Tabela 10. Mistura reaccional utilizada nas reacções de PCR para a amplificação da região 25S do rDNA e das sequências ALT/RPS de isolados clínicos da espécie *C. albicans*.

Solução Stock	Concentração final	Volume por tubo (µL)
Água bidestilada Braun	-	11,5
Tampão 10x	1x	2,5
MgCl ₂ 25 mM	3,5 mM	4,0
dNTP's 2 mM cada	250 µL cada	2,5
Primers 5 µM	0,8 µM	1,5 forward + 1,5 reverse
Taq polymerase	2,5 U/µL	0,5
DNA 1:750	1:750	1,0

As condições das reacções de PCR foram também iguais para as três reacções. Foram realizadas num termociclador Tpersonal Combi (Biometra) e iniciaram-se com um pré-aquecimento ocorrendo desnaturação do DNA, a uma temperatura de 96°C durante 2 minutos seguida de mais 30 segundos a 96°C, para que fosse possível a ligação dos primers com a cadeia alvo do DNA. A hibridação dos primers foi realizada a 65°C durante 5 segundos, seguindo-se a extensão a 74°C por 2 minutos, repetindo-se este processo durante 30 ciclos. A extensão final ocorreu a 74°C durante 30 segundos, estando todo o processo esquematizado na Tabela 11.

Tabela 11. Programa de PCR usado na amplificação da subunidade 25S do rDNA dos isolados clínicos da leveduras da espécie *C. albicans*.

Fase do PCR	Pré-aquecimento	x30			Extensão final
		Desnaturação	Hibridação	Extensão	
Temperatura	96° C	96° C	65°C	74° C	74° C
Tempo	2 minutos	30 segundos	5 segundos	2 minutos	30 segundos

Detecção dos produtos amplificados

Os produtos amplificados foram detectados por electroforese em gel de agarose e corados por incorporação de Brometo de Etídio. O gel de agarose, cuja composição se encontra descrita na Tabela 12, foi preparado de modo a obter um gel com 1,5% de agarose e um volume de 50 mL.

Tabela 12. Composição do gel de agarose para corrida e visualização dos produtos de amplificação da região 25S do rDNA e da região ALT/RPS dos isolados clínicos da leveduras da espécie *C. albicans*.

Gel de agarose a 1,5%	
Agarose	0,75 g
Tampão TBE a 10%	50 mL
Brometo de Etídio	3 μ L

Preparação do gel de agarose: a agarose foi pesada em balança analítica num Erlenmeyer e dissolvida em tampão TBE 0,5x por aquecimento até se obter uma mistura homogénea. Posteriormente pipetou-se o Brometo de Etídio e adicionou-se à mistura, vertendo-se de seguida para suporte próprio, e com o pente previamente colocado. Deixou-se polimerizar a agarose aproximadamente por 30 minutos. Para acelerar a polimerização pode-se colocar o suporte com a agarose a uma temperatura de 4°C. Depois de polimerizado colocou-se o gel na tina de electroforese previamente cheia de tampão TBE 0,5x.

Electroforese do gel de agarose: a cada 7 μ L de amostra foi adicionado 2 μ L de azul de bromofenol (tampão de carga) originado uma mistura azulada. Esta mistura foi aplicada no gel, assim como o marcador de pesos moleculares (GeneRuler DNA 100 pb - Invitrogen). A corrida foi iniciada com uma voltagem de 70V, durante 50 minutos, à temperatura ambiente.

Visualização dos produtos amplificados: as bandas resultantes dos produtos de PCR foram visualizadas num transiluminador de luz Ultra-Violeta e as imagens foram captadas e digitalizadas através do sistema UVIDoc[®] (UviTec, Alfagene). A Tabela 13 demonstra o tamanho do produto esperado e o genótipo (25S rDNA) correspondente, e a Tabela 14 demonstra a relação entre o tamanho do produto esperado e o número de repetições de ALT nas sequências RPS.

Tabela 13. Lista dos genótipos e dimensões dos produtos esperados após amplificação por PCR da região 25S do rDNA (Iwata *et al.* 2006).

Genótipo	Tamanho esperado do produto
A	450 pb
B	840 pb
C	450 pb + 840 pb
D (<i>C. dubliniensis</i>)	1040 bp
E	1080 pb

Tabela 14. Lista dos genótipos obtidos por PCR baseado nas sequências RPS/ALT. A dimensão dos produtos obtidos varia consoante o número de repetições de ALT na sequência RPS (Iwata *et al.* 2006).

Número de repetições de ALT	Tamanho esperado do produto
1	526 pb
2	698 pb
3	870 pb
4	1042 pb
5	1214 pb
6	1396 pb

Análise dos resultados: os perfis electroforéticos resultantes da corrida em gel de agarose foram analisadas por comparação visual. Através do marcador de pesos moleculares GeneRuler DNA 100 pb visualizou-se o tamanho aproximado dos produtos amplificados e comparou-se com o tamanho esperado dos produtos descrito na literatura. No entanto é de realçar que apesar de se poder observar a olho nu outras bandas, somente se convencionou seleccionar a(s) banda(s) mais intensa(s) que corresponde(m) ao nº de repetições de ALT mais frequente na totalidade dos cromossomas desse isolado.

Estudo da sensibilidade aos antifúngicos, pelo método de difusão em disco Kirby-Bauer

Preparação do meio de cultura

O meio de cultura mais indicado para o estudo da sensibilidade das leveduras aos antifúngicos é o meio de Mueller-Hinton. De acordo com as indicações da norma M44-A do CLSI, este meio deve possuir na sua composição 2% de glucose e 0,5 µg/mL de azul de metileno, o qual permite uma melhor definição aquando da visualização dos limites dos halos de inibição.

Preparação do inóculo

Foi preparada uma suspensão das leveduras a partir de algumas colónias em 500 µL de água bidestilada esterilizada, ou soro fisiológico esterilizado, de modo a que essa suspensão apresentasse uma turvação de 0,5 na escala de MacFarland, e conseqüentemente, possuísse entre 1 a 5×10^6 células/mL.

Inoculação das placas

Antes de se proceder à inoculação das suspensões, teve-se o cuidado de verificar se a superfície do meio Mueller-Hinton estava seca e de o ter colocado previamente à temperatura ambiente.

Posteriormente uma zaragatoa esterilizada foi imersa na suspensão tendo o cuidado de retirar o excesso de inóculo. Com a zaragatoa humedecida, inoculou-se na superfície do meio, em estrias apertadas e em três direcções diferentes de forma a cobrir homogeneamente toda a sua superfície, tendo atenção para não pressionar demasiado e danificar o meio.

Aplicação dos discos de Fluconazol e de Voriconazol

No presente trabalho utilizaram-se discos impregnados com Fluconazol e com Voriconazol (Becton Dickinson). Antes da sua aplicação esperou-se cerca de 5 minutos após a inoculação da suspensão de forma a que esta fosse absorvida pelo meio de cultura. Passados os 5 minutos, com o auxílio de uma pinça esterilizada aplicou-se um disco por placa de Petri tendo o cuidado de o pressionar ligeiramente contra a superfície do meio, de forma a assegurar um contacto completo e a evitar a formação de bolhas de ar entre o disco e o meio de cultura. As placas foram incubadas, invertidas, a 30°C durante 48 horas.

Leitura das placas

Impreterivelmente, após as 48 horas de incubação, foi feita a leitura dos resultados. Verificou-se se o crescimento era homogéneo e se as zonas de inibição possuíam halos uniformes e circulares.

O diâmetro dos halos de inibição e as CMI respectivas foram determinadas e registadas com o auxílio de sistema informático BIOMIC Expert-System[®] (Giles Scientific Inc.)

Interpretação dos resultados

Os critérios de interpretação dos halos de inibição e respectivas CMI's relativos ao Fluconazol e Voriconazol encontram-se descritos na tabela 15. As estirpes foram classificadas como:

Sensível (S): a infecção por uma estirpe desta categoria pode ser apropriadamente tratada com a dose de agente antimicrobiano recomendada.

Sensível dependendo da dose (SDD): estirpes para as quais a sensibilidade depende de se atingir a concentração sistêmica máxima possível de antifúngico.

Resistentes (R): estirpes que são inibidas pelas concentrações sistêmicas que se obtêm após a dose normal do agente antimicrobiano.

De acordo com a norma M44-P, quando as CMI's se encontram no limiar entre duas categorias, deverá classificar-se a sensibilidade do isolado na categoria superior.

Tabela 15. Critérios de interpretação dos halos de inibição e respectivas CMI's para o Fluconazol e o Voriconazol.

Antifúngico	Concentração de fármaco no disco (µg)	Diâmetro do halo de inibição			CMI equivalente (µg/mL)		
		R	SDD	S	R	SDD	S
Fluconazol	25	≤14	15-18	≥19	≤8	16-32	≥64
Voriconazol	2	≤13	14-16	≥17	≤1	2	≥4

Análise estatística

Entre as estirpes sensíveis aos antifúngicos, foi realizada uma comparação entre as susceptibilidades dos tipos mais comuns, A:2/3, A:3 e A:3/4 recorrendo ao teste estatístico One-Way ANOVA, através do software SPSS 16.0. Desta forma, será possível averiguar se existem estirpes mais ou menos sensíveis ao Fluconazol e/ou Voriconazol, e relacionar essa sensibilidade às diferentes zonas geográficas estudadas neste trabalho.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolados clínicos de *Candida albicans* de três zonas de Portugal: Covilhã, Lisboa e Viseu

Foram incluídos neste trabalho 60 isolados clínicos oriundos de quatro hospitais de três localidades diferentes de Portugal, do Centro Hospitalar Cova da Beira, E.P.E. na Covilhã, do Hospital Santa Maria E.P.E. e Instituto Português de Oncologia ambos em Lisboa e do Hospital de São Teotónio em Viseu. Todos os isolados tinham sido previamente identificados pela metodologia convencional estabelecida por cada instituição. As leveduras escolhidas para a realização deste trabalho foram seleccionadas aleatoriamente, tendo tido unicamente como critérios de selecção o facto de terem sido isoladas de infecções, preferencialmente sistémicas, e identificadas como pertencentes à espécie *Candida albicans*. Das várias espécies conhecidas de leveduras do género *Candida*, apenas uma pequena percentagem causa infecções em seres humanos. Segundo vários estudos anteriormente realizados, *C. albicans* é a espécie mais frequentemente isolada de infecções superficiais e invasivas a partir de diferentes locais anatómicos. Nestas infecções incluem-se as de foro hospitalar cuja incidência tem aumentado nos últimos anos (Araujo *et al.* 2005; Leaw *et al.* 2007; Hattori *et al.* 2009; Barbedo & Sgarb 2010).

Relativamente às faixas etárias, verificou-se que três quartos dos isolados provenientes da Covilhã foram obtidos de infecções de idosos ao contrário dos de Lisboa e de Viseu que na sua maioria incluem isolados clínicos provenientes de indivíduos com idades inferiores a 65 anos (Tabela 16).

Tabela 16. Número e percentagem de isolados clínicos obtidos em relação à idade dos doentes da Covilhã, Lisboa e Viseu a partir dos quais foram obtidos.

	Doentes idade < 65 anos		Doentes idade ≥ 65 anos	
	Nº de isolados	Percentagem	Nº de isolados	Percentagem
Covilhã	5	25%	15	75%
Lisboa	12	60%	8	40%
Viseu	14	70%	6	30%
Total	31	52%	29	48%

Entre as estirpes de Lisboa e de Viseu, as primeiras possuem maior número de isolados clínicos provenientes de indivíduos idosos. Segundo vários autores a diminuição da imunidade, característica em doentes com idade avançada, é motivo para o aparecimento de infecções por *C. albicans*, por natureza endógena (Gillespie & Bamford 2000; Sampaio *et al.* 2005; Bougnoux *et al.* 2006; Barbedo & Sgarb 2010). Esta situação, demonstrada na literatura, é congruente com os isolados provenientes da Covilhã, uma vez que 75% da amostra é constituída por doentes idosos. Os de Lisboa, por outro lado, são maioritariamente obtidos a partir de uma população mais jovem (60%). Contudo, estas estirpes são provenientes de amostras de doentes internados de uma instituição oncológica, o I.P.O. de Lisboa. Desta forma, os resultados encontram-se igualmente de acordo com a literatura, uma vez que doentes oncológicos, como são submetidos a quimioterapia, pertencem, tal como os doentes idosos, a um grupo de risco na medida em que o sistema imune se encontra igualmente fragilizado (Sampaio *et al.* 2005; Bougnoux *et al.* 2006; Barbedo *and* Sgarb 2010; Valle *et al.* 2010). Em relação aos isolados de Viseu verifica-se o mesmo que com os isolados de Lisboa: maior número de amostras provenientes de doentes com menos de 65 anos (70%). Uma vez que o Hospital de S. Teotónio não é uma instituição oncológica, os doentes oncológicos, em princípio, não deverão ser representativos. Enquanto nos outros três hospitais as amostras são provenientes de vários serviços hospitalares, os isolados clínicos de Viseu foram todos isolados de produtos biológicos oriundos de um só serviço, a U.C.I.P.⁸ (Unidade de Cuidados Intensivos Polivalente), que tem como função o diagnóstico e o tratamento de doentes em estado crítico, em situação de vida ou morte, mas em que existe a possibilidade de cura ou pelo menos a reversibilidade de parte da patologia. Assim sendo, são doentes que se encontram em estado de saúde grave, ao qual está associada uma vasta gama de situações patológicas, entre elas a baixa nas defesas imunitárias, constituindo igualmente deste modo, um grupo de risco para infecções sistémicas por *C. albicans*.

Como demonstrado na Tabela 17, dos 60 isolados clínicos incluídos no estudo, 34 (57%) foram isolados de doentes do sexo masculino e 26 (43%) do sexo feminino. Tanto nas estirpes da Covilhã como nas de Lisboa predomina o número de isolados

⁸ A U.C.I.P. tem como principais áreas de intervenção o choque séptico, a disfunção múltipla de órgãos, a falência respiratória, cirurgias que envolvem transplantes ou cirurgias com complicações graves.

provenientes do sexo masculino. Curiosamente, nas de Viseu a distribuição é equitativa, ou seja, o número de isolados procedentes de indivíduos do sexo masculino é igual ao número de isolados procedentes de indivíduos do sexo feminino. Segundo a autora Aline Grossi, que realizou um trabalho para observar a incidência de infecções por *Candida* sp. (Grossi, 2010), o sexo feminino possui maior prevalência em relação ao sexo masculino no que toca a infecções por leveduras do género *Candida*, o que é contraditório com os resultados obtidos no presente trabalho.

Tabela 17. Número e percentagem de isolados obtidos a partir do sexo masculino e sexo feminino provenientes da Covilhã, de Lisboa e de Viseu.

	Sexo Feminino		Sexo Masculino	
	Nº de isolados	Percentagem	Nº de isolados	Percentagem
Covilhã	9	45%	11	55%
Lisboa	7	35%	13	65%
Viseu	10	50%	10	50%
Total	26	57%	34	43%

Tanto o presente trabalho, como o estudo de Grossi (2010) possuem heterogeneidade ao nível do tipo de produtos biológicos embora, no trabalho da autora, 76,2% dos produtos biológicos tenham sido exsudados vaginais, o que influenciou directamente esses resultados, já que este tipo de produto é exclusivo do sexo feminino. No presente trabalho é de notar que em 60 amostras apenas duas são provenientes de exsudados vaginais (Tabela 18) e estes dados podem ser o motivo da discrepância de resultados entre os dois trabalhos.

Um outro estudo realizado no Brasil demonstrou resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho (Valle *et al.* 2010). Nesse trabalho, dos 171 pacientes incluídos no estudo, 90 (52,63%) pertenciam ao sexo masculino, e 81 (47,36%) ao sexo feminino, evidenciando uma maior prevalência do sexo masculino por infecções causadas por leveduras do género *Candida*. Tal como o presente trabalho e o trabalho de Grossi (2010), existe heterogeneidade de produtos biológicos, sendo que 30% das amostras correspondia a urina, a amostra biológica mais estudada. Este tipo de produto, ao contrário do exsudado vaginal, pode permitir o isolamento de leveduras causadoras

de infecção urinária a partir de ambos os sexos, e como tal pode ser um motivo para a existência de um maior número de isolados provenientes do sexo masculino nesse trabalho.

Tabela 18 Número e percentagem de isolados obtidos a partir dos produtos biológicos provenientes da Covilhã, de Lisboa e de Viseu.

Produto biológico	Covilhã		Lisboa		Viseu	
	Nº isolados	Percentagem	Nº isolados	Percentagem	Nº isolados	Percentagem
Aspirado brônquico	1	5%	-	-	20	100%
Cateter	1	5%	-	-	-	-
Expectoração	5	25%	-	-	-	-
Exsudado	3	15%	-	-	-	-
Exsudado vaginal	2	10%	-	-	-	-
Fezes	1	5%	-	-	-	-
Hemocultura	1	5%	20	100%	-	-
Urina	6	30%	-	-	-	-

Como já referido anteriormente, para a realização deste trabalho, foram seleccionados vários isolados provenientes de diferentes produtos biológicos. O grupo de estirpes provenientes da Covilhã (n=20) é constituído por isolados clínicos de *C. albicans* oriundos de diferentes amostras clínicas provenientes de vários serviços do Centro Hospitalar Cova da Beira, E.P.E., seleccionadas aleatoriamente (Tabela 18). O produto biológico mais analisado neste conjunto de amostras foi urina (n=6), constituindo este produto 30% da amostragem, seguida de expectoração (n=5). De acordo com a literatura, *C. albicans* é a levedura mais isolada a partir de urina, ocupando o 4º lugar nas infecções nosocomiais do tracto urinário em meio hospitalar e a menos isolada a partir de hemoculturas (Gomes *et al.* 2010). Estes dados são coincidentes com o número de isolados provenientes da Covilhã: maior número de urinas positivas e menor número de hemoculturas positivas.

Tanto os isolados provenientes de Lisboa como os de Viseu são oriundos de um único tipo de produto biológico, sendo que o primeiro conjunto é composto apenas por

hemoculturas (n=20) oriundas de diversos serviços do Instituto Português de Oncologia (IPO) e do Hospital Santa Maria, E.P.E. O segundo conjunto é apenas composto por aspirados brônquicos (n=20) isolados a partir de doentes internados na U.C.I.P. (Unidade de Cuidados Intensivos Polivalente) do Hospital de S. Teotónio.

Nos últimos anos, vários autores têm descrito um aumento acentuado de casos de candidémia, principalmente em doentes de risco: transplantados, doentes oncológicos, sob terapia com corticóides ou antibióticos de largo espectro e doentes com SIDA (Bougnoux *et al.* 2006; Barbedo & Sgarb 2010). O facto do conjunto de Lisboa ser constituído por isolados provenientes de uma instituição com doentes “de risco”, o I.P.O., refuta esta afirmação uma vez que a população abrangente é constituída apenas por doentes oncológicos a realizar quimioterapia e com as defesas imunitárias diminuídas, como referido anteriormente.

Em relação ao conjunto de isolados de Viseu, estes provêm apenas de doentes de um serviço, a U.C.I.P. Este tipo de serviço, ao albergar doentes de risco em situações patológicas complicadas, nomeadamente baixas nas defesas imunitárias, é várias vezes associado a fenómenos de infecções nosocomiais. A imunodepressão dos doentes associada ao elevado número de intervenções invasivas, como ventilação no próprio serviço, colocação de cateteres ou cirurgias, aumenta a probabilidade de microrganismos oportunistas se reproduzirem e se multiplicarem em zonas estéreis, como é o caso do tracto respiratório baixo. Num estudo realizado num Hospital Público Universitário verificou-se que, a seguir à urina, os produtos a partir dos quais se isolava *Candida* sp. eram provenientes do tracto respiratório baixo, como o lavado bronco-alveolar (Valle *et al.* 2010). Desta forma verifica-se que é muito comum a colonização de leveduras *C. albicans* em produtos estéreis, devido a situações de imunodepressão associadas à natureza oportunista desta levedura, as quais são detectadas muito frequentemente em serviços como a U.C.I.P.

Identificação dos isolados pela metodologia convencional

Meios Cromogénicos

Nas três diferentes zonas geográficas de Portugal, de onde foram provenientes as amostras incluídas neste estudo, os Laboratórios de Patologia Clínica dos vários hospitais utilizam diferentes tipos de meios cromogénicos para a identificação das diferentes espécies, a qual se baseia na observação da cor que as colónias desenvolvem quando crescem em determinados meios de cultura.

As estirpes da Covilhã e de Lisboa foram semeadas no meio de cultura cromogénico CHROMagar *Candida*[®] para posteriormente se proceder à identificação presuntiva das leveduras (Figura 7). Este meio tem sido muito usado pelos laboratórios de diagnóstico dos hospitais com grande volume diário de amostras para a identificação de leveduras directamente a partir de amostras clínicas, na medida em que permite, directamente a partir da própria primocultura, simultaneamente o isolamento e a diferenciação de algumas espécies mais frequentes do género *Candida*. Segundo o fabricante, a especificidade e sensibilidade para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* excedem os 99%.

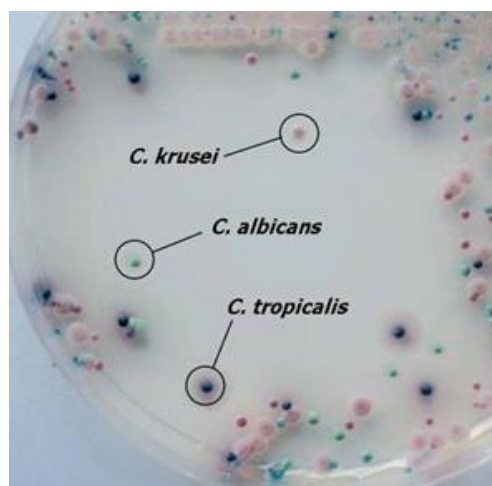


Figura 7. Representação do aspecto e da cor característica das colónias de cada espécie, identificadas pelo meio cromogénico CHROMagar *Candida*.[®] (Frilabo, 2006).

Os autores Odds & Bernaerts (1994), após a identificação de *C. albicans*, no seu trabalho, pelas suas colónias típicas de cor verde, consideram não ser necessário prosseguir com mais nenhum tipo de teste para confirmar a identificação realizada pelo meio CHROMagar *Candida*[®]. Esta afirmação, no nosso ponto de vista, é um pouco arriscada uma vez que, num outro estudo, entre os 34 isolados de *C. albicans* que foram cultivados em meio CHROMagar *Candida*[®], 88,2% (n=30) mostraram características morfológicas e pigmentação das colónias compatíveis com esta espécie, enquanto quatro deles apresentaram-se indefinidos. Embora exista uma elevada taxa de concordância com os métodos convencionais descritos no estudo (métodos bioquímicos, teste da blastese), esta concordância não é total, ou seja, não é 100% (Araujo *et al.* 2005).

Num estudo efectuado por Guzel *et al.* (2011), em 108 isolados identificados como *C. albicans*, 30 (25,4%), 96 (81,4%) e 105 (89%) produziram colónias de tonalidade verde típica da espécie às 24, 48 e 72 horas respectivamente. De acordo com o fabricante, entre as 24 e as 48 horas é possível fazer uma identificação presuntiva dos isolados. De acordo com os resultados apresentados por Guzel *et al.* (2011) a sensibilidade dos testes é superior se a leitura for realizada entre as 48 e as 72 horas. Nesse mesmo trabalho, dos 108 isolados não se observou crescimento em 7 casos (5,9%) e 5 isolados produziram colónias de tonalidade violeta, que é indicativa de qualquer espécie fúngica que não seja *C. albicans*, *C. tropicalis* ou *C. krusei* (Guzel *et al.* 2011). Desta forma, uma pequena percentagem dos isolados apresentou resultados falsos negativos o que, numa perspectiva clínica pode induzir a um diagnóstico errado e, consequentemente, a terapêutica seleccionada pode não ser a mais correcta. Assim, apesar de ser fácil e barato, este método revela ser meramente presuntivo e não substitui um método de identificação mais convencional (Odds & Bernaerts 1994).

Para a identificação de alguns isolados de Lisboa foi também utilizado o meio CandiSelect[®] (Figura 8). A sua sensibilidade e especificidade para a identificação de *C. albicans*, segundo alguns autores, é de 99,65% e 97,08% respectivamente (Foongladda *et al.* 2002). Segundo um estudo realizado por Sendid *et al.* (2007), após 24 horas de incubação no meio CandiSelect[®], todos os isolados previamente identificados como *C. albicans* pelos métodos convencionais produzem colónias de cor rosa, tonalidade típica desta espécie, permitindo realizar assim uma identificação directa. Após 48 horas de

incubação, 48 (80%) dos 60 isolados identificados como *C. glabrata*, produziram colónias achatadas e lisas brilhantes, e de cor azul-turquesa pálido com centro negro; dos 25 isolados identificados como *C. tropicalis*, 17 (68%) produziram colónias esféricas e lisas, de cor azul-turquesa intenso; e dos 12 isolados identificados como *C. krusei*, 11 (91,6%) produziram colónias rugosas e irregulares de cor azul-turquesa. Este mesmo estudo comprovou não existirem diferenças significativas no que toca à identificação, directa ou presuntiva, das espécies entre os meios CHROMagar *Candida*[®] e CandiSelect[®], às 48 horas de incubação. Demonstrou, contudo, que o meio CandiSelect[®], às 72 horas de incubação, é significativamente melhor do que o meio CHROMagar *Candida*[®] pois permite uma identificação mais acurada das espécies (Sendid *et al.* 2007).

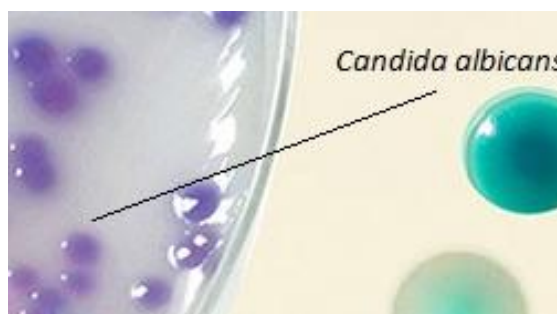


Figura 8. Representação do aspecto e da cor característica das colónias da espécie *C. albicans*, identificadas pelo meio cromogénico CandiSelect[®] 4 (BIO-RAD, 2008).

Embora, de acordo com os autores Sendid *et al.* (2007), o meio CandiSelect[®] seja um método fiável para a identificação directa de *C. albicans*, apenas permite realizar uma identificação presuntiva das espécies *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, sendo necessário a realização de mais testes para confirmação destas identificações, bem como da identificação de outras espécies que porventura cresçam.

As estirpes provenientes do hospital de Viseu foram identificadas com o meio cromogénico ChromID *Candida*[®] (Figura 9). Num estudo efectuado por Guzel *et al.* (2011) foi demonstrado que às 24 horas de incubação, a sensibilidade deste teste era de 64,4% e às 72 horas era de 94,1%. Embora se possa fazer uma leitura às 24 horas, de acordo com os resultados apresentados é mais acertado aguardar até às 72 horas, uma vez que a fiabilidade do teste é maior após este período (Guzel *et al.* 2011). Nesse

estudo, algumas colónias (n=2) de *C. tropicalis* produziram cor azul em vez da esperada cor rosa demonstrando resultados falsos positivos para *C. albicans*. Ainda que em número reduzido, esta situação deve servir de alerta uma vez que num laboratório clínico não existe margem para erros em relação ao diagnóstico clínico de doentes.

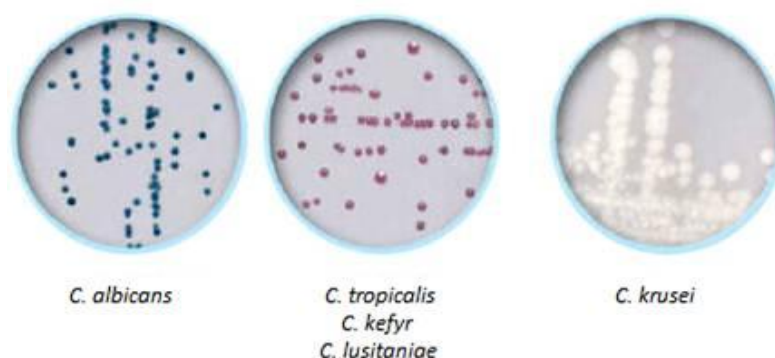


Figura 9. Representação do aspecto e da cor característica das colónias de cada espécie, identificadas pelo meio cromogénio ChromID *Candida*[®] (Guzel *et al.* 2011).

Num outro estudo realizado pelos mesmos autores, em 119 isolados identificados como *C. albicans*, provenientes de exsudados vaginais, 108 (90,8%) produziram as esperadas colónias azuis, e 10 (8,4%) produziram colónias brancas após as 72 horas. Embora a percentagem de colónias correctamente identificadas como *C. albicans* seja superior a 90%, uma pequena parte, porém razoável, produziu resultados falsos negativos dado que colónias brancas não são indicativas de *C. albicans* (Guzel *et al.* 2011). Nesse mesmo estudo, dos 47 isolados identificados como *C. tropicalis*, 6 (12,8%) produziram as esperadas colónias rosas, 10 (21,3%) produziram colónias azuis (típicas de *C. albicans*) e 30 (63,8%) produziram colónias brancas, indicativas de todas as restantes espécies fúngicas. Como consequência, verificaram-se novamente situações de identificação errónea que, embora em número de reduzido, na prática de um laboratório clínico pode levar a graves consequências relativamente ao diagnóstico e ao tratamento de doentes.

Assim, estes dados demonstram que o chromID *Candida*[®] não constitui um meio fiável para a identificação de isolados de *Candida* sp. ao nível de espécie e que é necessário realizar sempre testes complementares para a sua correcta identificação.

Em suma, os meios cromogénicos CHROMagar *Candida*[®], CandiSelect[®] e chromID *Candida*[®] constituem métodos fáceis e rápidos de identificação de leveduras do género *Candida* muito vantajosos em laboratórios clínicos onde o volume de trabalho diário é muito elevado. Contudo, esta metodologia revelou baixa especificidade pois alguns isolados foram identificados como pertencendo a espécies diferentes a partir das cores das colónias, assim como baixa sensibilidade quando, nos casos de culturas mistas numa mesma colónia levavam à produção de cores pouco definidas. Outra característica desfavorável deste tipo de metodologia é que a leitura dos resultados depende basicamente da capacidade de interpretação do operador. Para além de poder haver técnicos com um certo grau de daltonismo que poderão confundir as cores das colónias, temos ainda a interpretação pessoal por vezes não concordante entre o azul-esverdeado e o verde-azulado entre duas pessoas sem perturbações na visão das cores. Como tal, a identificação realizada com base em meios cromogénicos apenas deverá servir como teste presuntivo sendo indicada a utilização de outras técnicas de identificação mais sensíveis e específicas para a identificação definitiva dos isolados clínicos (Odds & Bernaerts 1994; Hospenthal *et al.* 2006).

Por este motivo, foi efectuado o Teste da Blastese com todos os isolados incluídos neste trabalho, à excepção das estirpes isoladas em Viseu. E ainda no caso dos resultados não concordantes para *Candida albicans*, foi feito o teste de aglutinação Bichro-Latex *Albicans*[®] (Fumouze) com as estirpes provenientes da Covilhã para confirmação da identificação.

Teste da Blastese (ou Teste da Filamentação)

Dos três grupos de isolados estudados, apenas os de Viseu não foram submetidos ao Teste da Blastese. Este foi considerado positivo nos isolados em que se verificou a formação de tubo germinativo após 2 horas e 30 minutos de incubação em soro/plasma humano, a 37°C. Os resultados obtidos com os isolados da Covilhã e de Lisboa encontram-se representados na Tabela 30 e na Tabela 31, respectivamente, do Anexo II. Das 20 leveduras estudadas provenientes da Covilhã, 19 (95%) formaram tubo germinativo. De acordo com a literatura, cerca de 5% das leveduras *Candida albicans*

podem não formar tubo germinativo (Kwon-Chung & Bennet 1992), sendo coincidente com os resultados obtidos.

Num trabalho efectuado por Quindos *et al.* (1997), em 510 isolados de *C. albicans*, 22 não produziram tubo germinativo. Em consequência, esses autores realizaram outro teste (Bichro-Latex Albicans[®]) a estes isolados para confirmar se pertenciam realmente à espécie *C. albicans*. Assim, e de acordo com a literatura, aquele isolado da Covilhã que, neste trabalho, tinha sido negativo para o teste da filamentação foi posteriormente submetido ao teste Bichro-Latex Albicans[®] (Fumouze) e foi deste modo confirmada a sua identificação.

Entre os 20 isolados clínicos provenientes de Lisboa, 2 isolados não apresentaram formação de tubo germinativo, os quais constituem 10% da amostragem. Neste caso, os resultados obtidos excedem o que está descrito na literatura. No entanto é de notar que o número de amostras é baixo e como tal, por ser pouco significativo, pode não reflectir a realidade.

Bichro-Latex Albicans[®]

Ao isolado proveniente da Covilhã que não produziu tubo germinativo, foi realizado o teste Bichro-Latex Albicans[®] para identificação, como referido anteriormente. Foi possível, com este teste, a visualização de aglutinação do látex sensibilizado, revelando um resultado positivo para *C. albicans*.

De acordo com um trabalho anteriormente publicado, este teste de aglutinação possui uma sensibilidade de 99,74% e uma especificidade de 99,87% (Quindos *et al.* 1997). Em 2322 isolados de *C. albicans*, este teste foi capaz de identificar correctamente 2319 isolados directamente a partir de colónias crescidas em Sabouraud. Em 2318 isolados pertencentes a outras espécies que não *C. albicans*, 6 foram identificadas como tal, resultando em falsos positivos. Esta situação pode levar a um diagnóstico errado e consequentemente a administração de terapêutica incorrecta. Embora este seja um método mais rápido e mais sensível do que o teste da filamentação (Quindos *et al.* 1997), a compra do kit acarreta custos económicos, e nos laboratórios

clínicos este pormenor é importante. O teste Bichro-Latex *Albicans*[®] embora rápido na sua execução está sempre dependente de uma cultura prévia das amostras. Isolados que não cresçam em meio de cultura por variados motivos não podem ser submetidos a este teste de aglutinação, e como tal não podem ser identificados.

Assim, para uma identificação definitiva das amostras, principalmente das que não produziram tubo germinativo no teste da blastese nem aglutinaram no teste Bichro-Latex *Albicans*[®], foram feitas provas bioquímicas de assimilação de hidratos de carbono e outros compostos, através de técnicas automatizadas, sendo que para os isolados da Covilhã e de Viseu foi utilizado o sistema automatizado VITEK[®] e para os isolados de Lisboa foi usado o MicroScan WalkWay[®].

VITEK[®]

O recente aparecimento de infecções fúngicas invasivas em doentes com problemas imunitários tem vindo a modificar o tempo de resposta de um laboratório clínico. Uma identificação ao nível de espécie deve ser fornecida de forma rápida e precisa para que o clínicos possam tomar decisões acertadas e para que possam ser efectuados estudos epidemiológicos (Dooley *et al.* 1994).

Para confirmação da espécie e para a obtenção de uma identificação conclusiva, os isolados da Colecção Covilhã e da Colecção Viseu foram estudados pelo sistema automatizado VITEK[®], pelo “*Yeast Chemical Card*”. Como referido anteriormente é um sistema automatizado que requer algumas horas para obtenção de resultados e que, em comparação com os meios cromogénicos possui um nível mais elevado de sensibilidade e especificidade, mas também de custos. Porém este método é um grande apoio na identificação de leveduras em laboratórios clínicos com grande volume de trabalho e por esse motivo, tem sido largamente adoptado (Dooley *et al.* 1994; Huang *et al.* 2001).

Num trabalho realizado por Huang *et al.* (2001), das 235 leveduras estudadas, 214 (91,1%) coincidiram com a metodologia convencional de referência utilizada pelos autores. A sensibilidade demonstrada para *C. albicans* foi 100%, para *C. tropicalis* foi

97,9%, para *C. glabrata* 97,7% e para *C. krusei* 0%. Verifica-se que consiste numa boa metodologia para identificar espécies, porém, neste estudo, não foi possível a identificação de *C. krusei*. Este facto levanta sérios problemas, já referidos no presente trabalho, no que toca a diagnóstico e suas consequências na terapêutica (Huang *et al.* 2001). E neste caso, estando envolvida a espécie *C. krusei*, o problema agrava-se ainda mais, porque esta levedura é intrinsecamente resistente ao fluconazol, o fármaco empiricamente mais utilizado no tratamento das infecções por leveduras.

Num trabalho realizado por Dooley *et al.* (1994), o sistema de identificação de leveduras do sistema VITEK[®] reconheceu correctamente 93% das identificações num período de 24 horas as seguintes espécies com teste da filamentação negativo: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. albicans*. A percentagem de resultados falsos negativos obtidos no estudo foi baixa, porém, os autores consideram arriscado utilizar unicamente este método de identificação uma vez que atrasos na identificação podem originar repercussões fatais. O mesmo sucede com identificações incorrectas de leveduras mais raras; como a base de dados do sistema VITEK[®] não abrange estas leveduras, então o seu potencial patogénico poderá nunca ser reconhecido (Dooley *et al.* 1994).

Deste modo, um problema em relação ao sistema VITEK[®] é o facto de a base de dados referente às características bioquímicas ser limitada, principalmente para fungos, ou seja, as cartas YBC apenas abrangem as espécies clinicamente mais relevantes numa dada época (El-Zaatari *et al.* 1990).

Uma outra razão que pode condicionar este método é o facto de depender do crescimento das leveduras pois estas são menos activas metabólica e bioquimicamente do que as bactérias e por isso possuem um crescimento mais lento levando, consequentemente, a uma resposta mais demorada. (Dooley *et al.* 1994). Por último o sistema VITEK[®], como acontece com todos os sistemas automatizados, não permite a identificação de fungos filamentosos deixando uma grande e importante lacuna no diagnóstico laboratorial das infecções fúngicas.

MicroScan WalkAway®

Para confirmação da espécie e para a obtenção de uma identificação conclusiva, os isolados da cidade de Lisboa foram estudados pelo sistema automatizado MicroScan WalkAway®, pelo “*Rapid Yeast Identification*” (RYI).

Num estudo efectuado por St. Germain & Beauchesne (1991), dos 357 isolados trabalhados, 345 foram correctamente identificados pelo RYI, 10 foram incorrectamente identificados, sendo 9 clinicamente incomuns e 1 clinicamente comum, e 2 não foram sequer reconhecidos, dando um total de 96,6% de resultados precisos. Um facto com que os autores se depararam foi que muitos dos perfis numéricos incluídos na base de dados do computador, não estavam incluídos no Livro de código do Microscan, o que limita de certa forma a técnica na identificação das leveduras de interesse clínico.

Têm sido descritas dificuldades na leitura dos resultados, ou seja, na interpretação das reacções cromogénicas, por isso, o uso de um sistema automatizado, sem a existência da subjectividade advinda da leitura visual, pode ser vantajoso para evitar erros humanos (St. Germain & Beauchesne 1991).

Num outro estudo efectuado cujo objectivo foi comparar a performance do RYI do MicroScan face aos métodos tradicionais (Teste da Blastese, microcultura em *tween* 80 e provas bioquímicas), foi possível verificar que ambas as técnicas, manuais e automatizadas, davam resultados muito semelhantes. Contudo, em 32 isolados, um foi incorrectamente identificado pelo MicroScan. Embora seja um número extremamente baixo e praticamente irrelevante há que ter em conta que, mesmo sendo um caso isolado pode ter repercussões fatais para o doente do qual foi obtido o isolado clínico (Souza, L. K. H. *et al.* 2001).

Genotipagem de *C. albicans* por PCR baseado nos polimorfismos da região 25S rDNA e da região ALT/RPS

Após a identificação das amostras por métodos convencionais tornou-se necessário realizar a tipagem dos isolados clínicos ao nível de estirpe. Tal é possível através da aplicação de métodos moleculares que permitirão avaliar, no final, a frequência e variabilidade dos padrões genéticos não só dentro de cada um dos locais geográficos estudados como entre as zonas geográficas distintas de Portugal incluídas neste trabalho, bem como comparar os resultados obtidos com os de outros autores que aplicaram a mesma metodologia discriminatória.

Para tal, foi amplificado por PCR o DNA genómico de todos os isolados clínicos de *C. albicans* provenientes das três localidades distintas de Portugal (Covilhã, Lisboa e Viseu), independentemente, com três conjuntos de primers, P-I, P-II e AS-I, de acordo com o protocolo descrito por Adachi *et al.* (2009). No final foram cruzados os resultados obtidos após cada amplificação a fim de obter uma caracterização apurada dos diferentes tipos moleculares das estirpes estudadas.

Genótipos de *C. albicans* obtidos por amplificação da região 25S rDNA

Após optimização da reacção de amplificação por PCR com os primers P-I, os resultados obtidos foram claros de interpretar, uma vez que os génotipos ficaram caracterizados por padrões de bandas bem definidas. A imagem de um dos géis obtidos após amplificação da região 25S rDNA de alguns dos isolados de *C. albicans* provenientes de infecções da região da Covilhã encontra-se representada na Figura 10.

A correspondência entre os génotipos de A a E e as dimensões dos produtos electroforéticos já foi anteriormente referida na Tabela 13 dos Materiais e Métodos (página 52). Com o conjunto de primers P-I dirigido para a amplificação da região 25S rDNA foi possível identificar três tipos de génotipos distintos, A, B e C, nas leveduras isoladas nas três regiões de Portugal.

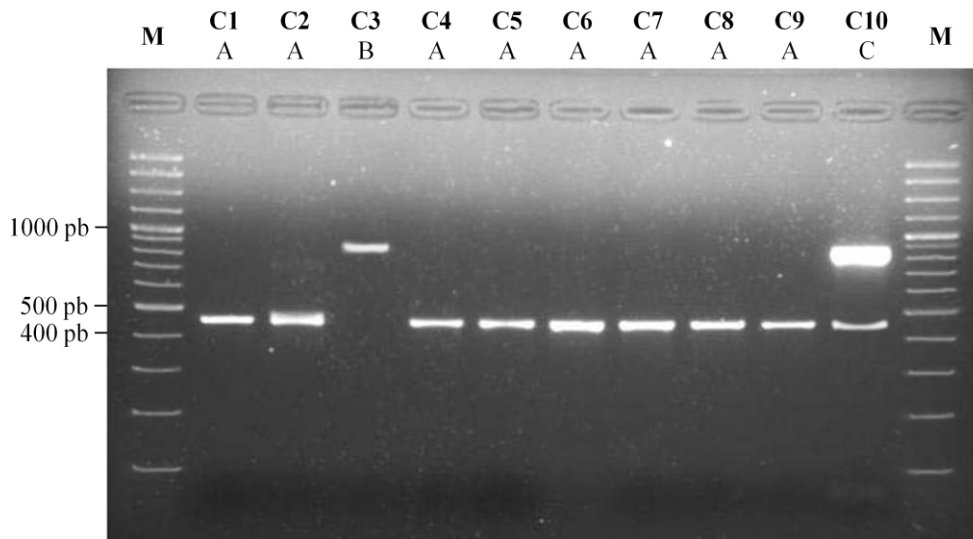


Figura 10. Padrões electroforéticos obtidos após amplificação por PCR da região 25S do rDNA, com o conjunto de primers P-I. Pertencem ao genótipo do tipo A os isolados C1, C2 e do C4 ao C9, ao genótipo do tipo B o isolado C3, e ao genótipo do tipo C o isolado C10. M, marcador de pesos moleculares.

Ao observar os resultados verificou-se que, para cada isolado clínico incluído neste estudo foram obtidas, em todos os casos, as bandas características de um dos genótipos. Os resultados obtidos na identificação dos isolados provenientes de amostras clínicas incluídas neste trabalho, através de métodos convencionais e de métodos moleculares encontram-se descritos na Tabela 30 para os isolados da Covilhã, na Tabela 31 para os isolados de Lisboa, e na Tabela 32 para os isolados de Viseu, do Anexo II.

De entre os 60 isolados estudados, constatou-se que 48 pertencem ao genótipo A, e aos genótipos B e C pertencem, cada um, a 6 isolados (Tabela 19 e Gráfico 1). Não foi observado nenhum isolado dos genótipos D nem E entre as estirpes estudadas neste trabalho. Sendo o tipo D correspondente à espécie *C. dubliniensis* pode-se concluir que todo o trabalho de identificação realizado anteriormente se encontrava correcto e que os isolados estudados neste trabalho pertencem de facto à espécie *C. albicans*. O genótipo E também não foi detectado entre os isolados estudados, tal como em trabalhos realizados na China e no Japão (Hattori *et al.* 2006; Iwata *et al.* 2006; She *et al.* 2008).

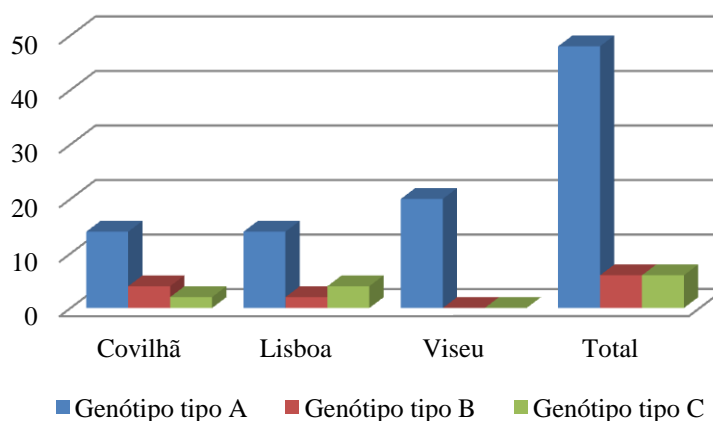
Verificou-se a existência da predominância do genótipo A em relação aos restantes B e C entre os isolados clínicos das três localidades Covilhã, Lisboa e Viseu. Este facto coincide com o descrito na literatura onde se verifica a elevada predominância do genótipo A (Hattori *et al.* 2006; Iwata *et al.* 2006). Tanto nas amostras provenientes da Covilhã como de Lisboa, 14 isolados, ou seja, 70% pertencem

ao genótipo A, enquanto nas amostras de Viseu apenas se verificou a existência deste genótipo em todos os isolados (100% dos isolados).

Tabela 19. Número de genótipos obtidos com os isolados clínicos provenientes da Covilhã, de Lisboa e de Viseu após PCR com o conjunto de primers P-I (CA-INT-L e CA-INT-R).

Genótipo	Nº de isolados da Covilhã	Nº de isolados de Lisboa	Nº de isolados de Viseu
A	14 (70%)	14 (70%)	20 (100%)
B	4 (20%)	2 (10%)	0
C	2 (10%)	4 (20%)	0

Gráfico 1. Distribuição de genótipos A, B, C pelas localidades: Covilhã, Lisboa e Viseu.



Em relação aos isolados da Covilhã, como foi referido anteriormente, o genótipo A foi o mais isolado, o que coincide com trabalhos realizados por Hattori *et al.* (2006), Iwata *et al.* (2006) e She *et al.* (2008). O segundo genótipo mais isolado por estes autores foi o tipo B (20%) seguido do genótipo C (10%), o que é concordante também com os autores Hattori *et al.* (2006) e She *et al.* (2008). Em relação aos isolados de Lisboa não se verificou esse padrão, uma vez que o genótipo C foi o segundo mais isolado (20%) seguido do genótipo B (10%). Esta situação é no entanto concordante com um outro trabalho, o de Iwata *et al.* (2006), em que o genótipo A apresentava 51,4% da amostragem, o genótipo B 21,2% enquanto que o genótipo C correspondia a

27,3% das amostras estudadas (Tabela 20). Na totalidade dos isolados estudados neste trabalho (n=60) verifica-se a existência em número igual de genótipos B (n=6) e de genótipos C (n=6). Estes dados são também congruentes com um grupo de espécimes estudados, denominado de SG-1, do trabalho realizado por Iwata *et al.* (2006), cujas percentagens de prevalência dos genótipos B e C são 16,6%, cada um.

Tabela 20. Comparação entre os resultados obtidos para o conjunto de primers P-I com os isolados estudados neste trabalho provenientes da Covilhã, Lisboa e Viseu e os trabalhos realizados por Hattori *et al.* (2006) e por Iwata *et al.* (2006).

Genótipo	Percentagem do nº de isolados				
	Covilhã	Lisboa	Viseu	Trabalho Hattori <i>et al.</i> (2006)	Trabalho Iwata <i>et al.</i> (2006)
A	70%	70%	100%	75,6%	51,4%
B	20%	10%	0	14,6%	21,2%
C	10%	20%	0	9,8%	27,3%

Os resultados dos isolados clínicos de Viseu são singulares uma vez que não se verifica uma tal homogeneidade descrita na literatura. Esta situação pode dever-se ao facto de os isolados serem provenientes de uma mesma região geográfica do país relativamente restrita ou então estarmos perante uma infecção nosocomial visto serem todos provenientes de doentes internados num mesmo serviço, a U.C.I.P. Vários estudos, alguns realizados pela OMS, demonstraram que a prevalência das infecções nosocomiais é mais elevada nas unidades de cuidados intensivos (Ducel *et al.* 2002). Aqui, os doentes encontram-se muito fragilizados e susceptíveis à aquisição de infecções e a assistência dos profissionais deve ser mais cuidadosa e exigente de modo a evitar infecções cruzadas e o agravamento das patologias. Neste tipo de serviço é muito comum a existência de procedimentos invasivos, o que facilita em grande parte a inoculação de agentes infecciosos devido às portas de entrada originadas. Uma vez que os doentes se encontram num mesmo espaço confinado, e os profissionais de saúde lidam directa e alternadamente com vários doentes sem ter tempo de tomar as medidas de prevenção necessárias, a probabilidade de ocorrerem infecções cruzadas é alta. Deste

modo é relativamente comum os doentes de uma U.C.I.P. apresentarem o mesmo tipo de microrganismo isolado (Chinchilla, 1993; Dias, 2010).

Outro factor a ter em conta é o facto de todos os isolados provenientes de Viseu terem sido obtidos de aspirados brônquicos. Este facto pode reflectir a possibilidade da existência de contaminações cruzadas. Procedimentos invasivos como a inserção do tubo endotraqueal, aspirações brônquicas e a alcalização gástrica constituem os principais factores que facilitam a invasão de microrganismos desencadeadores de infecção (Chinchilla, 1993).

Contudo, o conjunto de primers P-I não se revelou por si só suficiente para a diferenciação de estirpes entre si tornando-se necessária a introdução de outro tipo de abordagem, como a realização de outro conjunto de amplificações por PCR com o conjunto de primers P-II.

Genotipagem de *C. albicans* com base nos polimorfismos da região ALT

O DNA de todos os isolados clínicos incluídos neste trabalho, da Covilhã, Lisboa e Viseu foi submetido a uma segunda amplificação por PCR com o conjunto de primers P-II dirigido às regiões ALT com o objectivo de uma melhor diferenciação dos génotipos obtidos e assim traçar um estudo epidemiológico mais de acordo com a realidade.

Após a realização da reacção de PCR seguida de electroforese em gel de agarose para separação dos fragmentos amplificados, foram observados os padrões electroforéticos que permitiram determinar o número de repetições de ALT existentes em cada isolado clínico. As imagens dos géis obtidos após amplificação com os primers ASDcF e pCSCR dos isolados de *C. albicans*⁹ seleccionados para este trabalho encontram-se representadas nas Figuras 11 e 12.

A correspondência entre os tamanhos dos produtos electroforéticos obtidos e o número de repetições de ALT foi anteriormente apresentada na Tabela 14 dos Materiais e Métodos (Página 52).

⁹ Isolados provenientes de amostras clínicas de doentes com infecção da região da Covilhã.

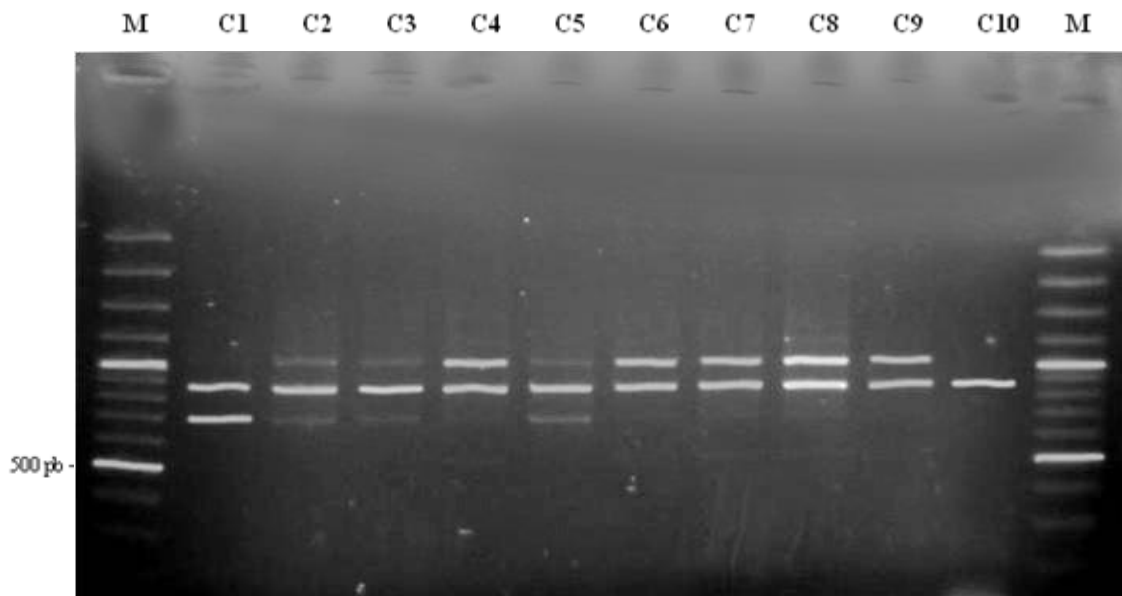


Figura 11. Padrões electroforéticos obtidos após amplificação por PCR do DNA dos isolados clínicos provenientes da Covilhã C1 a C10 com o conjunto de primers P-II para determinação do número de repetições de ALT. A estirpe C1 possui 2/3 repetições ALT, as estirpes C2, C3, C5 e C10 possuem 3 repetições ALT, e as estirpes C4, C6, C7, C8 e C9, 3/4 repetições ALT. M, marcador de pesos moleculares.

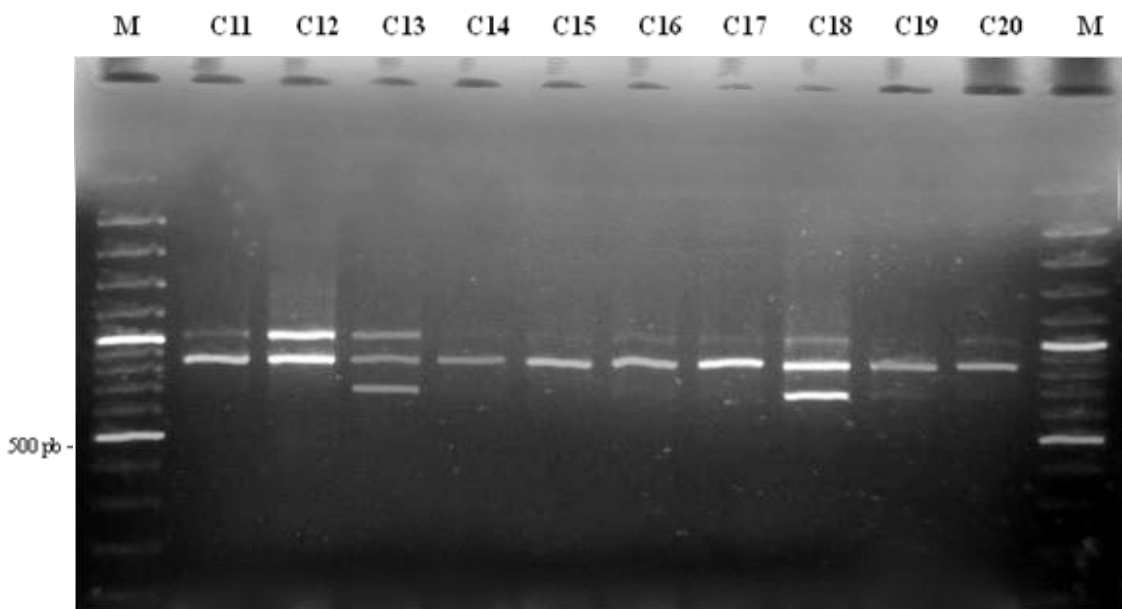


Figura 12. Padrões electroforéticos obtidos após amplificação por PCR do DNA dos isolados clínicos provenientes da Covilhã C11 a C20 com o conjunto de primers P-II para determinação do número de repetições de ALT. As estirpes C11, C14, C15, C16, C17, C19 e C20 possuem 3 repetições ALT, a estirpe C12, 3/4 repetições ALT, a estirpe C13, 2/3/4 repetições ALT e a estirpe 18, 2/3 repetições ALT. M, marcador de pesos moleculares.

Através da utilização do conjunto de primers P-II dirigido à região ALT foi possível observar uma maior discriminação que a anteriormente obtida com os primers P-I (genótipos A, B e C). Os vários genótipos distintos obtidos com este segundo par de primers encontram-se descritos na Tabela 21.

Tabela 21. Distribuição de genótipos obtidos para os isolados provenientes da Covilhã, Lisboa e Viseu, com base no número de repetições de ALT obtidos após PCR com o conjunto de primers P-II (ASDcF e pCSCR).

Nº de repetições de ALT	Covilhã	Lisboa	Viseu
2	-	2 (10%)	1 (5%)
2/3	2 (10%)	4 (20%)	5 (25%)
2/3/4	1 (5%)	-	-
3	11 (55%)	9 (45%)	9 (45%)
3/4	6 (30%)	3 (15%)	5 (25%)
4	-	2 (10%)	-

Em relação aos isolados clínicos provenientes de doentes de Lisboa verifica-se que o genótipo 3 se encontra em maior percentagem (45%), tal como descrito na literatura (Hattori *et al.* 2006; Iwata *et al.* 2006; She *et al.* 2008). Nesta cidade o segundo mais frequente é o genótipo 2/3 (20% dos isolados), e em terceiro lugar o genótipo 3/4 (15% dos isolados), situação que se afasta do descrito no Japão e China. Nos 20 isolados provenientes da Covilhã cerca de metade também pertence ao genótipo 3 e em segundo lugar é mais frequente o genótipo 3/4 (30%), tal como referido nos trabalhos no Japão e China. Dos isolados provenientes de Viseu, quase metade pertence mais uma vez ao genótipo 3 (45%) e, em igualdade de frequência, ocorrem os genótipos 2/3 e 3/4 cada um em 25% dos casos. Esta situação difere da literatura na medida em que o tipo 2/3, além de não ter sido identificado no Japão, é o terceiro mais frequente no total dos isolados portugueses estudados.

O terceiro genótipo mais prevalente entre os isolados da Covilhã foi o 2/3 (10%) seguido do 2/3/4 (5%), ao contrário de Hattori *et al.* (2006) em que o genótipo 4 (7,3%) foi o terceiro mais isolado seguido do genótipo 3/4/5 (4,9%). Em relação ao trabalho de Iwata *et al.* (2006), o terceiro genótipo mais isolado foi também o 4 (5%) seguido do genótipo 2/3/4 (2%), tal como demonstrado na Tabela 22. É de notar que entre os dois

trabalhos realizados no Japão se encontram diferenças no que diz respeito ao tipo de genótipo identificado e à sua prevalência. Como tal, é pertinente que os resultados de Portugal se distanciem mais dos resultados desses trabalhos, dada a diferença de localização geográfica.

Tabela 22. Comparação entre os genótipos obtidos com base no número de repetições de ALT dos isolados portugueses (Lisboa, Covilhã e Viseu), com resultados de outros trabalhos realizados em outros países.

Nº de repetições de ALT	Isolados Portugueses	Isolados do Japão (Hattori <i>et al.</i> 2006)	Isolados do Japão (Iwata <i>et al.</i> 2006)	Isolados da China (She <i>et al.</i> 2008)
2	3 (5%)	-	-	-
2/3	11 (18,33%)	-	-	14 (9,3%)
2/3/4	1 (1,67%)	-	4 (2,2%)	8 (5,3%)
3	29 (48,33%)	29 (70,7%)	126 (70,4%)	95 (62,9%)
3/4	14 (23,33%)	7 (17,1%)	38 (21,3%)	33 (21,9%)
3/4/5	-	2 (4,9%)	2 (1,1%)	1 (0,7%)
4	2 (3,34%)	4 (7,3%)	9 (5%)	-

No estudo efectuado na China verifica-se que o terceiro genótipo mais isolado foi o tipo 2/3 (9,3%) seguido do tipo 2/3/4 (5,3%). Estes dados vão de encontro aos resultados obtidos pelos isolados da Covilhã.

O terceiro genótipo com maior prevalência entre os isolados de Lisboa foi o 3/4 (15%) seguido do tipo 2 (10%) e do tipo 4 (10%). Estes resultados diferem completamente do encontrado na literatura: primeiro, porque o tipo 2 nunca antes havia sido descrito em nenhum destes estudos realizados no Oriente (China e Japão); e segundo, porque o tipo 4, de acordo com Hattori *et al.* (2006) e Iwata *et al.* (2006), é o terceiro mais prevalente e não o quarto. O genótipo 4 identificado entre os isolados de Lisboa e nos trabalhos realizados no Japão não foi reconhecido no estudo efectuado na China.

Comparando os genótipos identificados entre os isolados destas duas localidades, Covilhã e Lisboa, verifica-se que os resultados encontrados são também totalmente

distintos. O tipo 2/3/4 identificado entre as amostras da Covilhã não foi reconhecido entre os isolados de Lisboa, ao passo que os genótipos 2 e 4 identificados nesta colecção também não foram reconhecidos entre as leveduras da Covilhã. Estes dados demonstram diferenças significativas entre os isolados oriundos de duas localidades diferentes: Covilhã e Lisboa.

O terceiro genótipo mais isolado entre as amostras provenientes de Viseu foi o 2 (5%). Mais uma vez se verifica disparidade com os trabalhos de Hattori *et al.* (2006), de Iwata *et al.* (2006) e de She *et al.* (2008), sendo uma das razões o facto de o genótipo 2 não ter sido sequer identificado em nenhum dos estudos.

Comparando os resultados dos isolados provenientes de Viseu com os da Covilhã e os de Lisboa observa-se também algumas diferenças: tal como nos isolados de Lisboa, foi identificado o genótipo 2, contudo, o genótipo 4 encontrado entre estes isolados não foi reconhecido na amostragem de Viseu. Semelhantemente ao sucedido com as leveduras de Lisboa, também entre os isolados de Viseu não foi identificado o tipo 2/3/4.

Pode-se então aferir que existem diferenças entre os isolados provenientes da Covilhã, de Lisboa e de Viseu em relação às repetições de ALT, originando diferenças na prevalência dos genótipos dos isolados estudados. Sendo os isolados procedentes de três localidades distintas pode-se afirmar que a natureza das estirpes poderá ser também diferente. No geral as três localidades partilham três genótipos semelhantes: 2/3, 3 e 3/4. De acordo com esta informação pode-se deduzir que estes tipos possuem uma distribuição mais cosmopolita em território português. O tipo 2/3/4 identificado na Covilhã poderá ser característico desta região da Beira Interior. Para se aprofundar esta afirmação dever-se-ia aumentar o número de isolados estudados, uma vez que uma amostragem constituída por 20 isolados não é suficiente para chegar a uma conclusão definitiva, e dever-se-ia estudar outras cidades, da Beira Interior e de outras regiões, como Algarve, Alentejo ou Minho, para averiguar se o genótipo 2/3/4 seria mesmo típico dessa região. O tipo 4 foi apenas identificado na cidade de Lisboa. Tal como no caso anterior, deveria ser efectuado um tipo de abordagem mais profunda (aumento do número de isolados estudados de Lisboa, e estudo de isolados provenientes de outras regiões) para averiguar se este genótipo seria característico desta mesma cidade/região.

Curiosamente, apenas entre os isolados da Covilhã não foi identificado o genótipo 2. Esta situação pode-se dever à diferença geográfica entre as localidades, ou então, à não inclusão de estirpes de leveduras com este tipo de genótipo, mesmo estando presentes entre a população. Isto pode ser devido ao facto de a amostragem ser pequena (n=20) e não representar fielmente a população da Covilhã. Como tal, de forma a realizar um estudo mais fiável dever-se-ia aumentar o número de isolados de *C. albicans* estudados, tal como referido anteriormente.

De acordo com resultados obtidos com a totalidade dos isolados portugueses estudados, verifica-se que a maior percentagem (48,33%) possui o genótipo 3, ou seja, possui 3 repetições da região ALT. Segue-se em ordem de frequência o genótipo 3/4 (23,33%). Estes resultados coincidem com os resultados obtidos nos estudos realizados no Japão (Hattori *et al.* 2006; Iwata *et al.* 2006; Hattori *et al.* 2009). Verificou-se igualmente num estudo realizado na China a predominância dos genótipos 3 e 3/4 em relação aos restantes genótipos, contando com as percentagens de 62,9% e de 21,9% respectivamente (Tabela 22).

Os terceiros e quartos genótipos mais frequentes em Portugal são os genótipos 2/3 (18,33%) e 2 (5%) com uma diferença relativamente pequena entre si. Embora a diferença ainda esteja baseada num reduzido número de amostras e possa não ser muito significativa, estes resultados diferem dos resultados obtidos em outros estudos que aplicaram esta mesma técnica. Como o presente trabalho foi realizado em Portugal, os trabalhos de Hattori *et al.* (2006) e de Iwata *et al.* (2006) foram realizados no Japão e o estudo de She *et al.* (2008) na China, a diferença geográfica pode ter influência nos resultados uma vez que a natureza das estirpes deve ser naturalmente muito distinta. Seria interessante averiguar no nosso país qual a prevalência de cada um dos diferentes genótipos, mas para tal, dever-se-ia estudar um maior número de isolados, tanto de doentes de risco como de doentes que à partida não pertencem a grupos de risco, para posteriormente se poderem tirar conclusões epidemiológicas mais fidedignas.

O genótipo 2 foi identificado nos isolados de *C. albicans* provenientes de Lisboa e de Viseu. Sendo que este tipo ainda não foi descrito na literatura, e que os trabalhos existentes foram realizados no Oriente (China e Japão) é possível afirmar que este tipo possa ser característico do Ocidente, ou até mesmo de Portugal. Para averiguar tal

afirmação deveriam ser efectuados novos estudos em outros países pertencentes ao Ocidente. O genótipo 2/3 identificado nos isolados das três zonas de Portugal (Covilhã, Lisboa e Viseu) não foi identificado nos isolados de *C. albicans* do Japão. Contudo, foi identificado entre os isolados da China. Esta semelhança poderá estar relacionada com a maior proximidade da China a Portugal, em relação ao Japão, ou com a emigração da população chinesa para Portugal, que nos últimos anos tem vindo a aumentar.

Ao todo, neste trabalho, foram identificados seis genótipos diferentes nos isolados clínicos portugueses relativamente ao número de repetições de ALT, cinco tipos coincidentes com o anteriormente já observado por outros autores, e um novo tipo, o genótipo do tipo 2, que até hoje ainda não havia sido descrito.

Verifica-se aqui uma pequena diversidade entre os resultados deste trabalho, realizado em Portugal, e os resultados obtidos em trabalhos anteriores, realçando que essas diferenças podem estar relacionadas pelo facto dos outros trabalhos terem sido realizados unicamente em países orientais (Japão e China).

Concluindo, este conjunto de primers P-II dirigido à região ALT permitiu obter resultados com um mais elevado poder discriminatório do que o conjunto de primers P-I isoladamente e verificar o quão distintos são os diferentes genótipos nas várias regiões geográficas estudadas.

De forma a realizar uma maior discriminação das estirpes provenientes da Covilhã, de Lisboa e de Viseu, efectuou-se uma terceira amplificação por PCR dos DNA's dos isolados com o conjunto de primers AS-I, dirigido também à região ALT. Posteriormente à reacção de PCR com os primers ASaF13 e ASrR135 dos isolados de *C. albicans*, separaram-se os fragmentos amplificados por electroforese em gel de agarose, e observaram-se os padrões electroforéticos resultantes que permitiram determinar a forma como as regiões ALT estariam organizadas em cada isolado clínico.

Após a análise visual dos géis, constatou-se que o perfil de bandas obtido era fraco e muito pouco variável entre as várias estirpes. Como tal, devido a esta grande homogeneidade nos resultados, a diferenciação ao nível de estirpe tornou-se praticamente impossível com esta terceira amplificação.

Genótipos de *C. albicans* conjugando os dois métodos

No sentido de diferenciar ainda mais os isolados das cidades Covilhã, Lisboa e Viseu ao nível de estirpe, os resultados do conjunto de primers P-II (Tabela 22) podem ser conjugados aos resultados obtidos com o conjunto de primers P-I em que os genótipos tinham ficado divididos em três grupos, A, B e C (Tabela 20). Observando os novos dados assim obtidos, verifica-se que, em relação aos isolados provenientes da Covilhã, foi possível a diferenciação dos 14 isolados de *C. albicans* do tipo A em quatro subtipos diferentes, A:2/3, A:2/3/4, A:3 e A:3/4. Os isolados tipo B foram identificados como B:3 e os dois isolados tipo C foram subdivididos em 2 subtipos: C:3 e C:3/4.

De acordo com a Tabela 23 verifica-se igualmente que o genótipo com maior prevalência foi o A:3 contando com 30% dos isolados, seguindo-se os genótipos os A:3/4 e B:3 (25% e 20% respectivamente). Estes dados são congruentes com um trabalho realizado por Hattori *et al.* (2006) em que os autores referem que o genótipo mais comumente isolado é o A:3, seguindo-se os tipos A:3/4 e B:3. Dos 41 isolados estudados neste trabalho foram detectados 9 genótipos distintos. Os tipos A:3/4/5, A:4, B:3/4 e B:3/4/5 identificados neste trabalho não foram reconhecidos entre os isolados provenientes da Covilhã, assim como os tipos A:2/3 e A:2/3/4 não foram detectados entre os isolados do estudo de Hattori *et al.* (2006). Sendo que, neste trabalho realizado por Hattori *et al.* (2006), o número de amostras estudadas foi superior, seria de esperar igualmente maior número de tipos de estirpes identificadas.

Segundo Iwata *et al.* (2006) o tipo A:3 também foi o genótipo mais frequentemente isolado, porém, os autores referem que, no trabalho por eles realizado, o segundo tipo mais isolado foi o genótipo C:3, seguido do tipo B:3. Tal pode-se dever ao facto de, neste estudo, existir maior número de genótipos C (n=49) em detrimento de genótipos B (n= 38). Em relação aos isolados da Covilhã, a situação é contrária: há um maior número de genótipos B (n=4) e menor de genótipos C (n=2). O tipo A:2/3 não foi identificado entre os isolados de Iwata *et al.* (2006), assim como os tipos A:3/4/5, A:4, B:3/4, B:4 e C:2/3/4 reconhecidos naquele trabalho, não foram identificados entre os isolados da Covilhã. Ao todo, 7 genótipos diferentes foram identificados entre os isolados da Covilhã, ao passo que no trabalho de Iwata *et al.* (2006) foram reconhecidos

11 genótipos distintos. A diferença entre o número de amostras estudadas nos dois trabalhos, os 20 isolados e os 179 isolados da Covilhã e do estudo de Iwata *et al.* (2006), respectivamente, pode ser a causa desta disparidade. É natural que o estudo de um maior número de amostras possa vir a demonstrar uma maior heterogeneidade. Também o estudo efectuado por She *et al.* (2008) mostra que o genótipo mais isolado, nesse trabalho também foi o A:3. Porém, o segundo tipo com maior prevalência entre os resultados foi o B:3/4, o qual não foi sequer reconhecido entre as amostras da Covilhã. Nos estudos realizados no Japão, nomeadamente nos trabalhos de Iwata *et al.* (2006) e de Hattori *et al.* (2006), este tipo foi apenas identificado em 3,9% e 2,4%, respectivamente, do total da amostragem.

Tabela 23. Conjugação dos genótipos obtidos através da amplificação por PCR com os dois conjuntos de primers P-I e P-II para os isolados provenientes da Covilhã, de Lisboa e de Viseu com um trabalho efectuado na China (She *et al.* 2008) e dois trabalhos realizados no Japão (Hattori *et al.* 2006; Iwata *et al.* 2006). A negrito estão marcados os genótipos mais frequentes em cada país estudado.

Genótipo	Covilhã	Lisboa	Viseu	Total Portugal	She et al (2008)	Iwata et al (2006)	Hattori et al (2006)
A:2	-	1 (5%)	1 (5%)	2 (3,3%)	-	-	-
A:2/3	2 (10%)	2 (10%)	5 (25%)	9 (15%)	10 (6,6%)	-	-
A:2/3/4	1 (5%)	-	-	1 (1,7%)	-	2 (1,1%)	-
A:3	6 (30%)	6 (30%)	9 (45%)	21 (35%)	81 (53,6%)	61 (34%)	23 (56,1%)
A:3/4	5 (25%)	3 (15%)	5 (25%)	13 (21,7%)	10 (6,6%)	20 (11,1%)	4 (9,8%)
A:3/4/5	-	-	-	-	1 (0,7%)	2 (1,1%)	1 (2,4%)
A:4	-	2 (10%)	-	2 (3,3%)	-	7 (3,9%)	3 (7,3%)
B:2/3	-	1(5%)	-	1 (1,7%)	4 (2,7%)	-	-
B:2/3/4	-	-	-	-	8 (5,3%)	-	-
B:3	4 (20%)	1(5%)	-	5 (8,3%)	10 (6,6%)	29 (16,2%)	4 (9,8%)
B:3/4	-	-	-	-	22 (14,6%)	7 (3,9%)	1 (2,4%)
B:3/4/5	-	-	-	-	-	-	1 (2,4%)
B:4	-	-	-	-	-	2 (1,1%)	-
C:2	-	1(5%)	-	1 (1,7%)	-	-	-
C:2/3	-	1(5%)	-	1 (1,7%)	-	-	-
C:2/3/4	-	-	-	-	-	2 (1,1%)	-
C:3	1 (5%)	2 (10%)	-	3 (5%)	4 (2,7%)	36 (20,1%)	2 (4,9%)
C:3/4	1 (5%)	-	-	1 (1,7%)	1 (0,7%)	11 (6,4%)	2 (4,9%)

Em 151 isolados provenientes da China foram identificados 10 genótipos diferentes, valor mais aproximado ao encontrado no estudo efectuado no Japão. Tal como referido anteriormente, esta proximidade pode-se dever ao volume da amostragem, que em comparação com os isolados da Covilhã, é muito superior.

Dos isolados da Covilhã, apenas o tipo A:2/3/4 não foi identificado entre as estirpes da China, porém, os tipos A:3/4/5, B:2/3, B:2/3/4 e B:3/4 reconhecidos neste país oriental não foram identificados entre os isolados da Covilhã estudados neste trabalho. Mais uma vez, essa diferença na heterogeneidade de genótipos pode estar relacionada com o volume amostra.

Em relação aos isolados pertencentes à cidade de Lisboa foi possível a identificação de 10 genótipos distintos. Os 14 isolados de *C. albicans* reconhecidos como sendo do tipo A, de acordo com a Tabela 31 do Anexo II, puderam ser divididos em 5 subtipos: A:2, A:2/3, A:3, A:3/4 e A:4. Dos 2 isolados pertencentes ao genótipo B houve diferenciação em B:2/3 e B:3. Das 4 estirpes genotipadas como C foi possível a sua divisão em 3 grupos, C:2, C:2/3 e C:3. Mais uma vez se verifica, de acordo com a tabela 23, que o genótipo A:3 (30% dos resultados) é o que possui maior prevalência estando de acordo com Hattori *et al.* (2006), Iwata *et al.* (2006) e She *et al.* (2008). O segundo tipo mais isolado foi o A:3/4 (15%) como referenciado pelos autores Hattori *et al.* (2006). Seguem-se os tipos A:2/3, A:4 e C:3 contando com 10% cada um do total dos resultados referentes aos isolados de Lisboa. Verifica-se, que em relação às amostras provenientes da capital de Portugal, embora a amostragem seja pequena (n=20) existe grande heterogeneidade em relação a tipos de estirpes. É de notar que os isolados pertencentes a Lisboa provêm de dois hospitais distintos, Hospital Santa Maria e Instituto Português de Oncologia. Ambos abrangem grande parte da população de Lisboa e arredores. Este facto é sinónimo de grande diversidade de doentes que frequentam estes dois hospitais públicos e como tal, poderá ter influenciado a grande multiplicidade observada nos resultados.

Comparativamente aos resultados obtidos no Japão, por Iwata *et al.* (2006), e na China, por She *et al.* (2008), tal como referido anteriormente, apenas a prevalência da estirpe A:3 é comum nos três ensaios. Os tipos A:2, A:4, C:2 e C2/3 identificados nos isolados de Lisboa não foram reconhecidos entre os isolados do trabalho de She *et al.*

(2008). Também as estirpes A:3/4/5, B:2/3/4, B:3/4 e C:3/4 encontradas entre os isolados da China, não foram identificadas nos isolados de Lisboa. A seguir ao genótipo A, os isolados do estudo de She *et al.* (2008) possuem maior prevalência de isolados com o genótipo B. Entre os isolados de Lisboa tal não sucede, uma vez que foi o genótipo C o segundo mais isolado. Estes dados podem ter influenciado portanto os resultados demonstrados na Tabela 23: maior diversidade de genótipos tipo C entre os isolados de Lisboa e maior diversidade de genótipos tipo B entre os isolados da China. Observando novamente os resultados verifica-se que o segundo tipo mais isolado no trabalho de She *et al.* (2008) foi o B:3/4. Tal como sucedido entre os isolados provenientes da Covilhã, tal genótipo não foi reconhecido entre as estirpes de Lisboa.

Relativamente ao estudo efectuado no Japão por Iwata *et al.* (2006), pôde-se denotar também algumas diferenças quando colocado em comparação com os resultados dos isolados de Lisboa. Os genótipos A:2/3/4, A:3/4/5, B:3/4, B:4, C:2/3/4 e C:3/4 identificados entre os isolados do trabalho de Iwata *et al.* (2006) não foram reconhecidos entre as amostras de Lisboa que foram estudadas. Por sua vez, os genótipos A:2, A:2/3, B:2/3, C:2 e C:2/3 identificados entre os isolados de Lisboa, não foram encontrados entre os isolados do trabalho de Iwata *et al.* (2006). Mesmo havendo semelhanças entre os resultados do presente trabalho e o estudo de Hattori *et al.* (2006) se verificou diferenças na diferenciação das estirpes: os tipos A:2, A:2/3, B:2/3, C:2, C:2/3 não foram reconhecidos entre os isolados no estudo de Hattori *et al.* (2006), e os tipos A:3/4/5, A:4, B:3/4, B:3/4/5 e C:3/4 não foram identificados entre os isolados de Lisboa. Novamente se verificam discrepâncias em relação às estirpes identificadas entre os diferentes trabalhos. De acordo com a Tabela 23 é possível afirmar que, entre os 20 isolados provenientes de Lisboa, foram identificadas três novas estirpes que até à data não haviam sido identificadas nem na China nem no Japão: A:2, C:2 e C:2/3.

Observando os resultados referentes aos isolados de Viseu verifica-se que a realização de uma segunda técnica de PCR com o conjunto de primers P-II foi bastante significativa para a diferenciação de estirpes. Dos 20 isolados classificados como tipo A foi possível a sua subdivisão em 4 tipos diferentes: A:2, A:2/3, A:3 e A:3/4. Uma vez mais se verifica a predominância do genótipo A:3 (45% dos resultados), tal como descrito na literatura. Tal como sucedeu com os resultados dos isolados de Lisboa, foi

identificada uma estirpe pertencente a um novo tipo nunca antes descrito nem na China nem no Japão, o tipo A:2.

Como referido anteriormente, não foram identificadas estirpes tipo B ou C entre os isolados procedentes de Viseu. Assim sendo, verifica-se grande diferença de resultados entre estes isolados portugueses e os isolados do Oriente. Tal poderá ser explicado devido à diferença de localização geográfica. No entanto, os isolados de Viseu são, entre os três grupos estudados em Portugal, os que possuem maior homogeneidade de resultados. O facto de pertencerem a doentes internados num só serviço, a U.C.I.P, pode ter influenciado a pouca variedade de estirpes, sugerindo eventualmente a ocorrência de contaminações nosocomiais por um número limitado de estirpes.

Agrupando os isolados provenientes das três zonas de Portugal e generalizando para o total dos isolados nacionais, é possível fazer uma comparação mais global com os estudos de Hattori *et al.* (2006), Iwata *et al.* (2006) e de She *et al.* (2008). Ao todo, foram identificados em Portugal 12 genótipos distintos, sendo o mais prevalente o genótipo A:3 (35%) o que coincide com o referido por outros autores. Segue-se, nas 60 amostras portuguesas estudadas, o genótipo A:3/4 (21,7%), que coincide com o referido por Hattori *et al.* (2006) e depois o tipo A:2/3. Comparativamente com os estudos da China e do Japão (Oriente), curiosamente verifica-se que existe uma maior heterogeneidade de genótipos entre as estirpes portuguesas, apesar do número limitado de isolados estudados (Ocidente). Analisando todos os genótipos descritos, verifica-se que os tipos A:3, A:3/4, B:3, C:3 e C:3/4 são comuns nos três países e, por isso, é provável que estas estirpes possuam uma distribuição cosmopolita. Contudo requer um estudo mais alargado de um maior número de estirpes para confirmar ou corrigir estas conclusões, assim como deveriam ser realizados novos estudos em outros países de outros continentes, como África e América para avaliar a distribuição mundial dos diferentes genótipos.

As estirpes com os genótipos A:2, C:2, C:2/3 foram identificados pela primeira vez neste trabalho, em isolados clínicos de Portugal. De acordo com os dados disponíveis neste momento poder-se-ia suspeitar tratarem-se de estirpes típicas do nosso país ou eventualmente da Europa, ou ainda mesmo do Ocidente, uma vez que tanto a

China como o Japão são países orientais, e estes genótipos não foram lá detectados em nenhum dos três trabalhos efectuados em regiões tão distintas e com um número mais elevado de isolados. Por isso consideramos importante realizar mais estudos semelhantes em países orientais, como Índia ou Indonésia, e em países ocidentais, como na Europa ou nos Estados Unidos da América de forma a confirmar ou refutar estes resultados.

Os genótipos A:2/3 e B:2/3 foram identificados entre os isolados de Portugal e os isolados da China. Existindo esta semelhança seria de esperar que estes países tivessem proximidade geográfica, o que não acontece. Como tal, é possível que estas estirpes existam em Portugal e na China devido a factores de migração. De facto, nas últimas décadas tem se verificado uma grande afluência de imigrantes chineses para o nosso país.

Os genótipos A:2/3/4 A:4 foram identificados somente entre os isolados de Portugal e os isolados do Japão. Tal como no caso anterior, estes dois países possuem localizações geográficas distintas pelo que esta situação se pode dever, também, a situações de migração entre Portugal e Japão, embora esta não esteja sendo tão acentuada como a imigração chinesa.

Olhando para esta situação de uma outra perspectiva pode-se verificar que o tipo A:4 é a única estirpe comum entre os dois trabalhos do Japão e o trabalho efectuado em Portugal. O tipo A:2/3/4 comum entre os dois países apenas foi identificado entre os isolados do estudo realizado por Iwata *et al.* (2006).

Os tipos A:3/4/5 e B:3/4 foram identificados nos três estudos realizados no oriente e não em Portugal. Estes dados sugerem que estas estirpes poderão, eventualmente, ser típicas de países orientais. Contudo, algumas estirpes foram diferenciadas em região isoladas como o tipo B:2/3/4 na China, os tipos B:4 e C:2/3/4 (Iwata *et al.* 2006) e B:3/4/5 (Hattori *et al.* 2006) no Japão. Estes factos sugerem que estas estirpes poderão ser exclusivas dessas zonas.

No entanto seria muito abusivo tirar qualquer conclusão sem a realização de mais estudos epidemiológicos incluindo mais países orientais e ocidentais para se poder realizar uma comparação mais real e fiável.

Relativamente à distribuição dos genótipos pelos produtos biológicos, é possível encontrar diferenças. De acordo com a Tabela 27 (Anexo I) e a Tabela 30 (Anexo II), o genótipo maioritariamente isolado a partir de aspirado brônquico foi o tipo A:3, seguido do tipo A:3/4, como descrito na literatura e dos tipos A:2/3 e A:2. Não foi observado nenhum tipo B ou C neste tipo de produto biológico. Embora grande parte destas amostras provenham de doentes internados na U.C.I.P (Viseu), de acordo com a Tabela 23, verifica-se que o único isolado de aspirado brônquico da Covilhã pertence ao genótipo A:3/4. De acordo com estes dados pode-se afirmar que, a presença do genótipo do tipo A poderá ser eventualmente típica deste produto biológico.

Tabela 24. Genótipos das estirpes de *C. albicans* isoladas dos vários produtos biológicos da Covilhã, Lisboa e Viseu (entre parêntesis, o número de isolados clínicos deste trabalho).

Produto biológico	Total Isolados Portugal
Aspirado brônquico	A:2 (1)
	A:2/3 (5)
	A:3 (9)
	A:3/4 (6)
Cateter	C:3 (1)
Expectoração	A:2/3 (1)
	A:2/3/4 (1)
	A:3 (1)
Exsudado	A:3/4 (2)
	A:2/3 (1)
	B:3 (2)
Exsudado vaginal	A:3 (2)
Fezes	C:3/4 (1)
Hemocultura	A:2 (1)
	A:2/3 (2)
	A:3 (6)
	A:3/4 (4)
	A:4 (2)
	B:3 (1)
	B:2/3 (1)
	C:2 (1)
	C:2/3 (1)
	C:3 (2)
Urina	A:3 (3)
	A:3/4 (1)
	B:3 (2)

O genótipo C:3 foi identificado num isolado proveniente de um cateter. Tratando-se de um só caso torna-se um pouco abusivo extrapolar qualquer tipo de conclusão. Para tal, dever-se-ia testar mais isolados de *C. albicans* provenientes de catetres de forma a se poder realizar um estudo epidemiológico mais fiável.

Em relação à expectoração, tal como sucedido para os isolados oriundos de aspirado brônquico, verifica-se uma totalidade de genótipos do tipo A, sendo o A:3/4 o mais abundante. Embora sejam poucas as amostras estudadas e se devesse abranger um maior número de isolados provenientes deste produto biológico, pode-se afirmar, de acordo com os resultados da Tabela 24, que o genótipo A poderá ser mais característico do tracto respiratório baixo.

Os genótipos A:2/3 e B:3 foram detectados em exsudados. Embora o tipo B:3 prevaleça sobre o tipo A:2/3, o número de produtos biológicos em estudo foi baixo, pelo que, para se poder retirar conclusões mais fidedignas dever-se-ia analisar mais isolados provenientes de exsudados.

Relativamente aos exsudados vaginais, apenas foi detectado o tipo A:3 nos dois isolados. Eventualmente poder-se-á estar perante um genótipo típico deste local anatómico. Porém, mais amostras deveriam ser estudadas de forma a compreender a origem deste tipo de infecções: endógena ou exógena.

No caso das fezes, tal como o cateter, consiste num caso isolado. Por isso, não é possível afirmar com certeza se o tipo C:3/4 de *C. albicans* é característico deste tipo de produto biológico. Como já vem sendo referido, mais isolados deveriam ser estudados para posterior comparação.

As hemoculturas mostrararam grande heterogenidade de resultados, englobando isolados do tipos A, B e C, sendo os genótipos A:3 e A:3/4 os mais frequentes. Esta situação assemelha-se ao encontrado nos aspirados brônquicos. De facto, olhando para a literatura (Hattori *et al.* 2006; Hattori *et al.* 2009) estes dois genótipos são os mais comuns na população, pelo que não é de estranhar este tipo de resultados.

Olhando para os resultados relativos à urina, verifica-se que os tipos A:3 e B:3 são mais frequentes. Estes dados fogem um pouco ao descrito na literatura, em que os tipos mais comuns são A:3 seguido de A:3/4 segundo Hattori *et al.* (2006, 2009), ou o tipo A:3 seguido do tipo B:3/4 segundo She *et al.* (2008). Observa-se diferenças entre

os três países: Portugal, China e Japão, contudo, mais isolados deveriam ser estudados de forma a realizar um traçado epidemiológico mais fidedigno.

Como referido anteriormente, os perfis electroforéticos obtidos pela amplificação com o conjunto de primers AS-I foram muito similares pelo que não foi possível uma subdivisão dos genótipos previamente determinados pelas amplificações por PCR com os sets de primers P-I e P-II. Assim sendo, foi considerada a não inserção dos resultados relativos ao set AS-I neste trabalho, por não serem significantes no que diz respeito à diferenciação de estirpes.

Teste de Sensibilidade aos Antifúngicos

Para todas as 60 amostras incluídas neste trabalho foi realizado o teste de sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos Fluconazol e Voriconazol, pelo método da difusão em disco, de acordo com a norma M44-P do CLSI.

Os resultados obtidos no teste de sensibilidade ao Fluconazol e Voriconazol, para cada um dos isolados, estão descritos na Tabela 33 (isolados da Covilhã), na Tabela 34 (isolados de Lisboa) e na Tabela 35 (isolados de Viseu), do Anexo III.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 25 verifica-se que tanto os 20 isolados (100%) provenientes da Covilhã como os 20 isolados (100%) provenientes de Viseu são sensíveis ao Fluconazol, enquanto que, em relação aos isolados provenientes de Lisboa, apenas 1 (5%) apresenta resistência ao Fluconazol. Esta estirpe, isolada de uma hemocultura, proveio de uma doente internada com septicémia por *C. albicans*, possivelmente ventilada, sujeita a aplicação de cateteres e polimedicada, muitas vezes com profilaxia empírica e prolongada com Fluconazol (Santos Jr. *et al.* 2005).

Tabela 25. Percentagem de isolados sensíveis e resistentes ao Fluconazol, para todos os isolados das três regiões geográficas estudadas.

	Nº de isolados sensíveis	Nº de isolados resistentes
Covilhã	20 (100%)	0 (0%)
Lisboa	19 (95%)	1 (5%)
Viseu	20 (100%)	0 (0%)

Segundo um estudo realizado por Lyon *et al.* (2010), que durou 5 cinco anos, foram detectadas resistências ao Fluconazol por 30 isolados (1,2%) de *C. albicans*. De acordo com um trabalho de Favalessa *et al.* (2010), 29,6% das leveduras *C. albicans* estudadas eram resistentes ao Fluconazol. Um outro estudo demonstrou uma realidade totalmente diferente dos dois trabalhos anteriores: 67% de isolados *C. albicans* possuíam resistência ao Fluconazol (Benedetti *et al.* 2011). Este tipo de resultados não é

muito descrito na literatura, em que mais de 50% dos isolados apresentam resistência a este antifúngico. Esta situação demonstra que nem sempre um amostra isolada segue o padrão geral descrito na literatura, o que comprova a grande necessidade e importância em realizar perfis de susceptibilidade aos antifúngicos dos isolados em estudo (Benedetti *et al.* 2011).

Observando a Tabela 34 do Anexo III, pode-se constatar que o isolado resistente a este antifúngico pertence ao genótipo A:4. Este tipo de estirpe foi apenas identificada em dois isolados clínicos de Lisboa, sendo uma sensível e a outra resistente. Uma vez que as duas estirpes possuem comportamentos diferentes em relação ao Fluconazol pode-se afirmar que esta resistência não é uma característica intrínseca do genótipo A:4, podendo no entanto tratar-se de uma resistência do tipo natural. De facto, a resistência primária a este antifúngico não é típica da espécie *C. albicans*, mas sim de *C. krusei* e *C. glabrata*, de acordo com Santos Jr. *et al.* (2005).

A estirpe resistente A:4 foi isolada de uma doente idosa de 70 anos (Tabela 28, Anexo I e Tabela 34, Anexo III) em estado de imunodepressão e polimedicada, como referido anteriormente. Por esta razão, é possível que estejamos perante um caso de resistência adquirida a este antifúngico. Visto que não se encontra descrito na literatura a relação entre susceptibilidade ao Fluconazol e as estirpes identificadas com base nos polimorfismos da região 25S do rDNA e das sequências ALT/RPS, dever-se-ia realizar no futuro mais estudos a este nível, de forma a compreender o comportamento em relação à resistência/susceptibilidade destas estirpes e consequentemente adoptar medidas terapêuticas rápidas e eficazes.

Este resultado pode ter sido devido também à aplicação de um inóculo demasiado denso aquando da realização do teste, acabando possivelmente por interferir na CMI. Na prática hospitalar, nos casos em que existe resistência a este tipo de antifúngico azólico, a tendência será para iniciar a terapêutica com Anfotericina B, a qual constitui uma boa opção quando não existe resposta clínica/laboratorial favorável ao Fluconazol. Contudo, como já referido anteriormente, a Anfotericina B é bastante tóxica e dispendiosa para os hospitais e, como tal, a terapêutica com Voriconazol em candidémias tem sido recomendada como alternativa. Como existe a possibilidade da sua administração poder ser por via oral, não acarretar efeitos colaterais renais e ser um

meio mais económico do que o uso da Anfotericina B (cerca de 12% mais económica), o Voriconazol tem sido mais largamente utilizado nos tratamento de infecções sistémicas por *Candida* spp. (Margotto, 2004).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 26 verifica-se que 19 isolados (95%) provenientes da Covilhã apresentam susceptibilidade e que 1 (5%) apresenta resistência ao Voriconazol. Num estudo realizado em 2009, no Brasil, verificou-se que nenhum dos isolados *C. albicans* possuía resistência a este antifúngico (Lima *et al.* 2009). Um ano mais tarde, de acordo com um trabalho efectuado por Favalessa *et al.* (2010), foi demonstrada resistência a este azólico por parte de 25,9% de leveduras da espécie *C. albicans*, um valor consideravelmente superior ao obtido no presente trabalho e no trabalho de Lima *et al.* (2009). Este aumento pode dever-se a uma alteração na susceptibilidade ao Voriconazol devido à sua inserção na terapêutica de doentes, ou pode dever-se simplesmente à natureza própria das estirpes estudadas: origens geográficas distintas, ou resistência natural das estirpes de Favalessa *et al.* (2010).

Tabela 26. Percentagem de isolados sensíveis e resistentes ao Voriconazol, para todos os isolados das três regiões geográficas estudadas.

	Nº de isolados sensíveis	Nº de isolados resistentes
Covilhã	19 (95%)	1 (5%)
Lisboa	20 (100%)	0 (0%)
Viseu	20 (100%)	0 (0%)

A estirpe identificada como resistente ao Voriconazol foi isolada a partir de fezes e proveio de uma doente no início da 3ª idade (65 anos), como apresentado na Tabela 27 do Anexo I. Sendo que a levedura da espécie *C. albicans* é comensal do tracto gastrointestinal, podemos estar perante um caso de infecção endógena, ou seja, infecção oportunista devido a baixa de imunidade, talvez devido à faixa etária, ou a toma abusiva de antibióticos. De acordo com a Tabela 30 do anexo II, esta estirpe resistente ao Voriconazol pertence ao tipo C:3/4. Este genótipo foi apenas identificado entre os isolados da Covilhã e apenas neste tipo de produto biológico. Deste modo, fica em aberto a possibilidade de se estar perante uma estirpe intrinsecamente resistente ao

Voriconazol. Como é um caso isolado, dever-se-ia estudar mais amostras de fezes para averiguar se o tipo C:3/4 é uma estirpe típica deste produto biológico, e se, realmente apresenta este tipo de resistência primária, codificada na sua estrutura molecular, ou se esta situação não passou de um caso de resistência adquirida ao fármaco. Outros tipos de produtos biológicos deveriam ser estudados também de forma a verificar a presença e susceptibilidade ao Voriconazol de estirpes do tipo C:3/4.

Para além destas variantes, este resultado positivo para resistência ao Voriconazol pode-se dever, tal como referido anteriormente para o antifúngico Fluconazol, à aplicação de um inóculo demasiado denso, o qual, posteriormente irá influenciar a CMI.

Relativamente aos isolados clínicos de Lisboa e de Viseu, verifica-se que ambos os conjuntos apresentam 100% de susceptibilidade a este tipo de antifúngico.

Tal como referido para o Fluconazol, não se encontra descrito na literatura a relação entre a susceptibilidade ao Voriconazol e as estirpes identificadas com base no método molecular de diferenciação de estirpes usado neste trabalho. Como tal dever-se-ia aprofundar este estudo, aumentando o número de isolados estudados, e variando o tipo de produto biológico analisados de forma a compreender o comportamento em relação à resistência/susceptibilidade destas estirpes e consequentemente adoptar medidas terapêuticas rápidas e eficazes.

Comparativamente com Azevedo (2005) e com Pereira (2010), o presente estudo obteve resultados semelhantes com esses dois trabalhos no que diz respeito à detecção de resistências aos dois tipos de antifúngicos estudados: Fluconazol e Voriconazol. Porém, de acordo com Carvalho (2008), a resistência demonstrada incidiu apenas no Fluconazol. Este antifúngico azólico é mais utilizado para tratamento de candidoses mucocutâneas e sistémicas do que o Voriconazol pelo que, o seu uso frequente e prolongado tem determinado o aparecimento de estirpes de *C. albicans* resistentes ao Fluconazol (Lima *et al.* 2008; Pereira, 2010).

Segundo os autores Lyon *et al.* (2010), a resistência dos isolados de *C. albicans* ao Fluconazol pode eventualmente predispor uma resistência ao Voriconazol. Visto que o Voriconazol é um antifúngico recente e que pertence ao grupo dos azólicos, os quais possuem o mesmo mecanismo de acção, estima-se que o mecanismo de resistência se

assemelhe ao mecanismo de resistência do Fluconazol. Estes mecanismos incluem a regulação das bombas de efluxo, assim como alterações no gene da enzima-alvo, ERG11. Um outro estudo demonstra que os 2 isolados (18,2%) que apresentam resistência ao Fluconazol, são sensíveis ao Voriconazol (Lima *et al.* 2009), contrariado o descrito por Lyon *et al.* (2010). Também, de acordo com Azevedo (2005), após avaliação do perfil de susceptibilidade a estes dois antifúngicos, foi demonstrado que o Voriconazol possuía melhor actividade *in vitro* quando comparado com o Fluconazol, mesmo em estirpes resistentes a este último.

Contudo, os autores Lyon *et al.* (2010) consideram que os laboratórios de microbiologia clínica que apenas testam a sensibilidade ao Fluconazol devem alertar os clínicos sobre a possibilidade de o Voriconazol não ser indicado para o tratamento de infecções por *Candida* spp. No presente trabalho esta situação não é verificada: o isolado de Lisboa resistente ao Fluconazol possui sensibilidade ao Voriconazol. Todavia, de acordo com a Tabela 34, Anexo III, para a estirpe em questão, o diâmetro do halo obtido foi 20 mm, aproximando-se do diâmetro mínimo (≥ 17 mm) requerido para caracterizar o isolado como sensível ao Voriconazol. Sendo que o isolado L11 (Tabela 34, Anexo III) foi único em relação a este tipo de comportamento, é possível que esta estirpe venha a adquirir resistência ao Voriconazol, se existir terapêutica contínua e descuidada com o antifúngico. Contudo, para se poder afirmar com maior fiabilidade e veracidade dever-se-ia estudar mais estirpes do tipo C:3/4 de forma a verificar o tipo de resistência ao Voriconazol, intrínseca, natural ou adquirida. Dever-se-ia também avaliar a variação da susceptibilidade ao Voriconazol ao longo do tempo pelo isolado L11. Deste modo, tirar-se-iam conclusões em relação ao descrito por Lyon *et al.* (2010): resistência ao Fluconazol poderá prever resistência ao Voriconazol.

Com o intuito de investigar a existência de diferença entre as susceptibilidades aos antifúngicos Fluconazol e Voriconazol das três estirpes maioritariamente identificadas entre os isolados estudados, A:2/3, A:3 e A:3/4, procedeu-se à realização do teste estatístico *One-Way* ANOVA. De acordo com este teste é proposta a hipótese: H_0 – não existem diferenças significativas entre as susceptibilidades das estirpes A:2/3, A:3 e A:3/4 ao Fluconazol e Voriconazol.

A análise do nível de significância é realizada mediante a comparação com um valor α previamente estipulado de 0,05. Quando o valor $\text{Sig} \leq \alpha$ é rejeitada a hipótese nula (H_0), quando $\text{Sig} > \alpha$ não se rejeita a hipótese nula (H_0). De acordo a tabela 36 do Anexo IV, o valor de Sig para o Fluconazol é 0,113 e o valor de Sig para o Voriconazol é 0,879. Assim sendo, como $0,113 > 0,05$ e $0,879 > 0,05$, não se pode rejeitar H_0 , pelo que não existem diferenças significativas entre as susceptibilidades dos genótipos A:2/3, A:3 e A:3/4.

Os estudos de sensibilidade aos antifúngicos, assim como identificação de perfis de susceptibilidade de estirpes são deveras importantes, visto que permitem otimizar decisões clínicas sobre a terapêutica mais adequada a cada indivíduo.

Consequentemente, devem ser realizados mais estudos epidemiológicos em doentes com infecção por leveduras, tendo em consideração o seu estado de saúde e a sua história clínica. A padronização de metodologias para a avaliação da susceptibilidade de isolados clínicos aos fármacos antifúngicos pode contribuir para a instituição atempada da terapêutica mais adequada para o controle da infecção (Bodey & Issel 2002).

CONCLUSÕES

“A identificação da espécie fúngica responsável por uma infecção constitui o principal objectivo da realização de um bom diagnóstico micológico.” (Pereira, 2010). Desta forma é muito importante que os laboratórios de microbiologia clínica possuam métodos de diagnóstico rápidos, simples e baratos em relação a uma identificação correcta ao nível de espécie e em relação ao estudo da sensibilidade aos antifúngicos. Contudo, esta identificação ao nível de espécie deixa lacunas em certas informações: não permite saber a origem das infecções, um facto importante para a compreensão da evolução das infecções nosocomiais, nem permite a distinção entre isolados de *Candida albicans*, possibilitando desta forma um estudo epidemiológico.

Este trabalho teve como objectivo a diferenciação de estirpes de *Candida albicans* através de uma metodologia molecular inovadora e precisa, simples, barata e rápida, por meio de amplificações por PCR, nunca antes efectuada no Ocidente.

Os produtos biológicos dos 60 isolados seleccionados para este estudo foram primeiramente processados nas instituições de origem, de acordo com a rotina laboratorial instituída.

Entre os métodos convencionais para a identificação de leveduras foram usados como primeira linha meios cromogénicos, nos quais a produção de cores pelas colónias no meio permite a identificação de espécies. O meio CHROMagar *Candida*[®] foi utilizado para os isolados provenientes da Covilhã e para 7 isolados de Lisboa; o meio CandiSelect[®] foi usado para 13 isolados de Lisboa, e o meio chromID *Candida*[®] foi empregue para a identificação dos isolados de Viseu. Porém, os meios cromogénicos possuem várias limitações, como o facto de isolados da mesma espécie por vezes produzirem colónias de cores diferentes, ou o inverso, isolados de espécies diferentes apresentarem a mesma cor de colónias. Outra limitação consiste no facto de este tipo de metodologia depender da interpretação visual do operador em relação aos resultados. Todos estes pontos limitam em muito uma identificação correcta da espécie.

Para os isolados da Covilhã e de Lisboa foi usado um outro teste de primeira linha na identificação de *C. albicans*, o Teste da Blastese ou Teste da Filamentação, que consiste num método rápido, de fácil interpretação e custo baixo.

Contudo, pode apresentar algumas limitações pois estudos efectuados indicam uma pequena percentagem (5%) de isolados de *C. albicans* que não formam tubo germinativo (Kwon-Chung & Bennet 1992). Tanto nos isolados da Covilhã como de Lisboa foram obtidos resultados negativos, porém, apenas o isolado proveniente da Covilhã com tal resultado foi submetido a um outro teste, o Bichro-Latex Albicans[®] (Fumouze), o qual veio a confirmar a identificação desse mesmo isolado como *C. albicans*. Assim, de acordo com estes resultados pode-se constatar que a utilização dos meios cromogénicos e o teste da blastese, para identificação de leveduras do género *Candida*, é insuficiente e que se torna necessária a utilização de outras metodologias de identificação da espécie *C. albicans*, como testes de identificação bioquímica.

Os laboratórios de microbiologia clínica dos hospitais possuem grande volume de amostras diárias, uma vez que incluem amostras que abrangem uma vasta gama de doentes, estando incluídos vários serviços de internamento, urgências, e ambulatório. Assim sendo, de forma a aliviar o grande volume de trabalho existente e a providenciar resultados de um modo mais rápido, recorre-se à utilização de equipamentos automatizados, como o sistema VITEK[®] e o sistema Microscan WalkAway[®], para a identificação fisiológica e bioquímica das leveduras.

Os isolados *C. albicans* provenientes da cidade da Covilhã e da cidade de Viseu foram identificados pelo sistema VITEK[®] enquanto que os isolados de Lisboa foram identificados pelo sistema Microscan WalkAway[®]. Tanto um como o outro executam em poucas horas testes de identificação e susceptibilidade aos antifúngicos, às leveduras de maior interesse clínico utilizando as cartas YST[®] no sistema VITEK[®], e as cartas de identificação rápida RYI[®] no sistema WalkAway[®]. Embora sejam bons aliados na rotina laboratorial hospitalar, estes dois sistemas possuem limitações, sendo uma delas a base de dados relativa às leveduras. Nesta base de dados estão incluídas as leveduras com maior importância clínica e maior incidência, deixando de parte leveduras com um nível de prevalência inferior. Uma vez que a identificação da espécie é muito importante para realizar um bom diagnóstico e para aferir qual o melhor tipo de fármaco para combater a infecção, se a levedura não consta na base de dados nunca poderá ser identificada, deixando obviamente uma grande e grave lacuna na identificação, com consequências na terapêutica. Porém, segundo um trabalho, a espécie *C. krusei*, naturalmente resistente ao Fluconazol, e considerada como uma levedura clinicamente

importante, não foi identificada pelo VITEK[®] (Huang *et al.* 2001). Este caso pode gerar situações gravíssimas, de vida ou morte, devido a este lapso na identificação.

Outro problema consiste nas identificações incorrectas realizadas pelos equipamentos. Embora o número desta situação seja baixo, como descrito na literatura, esta situação está presente e é passível de acontecer com qualquer isolado, trazendo sérios problemas ao nível da abordagem terapêutica (St. Germain & Beauchesne 1991; Dooley *et al.* 1994; Huang *et al.* 2001).

Todas estas metodologias convencionais permitem apenas a distinção ao nível de espécie. Para diferenciação de estirpes torna-se necessário uma abordagem do ponto de vista molecular. A utilização de métodos moleculares permite, além da distinção entre estirpes, realizar um traçado epidemiológico de forma a melhor compreender a mecânica das infecções pelos tipos de *C. albicans*, a sua incidência, prevalência, origem, a sua dispersão geográfica, susceptibilidade a antifúngicos, e perceber se existem diferenças na virulência e o porquê. Todas estas informações podem ser facultadas pela biologia molecular.

Com o objectivo de otimizar a diferenciação de estirpes de *C. albicans* por métodos moleculares mais rápidos e sensíveis, têm sido utilizadas técnicas moleculares que têm como base a metodologia de PCR.

Neste trabalho, o DNA genómico dos 60 isolados provenientes da Covilhã, de Lisboa e de Viseu foi submetido a amplificação por três reacções de PCR independentes, com os primers dos conjuntos P-I, P-II e AS-I, de acordo com o protocolo descrito por Adachi *et al.* (2009). Após cada amplificação e posterior electroforese em gel de agarose procedeu-se ao cruzamento dos resultados obtidos com o intuito de obter uma caracterização apurada dos diferentes tipos moleculares das estirpes estudadas.

A reacção de PCR com o conjunto de primers P-I foi simples de otimizar e providenciou resultados fáceis de interpretar uma vez que a cada genótipo A, B ou C pertencia um dado padrão de bandas específicas.

A reacção de PCR com o conjunto de primers P-II providenciou resultados bastante distintos e, quando associados aos resultados da amplificação com o conjunto de primers P-I, o seu poder discriminatório aumentou consideravelmente. Assim, a utilização deste método consiste numa excelente opção para estudar e diferenciar

estirpes, e deste modo realizar um estudo epidemiológico fiável e abrangente. Contudo, a optimização da técnica de PCR com o conjunto de primers P-II revelou-se bastante difícil e trabalhosa quando comparada com a optimização da técnica de PCR com o conjunto de primers P-I. Foram necessárias várias repetições da reacção de PCR com o conjunto de primers P-II, com os isolados das três cidades, até que se obtivessem bandas visíveis, ou seja, até que se obtivesse produtos amplificados e consequentemente se pudesse diferenciar as estirpes com base nos perfis após electroforese no gel de agarose.

A técnica de PCR com o conjunto de primers AS-I foi bastante simples de realizar e os perfis electroforéticos resultantes foram muito fáceis de interpretar. Contudo, a combinação destes perfis com os perfis obtidos anteriormente com o conjunto de primers P-I e P-II não vieram acrescentar mais informação à obtida. Praticamente todos os genótipos obtidos pelos pares de primers P-I e P-II não foram diversificados com a informação fornecida pelos perfis obtidos pelo set AS-I. Assim, neste trabalho, o 3º conjunto de primers utilizado não teve utilidade, ao contrário do descrito na literatura (Hattori *et al.* 2006; Iwata *et al.* 2006), optando-se por não incluir esses mesmos resultados neste trabalho.

Sendo os métodos moleculares bastante sensíveis, qualquer pequena falha na técnica pode ser o suficiente para que não se obtenham resultados. Segundo Roux (1995, 2009) existem várias causas para a ausência de bandas após a reacção de PCR: (i) falta de um ou mais reagentes na mix de PCR, (ii) concentrações finais dos reagentes erradas, (iii) degradação dos reagentes, sendo que os dNTP's são os mais instáveis, e os primers, tampão e DNA são os mais estáveis, (iv) erros inerentes ao operador, (v) programação errada do termociclador, (vi) interferência dos químicos utilizados na preparação do DNA, (vii) presença de intrões no DNA genómico no local de *annealing* dos primers, (viii) annealing dos primers em sequências homólogas distanciadas da sequência alvo, (ix) problemas inerentes aos primers como mau design, formação de *loops* e emparelhamento do *forward* e do *reverse*.

Após verificação dos parâmetros do termociclador, que se mostraram correctos, e sendo o esquecimento de um dos reagentes um dos erros mais grosseiros na técnica de PCR, após algumas reacções de PCR falhadas com o conjunto de primers P-II,

considerou-se fortemente esta hipótese. Contudo, veio-se a verificar que o problema relacionado com a ausência de bandas não residia na falta de reagentes na mix. Uma vez que a falta de produtos amplificados se manteve considerou-se a hipótese de os reagentes possuírem uma concentração que não a indicada para a reacção de PCR em questão. Porém, esta hipótese, tal como a primeira, foi rapidamente descartada uma vez que se verificou que as concentrações dos dNTP's, dos primers, do MgCl₂ e do tampão eram as correctas, como descrito no protocolo de Iwata *et al.* (2006). O próximo passo consistiu em preparar novas alíquotas dos reagentes (dNTP's, primers ASDcF e pCScR e MgCl₂) para verificar se a ausência de produto de PCR se devia à degradação dos reagentes. Também novas alíquotas de DNA 1:750 foram preparadas, a partir da solução mãe que continha o DNA extraído.

Após reacção de PCR com novas mix's observou-se uma vez mais a ausência de bandas no gel de electroforese. Para eliminar dúvidas em relação à performance do operador foi solicitada a ajuda de um segundo operador, para a realização da técnica de PCR. Novamente se verificou ausência de produtos amplificados.

De forma a atrasar o trabalho o menos possível, e após os 60 isolados estarem estudados para o conjunto de primers P-I, colocou-se de lado a técnica de PCR com o conjunto de primers P-II e avançou-se para a 3^a amplificação por PCR, com os primers AS-I. Utilizando as mesmas alíquotas dos reagentes e dos DNAs que anteriormente se tinham usado para a reacção de PCR com o conjunto de primers P-II, obtiveram-se bons resultados, ou seja, foi possível a visualização de bandas no gel de agarose, demonstrando produtos amplificados. Esta situação descartou de imediato a hipótese que anteriormente se tinha colocado: problemas com os reagentes da mix e com o DNA. Uma vez que as condições, incluindo os parâmetros do termociclador, entre as três técnicas de PCR eram as mesmas colocou-se a hipótese de o problema residir, possivelmente, no par P-II, uma vez que foi o único reagente que variou entre as três reacções de PCR. Como tal, foi realizada uma nova encomenda do par de primers P-II. Após preparação do mesmo¹⁰ para a reacção de PCR, foram realizadas novas mix's com os isolados cujo DNA não foi amplificado anteriormente com o conjunto de primers P-II antigo. Curiosamente foram obtidos resultados, ou seja, foi possível a visualização de

¹⁰ Set de primers P-II novo.

bandas no gel de agarose, após electroforese, demonstrando que a reacção de PCR se tinha dado, como descrito na literatura. Porém, após algumas utilizações do par P-II nas reacções de PCR, o que antes foi descrito voltou a suceder: ausência de bandas. Contudo, após várias repetições da técnica, sempre com diluições novas de primers, foi possível obter os perfis desejados e assim genotipar as estirpes e realizar o estudo epidemiológico desejado.

Conclui-se então que a dificuldade em obter resultados residuiu na utilização do par P-II. No entanto, não se conseguiu averiguar a razão, ficando em aberto se o problema se deveu a desnaturação dos primers com consequente formação de *loops* e emparelhamento do *forward* e do *reverse*; se havia presença de intrões no DNA genómico no local de *annealing*, ou se ocorreu *annealing* dos primers em sequências homólogas distanciadas da sequência alvo, como descrito por Roux (1995, 2009).

Embora neste trabalho a utilização do P-II não tenha sido fácil, simples e de baixo custo como descrito na literatura, foram obtidos resultados bastante discriminatórios com a utilização em conjunto de P-I e de P-II. A combinação dos perfis obtidos pelas duas técnicas permitiu diferenciar em alto grau os isolados de *C. albicans*, além de que possibilitou aprofundar mais o estudo epidemiológico pretendido, na medida em que foram comparados os perfis obtidos pelos isolados da Covilhã, de Lisboa e de Viseu, entre si, e com outros isolados estudados no Oriente (China e Japão). Com esta técnica foi possível a identificação de estirpes em Portugal, ainda que em número muito reduzido, que nunca haviam antes sido reconhecidas. Foi possível ainda identificar genótipos característicos destas regiões, Japão, China e Portugal.

Porém, para completar o estudo, e assim se poder fazer uma análise mais fiável e próxima da realidade, dever-se-iam estudar isolados provenientes de outros países orientais e ocidentais.

Relativamente a Portugal foi possível realizar também uma distinção entre as estirpes provenientes da Covilhã, de Lisboa e de Viseu. Entre os 20 isolados da Covilhã foram identificadas 7 estirpes distintas. Sendo que os isolados do Centro Hospitalar Cova da Beira, E.P.E. provinham de diversos tipos de produtos biológicos oriundos de vários serviços era de esperar que existisse heterogeneidade entre as estirpes de *C. albicans*. Entre os 20 isolados de Lisboa foi possível a identificação de 10 estirpes

diferentes. Sendo que estes isolados provinham de dois hospitais (Hospital Santa Maria, E.P.E. e Instituto Português de Oncologia) que abrangem grande parte da população lisboeta era de esperar também heterogeneidade entre os resultados. A acrescentar a esta diversidade está o facto de o produto biológico ser o mesmo (hemocultura) e ter a sua origem também, como nos isolados da Covilhã, em vários serviços distintos. Um estudo interessante para se realizar seria recolher hemoculturas de vários serviços de um hospital, agrupar os isolados por serviço e comparar os resultados obtidos entre eles. Deste modo poder-se-ia averiguar qual o grau de diversidade entre as hemoculturas dos serviços nesse mesmo hospital, e estudar a origem das estirpes. Entre os 20 isolados de Viseu, provenientes de um só serviço, a U.C.I.P., foi possível a distinção de 4 genótipos, graças à realização de um 2º PCR com o conjunto de primers P-II. Verifica-se alguma homogeneidade nestes resultados, o que, de certa forma seria de esperar, uma vez que, em serviços como a U.C.I.P., é muito comum a ocorrência de infecções nosocomiais cruzadas, devido à manipulação de doentes debilitados pelos mesmos profissionais de saúde em áreas muito limitadas, e por vezes, devido à partilha dos mesmos equipamentos e dispositivos médicos.

O estudo ao nível de estirpe, entre as várias informações que pode fornecer, a origem das infecções é uma delas. Neste caso específico verifica-se um caso de origem exógena, menos comum do que a origem endógena. O facto de o produto biológico em estudo ser o mesmo (aspirado brônquico) confirma esta hipótese. Neste tipo de casos, a origem primária da infecção é realmente endógena, em que um dado doente imunodeprimido adquire uma infecção por *C. albicans*, devido ao oportunismo da levedura. Através da manipulação, pelas mãos dos profissionais, ou pela incorrecta esterilização dos equipamentos de ventilação, a estirpe residente nesse doente poderá ser passada para um outro (infecção cruzada). Neste caso, a origem da infecção será exógena. Sendo que existe muito pouca diversidade entre os genótipos dos isolados de Viseu, estima-se que se esteja perante uma situação de origem exógena.

Como referido anteriormente, embora a utilização do par de primers P-II tenha sido trabalhoso, seria de grande interesse continuar este estudo epidemiológico. A continuação deste trabalho passaria por abarcar um maior volume de amostras estudadas, na ordem de largas dezenas, e por abranger variadas regiões, como Minho, Trás-os-Montes, Algarve, Alentejo. Desta forma seria possível aferir com maior fiabilidade e

maior veracidade qual a ocorrência e distribuição de cada estirpe nestas regiões, e quais as que são características do nosso país. Um outro ponto de estudo seria, como referido anteriormente, a selecção de amostras por serviços para averiguar as diferenças encontradas entre os isolados seleccionados. Deste modo seria possível verificar a fonte e a origem de infecção para posteriormente se tomarem as medidas de combate e prevenção necessárias, além de que seria possível também averiguar qual o antifúngico mais adequado a cada situação.

Uma outra abordagem para continuação deste estudo epidemiológico passaria pelo estudo de isolados provenientes do Ocidente como países europeus ou americanos. Seria interessante também estudar outros países orientais, além da China ou do Japão, para averiguar a incidência de estirpes características dessa zona. Para um estudo epidemiológico com carácter mais internacional seria também atraente estudar isolados provenientes do continente americano, de África e da Oceânia.

Relativamente ao tipo de produtos biológicos verificou-se que amostras provenientes do tracto respiratório baixo poderão preferencialmente ser colonizadas por estirpes com o genótipo A. Mais estudos deveriam ser realizados para confirmação destes resultados. Se porventura tal se viesse a demonstrar, esta informação seria uma mais valia para o diagnóstico clínico e consequente terapêutica, além de que os dados epidemiológicos seriam de extrema importância para a compreensão da patogenicidade de estirpes de *C. albicans*. Os isolados provenientes de hemoculturas foram os que demonstraram maior heterogeneidade de genótipos. Isto pode dever-se ao facto de, estes produtos biológicos serem provenientes de doentes de uma grande variedade de serviços de três instituições hospitalares: Centro Hospitalar Cova da Beira, EPE, Hospital Santa Maria EPE e Instituto Português de Oncologia. Sendo que as duas últimas instituições abrangem grande parte da população de Lisboa, é de esperar que as estirpes encontradas nestas amostras variem entre si. Os restantes produtos biológicos possuem um número muito baixo de amostragem para se poder tirar conclusões fidedignas. No entanto, a continuação deste estudo através da recolha de maior número de amostras demonstra um trabalho atraente, passível de realizar no futuro.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, o Fluconazol continua a ser activo contra a maior parte dos isolados de *C. albicans*, indo de encontro com o decrito na literatura (Lyon *et al.* 2010).

Em relação às susceptibilidades ao Fluconazol e ao Voriconazol dos tipos mais prevalentes neste estudo, não foram encontradas diferenças significativas, querendo isto dizer, que os genótipos mais comuns possuem susceptibilidades muito similiares entre eles, não existindo nenhum caso “borderline”. Porém, seria também atraente estudar mais isolados com outros tipos de genótipos (B ou C) de forma a verificar a premissa anteriormente descrita.

Embora existam grandes progressos na compreensão molecular dos diferentes mecanismos envolvidos na resistência aos antifúngicos, não está determinado ainda o impacto na clínica (Espinel-Ingroff, 2008). Desta forma, seria interessante no futuro realizar estudos com este tipo de abordagem, com os isolados referenciados neste trabalho, e com isolados provenientes de outras instituições hospitalares.

Como reflexão global, tomei conhecimento ao longo deste estudo efectuado que os estudos epidemiológicos são de extrema importância, permitindo acompanhar as alterações na incidência de estirpes de *C. albicans*, um dos fungos mais patogénicos, ao longo do tempo, e para rastrear focos de infecção, mais concretamente, a sua origem e a sua forma de transmissão.

O diagnóstico laboratorial das infecções fúngicas continua a ser efectuado por métodos tradicionais, que avaliam características fisiológicas e bioquímicas dos elementos fúngicos, mas que, apesar de serem eficazes e de baixo custo, não permitem realizar a diferenciação em estirpe de *C. albicans*. Esta só é conseguida através de métodos moleculares. Embora a metodologia usada neste trabalho tenha sido de grande utilidade para a realização de um estudo epidemiológico, revelou-se bastante trabalhosa, com obtenção de resultados demorados devido à falha da técnica de PCR com o conjunto de primers P-II. Desta forma, este tipo de metodologia necessita ser optimizado até ser utilizado num laboratório de microbiologia clínica, em que os resultados têm de ser facultados de forma rápida, embora se tenha revelado muito útil na diferenciação de estirpes.

BIBLIOGRAFIA

ADACHI, H. *et al.* (2009) Genotyping of *Candida albicans* by Fragment Analysis of Microsatellites Combined with 25S rDNA and RPS-based Strategies. *Japanese Journal of Medical Mycology*. 50, pp.167–174.

ALVES, S. H. *et al.* (2005) Carbohydrate Assimilation Profiles of Brazilian *Candida dubliniensis* isolates based on ID 32C SYSTEM. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 47 (2), pp.109-111.

ANDRIOLE, V. T. (1999) Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 44, p.151–162.

ARAÚJO, C. R. *et al.* (2005) Identificação das leveduras do género *Candida* por métodos manuais convencionais e pelo método cromogéneo CHROMagar *Candida*. *Revista de Patologia Tropical*. 34 (1), pp.37-42.

AVRELLA, D. & GOULART, L. S. (2008) Isolamento de *Candida spp.* da mucosa oral de pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. 40 (3), pp.205-207.

AZEVEDO, A. C. A. (2005). *Avaliação do perfil de susceptibilidade a fluconazol e voriconazol frente a isolados de Candidas spp pelo método de disco-difusão*. Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciências. São Paulo, Brasil: Universidade Federal de São Paulo.

BAGG, J. *et al.* (2005) Voriconazole susceptibility of yeasts isolated from the mouths of patients with advanced cancer. *Journal of Medical Microbiology*. 54, p.959–964.

BARBEDO, L. S. & SGARB, D. B. G. (2010) Candidíase. *DST: Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*. 22 (1), pp.22-38.

BENEDETTI, V. P. *et al.* (2011) Avaliação da Susceptibilidade a Antifúngicos de Diferentes Espécies de Leveduras *Candida* Isoladas de Mucosa Bucal e Pele. *RBAC*. 43 (2), pp.93-95.

BERKHOUT, R. (2002). *Candida albicans*. In: PONTÓN, J. *et al.* *Revista Iberoamericana de Micologia. Hongos y Actinomicetos Alergícos*. 1st ed. Bilbao: Imprenta Berekintza, pp.25-26.

BIO-RAD (2008) *CandiSelect 4 - Chromogenic agar medium for selective isolation of yeasts, direct identification of Candida albicans and presumptive identification of Candida tropicalis, Candida glabrata and Candida krusei*. Redmond: BIO-RAD.

BODEY, G.P. & ISSEL, B.F. (2002) The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* Fungemia in patients with cancer. *Journal of Hospital Infection*. 112, pp.380-85.

BORGES, E. C., *et al.* (2000) Uso do Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) no estudo populacional do *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911. *Caderno de Saúde Pública*. 16 (2), pp.97-100.

BOUGNOUX, M. E. *et al.* (2006) Multilocus Sequence Typing Reveals Intrafamilial Transmission and Microevolutions of *Candida albicans* Isolates from the Human Digestive Tract. *Journal of Clinical Microbiology*. 44 (5), p.1810–1820.

CARDOSO, B. C. (2004). *Dissertação apresentada ao Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia – Engenharia de Bioprocessos pela Universidade do Minho*. Minho: Universidade do Minho.

CARVALHO, E. E. (2008) *Diagnóstico Laboratorial de Micoses Humanas – Métodos Convencionais vs Métodos Moleculares*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em em Ciências Biomédicas. Lisboa: IHMT.

CHANG, H. C. *et al.* (2000) Evaluation of a Capacitance Method for Direct Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts in Positive Blood Cultures. *Journal of Clinical Microbiology*. 38 (3), p.971–976.

CHEN, S. C. A., *et al.* (1996) Antifungal susceptibility testing using the E test: comparison with the broth macrodilution technique. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 37, pp.265-273.

CHIBANA, H. *et al.* (1994). Diversity of Tandemly Repetitive Sequences due to Short Periodic Repetitions in the Chromosomes of *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology*. 176 (3), pp.3851-3858.

CHIBANA, H. & MAGEE, P. T. (2009) The Enigma of the Major Repeat Sequence of *Candida Albicans*. *Future Microbiology*. 4 (2), pp.171-179.

CHINCHILLA, A. S. (1993) Incidencia de infeccion nosocomial en una unidad de cuidados intensivos. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*. 14, pp.7-11.

CHINDAMPORN, A. *et al.* (1995) Analysis of the chromosomal localization of the repetitive sequences (RPSs) in *Candida albicans*. *Microbiology*. 141, pp.469-476.

CHINDAMPORN, A. *et al.* (1998) Repetitive sequences (RPSs) in the chromosomes of *Candida albicans* are sandwiched between two novel stretches, HOK and RB2, common to each chromosome. *Microbiology*. 144, pp.849-857.

COSTA, K. R. C. & CANDIDO, R. C. (2007) Diagnóstico Laboratorial da Candidíase Oral. *NewsLab*. 83, pp.138-145.

COSTA, I. C. *et al.* (2008) Resposta imune a *Candida albicans*. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*. 29, pp.27-40.

DADE BEHRING (2004). *Manual de procedimentos do painel de identificação rápida de leveduras*. U.S.A.: Dade Behring Inc.

DADE BEHRING (2006). *MicroScan em Destaque*. Portugal: Dade Behring.

DALLE, F. *et al.* (2000). Comparative Genotyping of *Candida albicans* Bloodstream and Nonbloodstream Isolates at a Polymorphic Microsatellite Locus. *Journal of Clinical Microbiology*. 38 (12), p.4554–4559.

DIAS, C. S. (2010) Prevenção da Infecção Nosocomial da Infecção Nosocomial - ponto de vista do especialista. *Revista Portuguesa de Medicina Intensiva*. 17 (1), pp.47-53.

DOOLEY, D. P. *et al.* (1994). Misidentification of Clinical Yeast Isolates by Using the Updated Vitek Yeast Biochemical Card. *Journal of Clinical Microbiology*. 32 (12), pp.2889-2892.

DUCEL, G. *et al.* (2002) *Prevenção de infecções adquiridas no hospital - Um guia prático*. Lyon, Genebra: PNCI.

EL-ZAATARI, M. *et al.* (1990) Evaluation of the Updated Vitek Yeast Identification Data Base. *Journal of Clinical Microbiology*. 28 (9), pp.1938-1941.

ESPINEL-INGROFF, A. (2008). Mechanisms of resistance to antifungal agents: Yeasts and filamentous fungi. *Revista Iberoamericana de Micologia*. 25, pp.101-106.

FAVALESSA, O. C. *et al.* (2010) Aspectos micológicos e suscetibilidade in vitro de leveduras do gênero *Candida* em pacientes HIV-positivos provenientes do Estado de Mato Grosso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 43 (6), pp.673-677.

FEDERAL DRUGS ADMINISTRATION (2004) *U.S. Department of Health and Human Services*. [online]. [Accessed 12 Julho 2009]. Available from World Wide Web: <<http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/NewDrugApplicationsNDAs/UCM082811.pdf>>

FOONGLADDA, S. *et al.* (2002). Comparative evaluation of CandiSelect test and conventional methods for identification of *Candida albicans* in routine clinical isolates. *Mycoses*. 45 (3-4), pp.75-78.

FRANÇA, J. C. B. *et al.* (2008). Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 41 (1), pp.23-28.

FRILABO (2006). *CHROMagar Candida* [online]. [Accessed 20 Aug 2011]. Available from [World Wide Web: <http://www.frilabo.pt/fcms//index.php?option=content&task=view&id=172>](http://www.frilabo.pt/fcms//index.php?option=content&task=view&id=172)

FUMOZE (2009). *BICHRO-LATEX ALBICANS*. Société Européenne de Recherche et de Fabrications Immuno-Biologiques.

GARCIA-HERMOSO, D. *et al.* (2007) Comparison of Microsatellite Length Polymorphism and Multilocus Sequence Typing for DNA-Based Typing of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*. 45 (12), p.3958–3963.

GILLESPIE, S. H. & BAMFORD, K. B. (2000) *Medical Microbiology and Infection at a Glance*. Oxford: Blackwell Science.

GOMES, C. L. *et al.* (2010) Identificação e perfil de sensibilidade de *Candida spp* isoladas de urina de pacientes com Candidúria em Iguatu-Ceará. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. 42 (3), pp.223-225.

GROSSI, A. (2010) *A incidência de Candida spp na rede hospitalar e comunitária atendidas pelo laboratório Labimed de Santa Maria, RS, Brasil*. Trabalho de Conclusão de Curso em Biomedicina da Universidade Luterana Do Brasil campus.

GUZEL, A. B. *et al.* (2011) Evaluation of risk factors in patients with vulvovaginal candidiasis and the value of chromID *Candida* agar versus CHROMagar *Candida* for recovery and presumptive identification of vaginal yeast species. *Medical Mycology*. 49, p.16–25.

GUZEL, A. B. *et al.* (2011) An Evaluation of Risk Factors in Pregnant Women with *Candida* Vaginitis and the Diagnostic Value of Simultaneous Vaginal and Rectal Sampling. *Mycopathologia*. 172, p.25–36.

HATTORI, H. *et al.* (2006) Genotype analysis of *Candida albicans* isolates obtained from different body locations of patients with superficial candidiasis using PCRs targeting 25S rDNA and ALT repeat sequences of the RPS. *Journal of Dermatological Science*. 41, pp.31-46.

HATTORI, H. *et al.* (2009) Improvement of the Repetitive Sequence-Based Identification and Genotyping of *Candida albicans* Using ALT-Specific Primers. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 62, pp.215-219.

HOSPENTHAL, D. R. *et al.* (2006) Presumptive identification of *Candida* species other than *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. tropicalis* with the chromogenic medium CHROMagar *Candida*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 5 (1), pp.1-5.

HUANG, L. *et al.* (2001). A Comparison of Methods for Yeast Identification Including CHROMagar *Candida*, Vitek System YBC and a Traditional Biochemical Method. *Chinese Medical Journal*. 64, pp.568-574.

IWATA, T. *et al.* (2006) Genotyping of *Candida albicans* on the basis of polymorphisms of ALT repeats in the repetitive sequence (RPS). *Journal of Dermatological Science*. 41, p.43—54.

KWON-CHUNG, K.J. & BENNET, J.E. (1992) *Medical Mycology*. Lea & Febinger.

LEAW, S. N. *et al.* (2007) Identification of Medically Important *Candida* and Non-*Candida* Yeast Species by an Oligonucleotide Array. *Journal of Clinical Microbiology*. 45 (7), p.2220–2229.

LEVY, C. E. (2004). *Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde*. Brasília: Editora Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

LIMA, K. M. *et al.* (2008) *Candida albicans* e *Candida tropicalis* isoladas de onicomicose em paciente HIV-positivo:co-resistência in vitro aos azólicos. *Revista de Patologia Tropical*. 37 (1), pp.57-64.

LIMA, K. M. *et al.* (2009) Espécies e suscetibilidade antifúngica in vitro de leveduras isoladas em unhas de pacientes com vírus da imunodeficiência humana. *Revista de Ciências Médicas*. 18 (2), pp.89-97.

LINARES, M. J. *et al.* (2005) Susceptibility of Filamentous Fungi to Voriconazole Tested by Two Microdilution Methods. *Journal of Clinical Microbiology*. 43 (1), p.250–253.

LYON, G. M. *et al.* (2010) Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Isolates from the *Candida* Surveillance Study. *Journal of Clinical Microbiology*. 48 (4), p.1270–1275.

LYON, J. P. *et al.* (2010) *Candida albicans*: Genotyping Methods and Clade Related Phenotypic Characteristics. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41, pp.841-849.

MARGOTTO, P. R. (2004). Nova geração de antifúngicos. *In*: Escola Superior de Ciências da SAÚDE, (ed). *XVIII Congresso Brasileiro de Perinatologia*. São Paulo.

MCMANUS, B. A. *et al.* (2008) Multilocus Sequence Typing Reveals that the Population Structure of *Candida dubliniensis* is Significantly Less Divergent than That of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*. 46 (2), p.652–664.

MILLAR, B. C. *et al.* (2002) Genotypic subgrouping of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by 25S intron analysis. *Journal of Applied Microbiology*. 35, p.102–106.

MUIR, A. *et al.* (2009) Rapid electrochemical identification of pathogenic *Candida* species. *Journal of Medical Microbiology*. 58, p.1182–1189.

ODDS, F. C & BERNAERTS, R (1994) CHROMagar *Candida*, a New Differential Isolation Medium for Presumptive Identification of Clinically Important *Candida* Species. *Journal of Clinical Microbiology*. 32 (8), pp.1923-1929.

ODDS, F. C. *et al.* (2006) *Candida albicans* Strain Maintenance, Replacement, and Microvariation Demonstrated by Multilocus Sequence Typing. *Journal of Clinical Microbiology*. 44 (10), p.3647–3658.

OLIVEIRA, G. S. *et al.* (2006). An evaluation of manual and mechanical methods to identify *Candida spp.* from human and animal sources. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 48 (6), pp.311-315.

PELLETIER, R. *et al.* (2002) Voriconazole and fluconazole susceptibility of *Candida* isolates. *Journal of Medical Microbiology*. 51, p.479–483.

PEREIRA, A. P. V. (2010) *Identificação Molecular de Candidoses invasivas no Centro Hospitalar Cova da Beira, E.P.E. Métodos Convencionais vs. Métodos Moleculares*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas. Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa.

PEREIRA, D. *et al.* (2011). *Translocações Recíprocas: a sua importância na medicina da reprodução. A propósito de um caso*. [online]. [Accessed 03 Aug 2011]. Available from World Wide Web: <http://www.apdpm.org.pt/_scripts/comunicacoes/-1405615779.pdf>

PRESCOTT, L. M. *et al.* (2002) *Microbiology*. New York: The McGraw–Hill Companies.

QUINDOS, G. *et al.* (1997) Evaluation of Bichro-latex Albicans, a New Method for Rapid Identification of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*. 35(5), p.1263–1265.

ROUX, K. H. (1995) Optimization and Troubleshooting in PCR. *Genome Research*. 4, pp.S185-S194.

ROUX, K. H. (2009) Optimization and Troubleshooting in PCR. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 4, pp.1-6.

SAMPAIO, P. *et al.* (2005) New Microsatellite Multiplex PCR for *Candida albicans* Strain Typing Reveals Microevolutionary Changes. *Journal of Clinical Microbiology*. 43 (8), p.3869–3876.

SANTOS JR., I. D. *et al.* (2005) Características gerais da ação do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. *Scientia Medica*. 15 (3), pp.189-197.

SENDID, B. *et al.* (2007) Prospective evaluation of the new chromogenic medium CandiSelect 4 for differentiation and presumptive identification of the major pathogenic *Candida* species. *Journal of Medical Microbiology*. 56, pp.495-499.

SHEPARD, J. R. *et al.* (2008) Multicenter Evaluation of the *Candida albicans/Candida glabrata* Peptide Nucleic Acid Fluorescent In Situ Hybridization Method for Simultaneous Dual-Color Identification of *C. albicans* and *C. glabrata* Directly from Blood Culture Bottles. *Journal of Clinical Microbiology*. 46 (1), p.50–55.

SHE, X. *et al.* (2008) Genotype comparisons os strains of *Candida albicans* from patients with cutaneous candidiasis and vaginal candidiasis. *Chinese Medical Journal*. 121 (15), pp.1450-1455.

SOMENZI, C. C. *et al.* (2007) Características Particulares da Micologia Clínica e o Diagnóstico Laboratorial de Micoses Superficiais. *NewsLab*. 77, pp.106-118.

SOUZA, L. K. H. *et al.* (2001). Comparação dos Métodos de Identificação de Leveduras por Técnicas Manuais com o Método Automatizado MicroScan Rapid Yeast Identification Panel. *Revista de Patologia Tropical*. 30 (1) , pp.13-29.

ST. GERMAIN, G. & BEAUCHESNE, D. (1991) Evaluation of the MicroScan Rapid Yeast Identification Panel. *Journal of Clinical Microbiology*. 29 (10), pp.2296-2299.

TRNOVSKY, J. *et al.* (2008) Rapid and Accurate Identification of *Candida albicans* Isolates by Use of PNA FISH Flow. *Journal of Clinical Microbiology*. 46(4), p.1537–1540.

VALLE, G. C. *et al.* (2010) Estudo da Incidência do Gênero *Candida* em Hospital Público Universitário. *NewsLab*. 101, pp.202-222.

WEBSTER, J. & WEBER, R. W. S. (2007) *Introduction to Fungi*. Nova Iorque: Cambridge University Press.

ZARDO, V. & MEZZARI, A. (2004). Os antifúngicos nas infecções por *Candida sp.* *NewsLab*. 63, pp.136-146.

ANEXO I

Tabela 27. Identificação dos diferentes produtos biológicos de acordo com o número de trabalho atribuído no estudo, provenientes da Covilhã e sexo e idade dos doentes.

Nº amostra	Nº de trabalho	Sexo	Idade	Produto	Espécie
76/09	C1	M	86	Exsudado	<i>C. albicans</i>
77/09	C2	F	20	Exs. vaginal	<i>C. albicans</i>
78/09	C3	M	86	Urina	<i>C. albicans</i>
80/09	C4	F	57	Urina	<i>C. albicans</i>
81/09	C5	M	91	Expectoração	<i>C. albicans</i>
82/09	C6	F	81	Asp. brônquico	<i>C. albicans</i>
83/09	C7	M	86	Expectoração	<i>C. albicans</i>
84/09	C8	M	86	Hemocultura	<i>C. albicans</i>
86/09	C9	M	76	Expectoração	<i>C. albicans</i>
87/09	C10	M	86	Cateter	<i>C. albicans</i>
108/09	C11	M	66	Urina	<i>C. albicans</i>
109/09	C12	F	65	Fezes	<i>C. albicans</i>
110/09	C13	M	77	Expectoração	<i>C. albicans</i>
111/09	C14	F	88	Urina	<i>C. albicans</i>
112/09	C15	F	87	Urina	<i>C. albicans</i>
113/09	C16	M	33	Exsudado	<i>C. albicans</i>
114/09	C17	M	33	Exsudado	<i>C. albicans</i>
115/09	C18	F	90	Expectoração	<i>C. albicans</i>
116/09	C19	F	75	Urina	<i>C. albicans</i>
117/09	C20	F	48	Exs. vaginal	<i>C. albicans</i>

Tabela 28. Identificação dos diferentes produtos biológicos de acordo com o número de trabalho atribuído no estudo provenientes de Lisboa e sexo e idade dos doentes .

Nº amostra	Nº de trabalho	Sexo	Idade	Produto	Espécie
Can 11	L1	M	57	Hemocultura	<i>C. albicans</i>
Can 14	L2	F	57	Hemocultura	<i>C. albicans</i>
Can 18	L3	F	67	Hemocultura	<i>C. albicans</i>
Can 20	L4	M	48	Hemocultura	<i>C. albicans</i>
Can 22	L5	M	33	Hemocultura	<i>C. albicans</i>
Can 23	L6	M	70	Hemocultura	<i>C. albicans</i>
Can 25	L7	M	36	Hemocultura	<i>C. albicans</i>
Can 26	L8	M	28	Hemocultura	<i>C. albicans</i>
Can 27	L9	M	37	Hemocultura	<i>C. albicans</i>
Can 35	L10	M	1	Hemocultura	<i>C. albicans</i>
Can 39	L11	F	70	Hemocultura	<i>C. albicans</i>
Can 40	L12	M	79	Hemocultura	<i>C. albicans</i>
Can 41	L13	M	51	Hemocultura	<i>C. albicans</i>
Can 45	L14	F	65	Hemocultura	<i>C. albicans</i>
Can 47	L15	M	57	Hemocultura	<i>C. albicans</i>
Can 54	L16	M	80	Hemocultura	<i>C. albicans</i>
Can 56	L17	F	72	Hemocultura	<i>C. albicans</i>
Can 63	L18	M	64	Hemocultura	<i>C. albicans</i>
Can 64	L19	F	67	Hemocultura	<i>C. albicans</i>
Can 65	L20	F	49	Hemocultura	<i>C. albicans</i>

Tabela 29. Identificação dos diferentes produtos biológicos de acordo com o número de trabalho atribuído no estudo, provenientes de Viseu e sexo e idade dos doentes.

Nº amostra	Nº de trabalho	Sexo	Idade	Produto	Espécie
Can 93	V1	M	57	Asp. brônquico	<i>C. albicans</i>
Can 94	V2	M	45	Asp. brônquico	<i>C. albicans</i>
Can 95	V3	F	63	Asp. brônquico	<i>C. albicans</i>
Can 97	V4	M	62	Asp. brônquico	<i>C. albicans</i>
Can 98	V5	M	39	Asp. brônquico	<i>C. albicans</i>
Can 99	V6	M	27	Asp. brônquico	<i>C. albicans</i>
Can 101	V7	F	58	Asp. brônquico	<i>C. albicans</i>
Can 102	V8	F	51	Asp. brônquico	<i>C. albicans</i>
Can 103	V9	M	37	Asp. brônquico	<i>C. albicans</i>
Can 105	V10	F	76	Asp. brônquico	<i>C. albicans</i>
Can 106	V11	F	72	Asp. brônquico	<i>C. albicans</i>
Can 108	V12	F	28	Asp. brônquico	<i>C. albicans</i>
Can 111	V13	M	36	Asp. brônquico	<i>C. albicans</i>
Can 112	V14	M	44	Asp. brônquico	<i>C. albicans</i>
Can 119	V15	F	81	Asp. brônquico	<i>C. albicans</i>
Can 121	V16	F	72	Asp. brônquico	<i>C. albicans</i>
Can 123	V17	F	49	Asp. brônquico	<i>C. albicans</i>
Can 124	V18	M	56	Asp. brônquico	<i>C. albicans</i>
Can 125	V19	M	75	Asp. brônquico	<i>C. albicans</i>
Can 126	V20	F	84	Asp. brônquico	<i>C. albicans</i>

ANEXO II

Tabela 30. Identificação Convencional e Tipagem Molecular das estirpes *C. albicans* provenientes da Covilhã, isoladas de doentes com infecção fúngica.

Nº amostra	Nº de trabalho	Diagnóstico Convencional				Tipagem Molecular	
		Teste da Blastese	Bichro Latex	Meio Cromogénico	Vitek	P-I	P-II
76/09	C1	-	+	Colónias verdes	<i>C. albicans</i>	A	2/3
77/09	C2	+	nd	Colónias verdes	<i>C. albicans</i>	A	3
78/09	C3	+	nd	Colónias verdes	<i>C. albicans</i>	B	3
80/09	C4	+	nd	Colónias verdes	<i>C. albicans</i>	A	3/4
81/09	C5	+	nd	Colónias verdes	<i>C. albicans</i>	A	3
82/09	C6	+	nd	Colónias verdes	<i>C. albicans</i>	A	3/4
83/09	C7	+	nd	Colónias verdes	<i>C. albicans</i>	A	3/4
84/09	C8	+	nd	Colónias verdes	<i>C. albicans</i>	A	3/4
86/09	C9	+	nd	Colónias verdes	<i>C. albicans</i>	A	3/4
87/09	C10	+	nd	Colónias verdes	<i>C. albicans</i>	C	3
108/09	C11	+	nd	Colónias verdes	<i>C. albicans</i>	A	3
109/09	C12	+	nd	Colónias verdes	<i>C. albicans</i>	C	3/4
110/09	C13	+	nd	Colónias verdes	<i>C. albicans</i>	A	2/3/4
111/09	C14	+	nd	Colónias verdes	<i>C. albicans</i>	B	3
112/09	C15	+	nd	Colónias verdes	<i>C. albicans</i>	A	3
113/09	C16	+	nd	Colónias verdes	<i>C. albicans</i>	B	3
114/09	C17	+	nd	Colónias verdes	<i>C. albicans</i>	B	3
115/09	C18	+	nd	Colónias verdes	<i>C. albicans</i>	A	2/3
116/09	C19	+	nd	Colónias verdes	<i>C. albicans</i>	A	3
117/09	C20	+	nd	Colónias verdes	<i>C. albicans</i>	A	3

Tabela 31. Identificação Convencional e Tipagem Molecular das estirpes *C. albicans* provenientes de Lisboa, isoladas de doentes com infecção fúngica.

Nº amostra	Nº de trabalho	Diagnóstico Convencional				Tipagem Molecular	
		Teste da Blastese	Bichro Latex	Meio Cromogénico	WalkAway	P-I	P-II
Can 11	L1	+	nd	Colónias rosa	<i>C. albicans</i>	A	4
Can 14	L2	+	nd	Colónias rosa	<i>C. albicans</i>	A	3/4
Can 18	L3	+	nd	Colónias rosa	<i>C. albicans</i>	C	3
Can 20	L4	+	nd	Colónias rosa	<i>C. albicans</i>	A	3
Can 22	L5	+	nd	Colónias rosa	<i>C. albicans</i>	A	3
Can 23	L6	+	nd	Colónias rosa	<i>C. albicans</i>	A	3
Can 25	L7	+	nd	Colónias rosa	<i>C. albicans</i>	A	2/3
Can 26	L8	-	nd	Colónias rosa	<i>C. albicans</i>	B	2/3
Can 27	L9	+	nd	Colónias rosa	<i>C. albicans</i>	A	3
Can 35	L10	+	nd	Colónias rosa	<i>C. albicans</i>	C	2
Can 39	L11	+	nd	Colónias rosa	<i>C. albicans</i>	A	4
Can 40	L12	+	nd	Colónias rosa	<i>C. albicans</i>	A	3
Can 41	L13	+	nd	Colónias rosa	<i>C. albicans</i>	C	2/3
Can 45	L14	+	nd	Colónias verdes	<i>C. albicans</i>	A	2
Can 47	L15	+	nd	Colónias verdes	<i>C. albicans</i>	A	2/3
Can 54	L16	-	nd	Colónias verdes	<i>C. albicans</i>	A	3/4
Can 56	L17	+	nd	Colónias verdes	<i>C. albicans</i>	A	3
Can 63	L18	+	nd	Colónias verdes	<i>C. albicans</i>	B	3
Can 64	L19	+	nd	Colónias verdes ⁽¹⁾	<i>C. albicans</i>	A	3/4
Can 65	L20	+	nd	Colónias verdes ⁽¹⁾	<i>C. albicans</i>	C	3

Tabela 32. Identificação Convencional e Tipagem Molecular das estirpes *C. albicans* provenientes de Viseu, isoladas de doentes com infeção fúngica.

Nº amostra	Nº de trabalho	Diagnóstico Convencional				Tipagem Molecular	
		Teste da Blastese	Bichro Latex	Meio Cromogéneo	Vitek	P-I	P-II
Can 93	V1	nd	nd	Colónias azuis	<i>C. albicans</i>	A	3/4
Can 94	V2	nd	nd	Colónias azuis	<i>C. albicans</i>	A	3/4
Can 95	V3	nd	nd	Colónias azuis	<i>C. albicans</i>	A	3/4
Can 97	V4	nd	nd	Colónias azuis	<i>C. albicans</i>	A	3/4
Can 98	V5	nd	nd	Colónias azuis	<i>C. albicans</i>	A	2
Can 99	V6	nd	nd	Colónias azuis	<i>C. albicans</i>	A	3
Can 101	V7	nd	nd	Colónias azuis	<i>C. albicans</i>	A	2/3
Can 102	V8	nd	nd	Colónias azuis	<i>C. albicans</i>	A	2/3
Can 103	V9	nd	nd	Colónias azuis	<i>C. albicans</i>	A	3
Can 105	V10	nd	nd	Colónias azuis	<i>C. albicans</i>	A	2/3
Can 106	V11	nd	nd	Colónias azuis	<i>C. albicans</i>	A	2/3
Can 108	V12	nd	nd	Colónias azuis	<i>C. albicans</i>	A	3
Can 111	V13	nd	nd	Colónias azuis	<i>C. albicans</i>	A	3
Can 112	V14	nd	nd	Colónias azuis	<i>C. albicans</i>	A	2/3
Can 119	V15	nd	nd	Colónias azuis	<i>C. albicans</i>	A	3/4
Can 121	V16	nd	nd	Colónias azuis	<i>C. albicans</i>	A	3
Can 123	V17	nd	nd	Colónias azuis	<i>C. albicans</i>	A	3
Can 124	V18	nd	nd	Colónias azuis	<i>C. albicans</i>	A	3
Can 125	V19	nd	nd	Colónias azuis	<i>C. albicans</i>	A	3
Can 126	V20	nd	nd	Colónias azuis	<i>C. albicans</i>	A	3

ANEXO III

Tabela 33. Resultados do estudo da sensibilidade aos antifúngicos Fluconazol e Voriconazol pelo método de difusão em disco das leveduras provenientes da Covilhã.

Nº amostra	Nº de trabalho	Genótipo	Fluconazol			Voriconazol		
			Diâmetro do halo	S/R	MIC	Diâmetro do halo	S/R	MIC
76/09	C1	A:2/3	36	Sensível	0,32	36	Sensível	0,02
77/09	C2	A:3	34	Sensível	0,53	36	Sensível	0,02
78/09	C2	B:3	39	Sensível	<0,25	39	Sensível	<0,01
80/09	C4	A:3/4	36	Sensível	0,32	39	Sensível	<0,01
81/09	C5	A:3	34	Sensível	0,53	36	Sensível	0,02
82/09	C6	A:3/4	39	Sensível	<0,25	39	Sensível	<0,01
83/09	C7	A:3/4	38	Sensível	<0,25	45	Sensível	<0,01
84/09	C8	A:3/4	36	Sensível	0,32	32	Sensível	0,04
86/09	C9	A:3/4	36	Sensível	0,32	32	Sensível	0,04
87/09	C10	C:3	37	Sensível	<0,25	36	Sensível	0,02
108/09	C11	A:3	37	Sensível	<0,25	35	Sensível	0,02
109/09	C12	C:3/4	37	Sensível	<0,25	6	Resistente	>6,1
110/09	C13	A:2/3/4	43	Sensível	<0,25	40	Sensível	0,02
111/09	C14	B:3	39	Sensível	<0,25	43	Sensível	<0,01
112/09	C15	A:3	37	Sensível	<0,25	42	Sensível	<0,01
113/09	C16	B:3	34	Sensível	0,53	36	Sensível	0,02
114/09	C17	B:3	34	Sensível	0,53	31	Sensível	0,05
115/09	C18	A:2/3	41	Sensível	<0,25	40	Sensível	<0,01
116/09	C19	A:3	43	Sensível	<0,25	45	Sensível	<0,01
117/09	C20	A:3	36	Sensível	0,32	42	Sensível	<0,01

Tabela 34. Resultados do estudo da sensibilidade aos antifúngicos Fluconazol e Voriconazol pelo método de difusão em disco das leveduras provenientes de Lisboa.

Nº amostra	Nº de trabalho	Genótipo	Fluconazol			Voriconazol		
			Diâmetro do halo	S/R	MIC	Diâmetro do halo	S/R	MIC
Can 11	L1	A:4	30	Sensível	1,4	34	Sensível	0,03
Can 14	L2	A:3/4	29	Sensível	1,8	21	Sensível	0,41
Can 18	L3	C:3	37	Sensível	<0,25	34	Sensível	0,03
Can 20	L4	A:3	32	Sensível	0,87	33	Sensível	0,03
Can 22	L5	A:3	34	Sensível	0,53	35	Sensível	0,02
Can 23	L6	A:3	31	Sensível	1,1	35	Sensível	0,02
Can 25	L7	A:2/3	32	Sensível	0,87	31	Sensível	0,05
Can 26	L8	B:2/3	27	Sensível	3	29	Sensível	0,08
Can 27	L9	A:3	35	Sensível	0,41	33	Sensível	0,03
Can 35	L10	C:2	35	Sensível	0,41	37	Sensível	<0,01
Can 39	L11	A:4	14	Resistente	78	20	Sensível	0,51
Can 40	L12	A:3	25	Sensível	5	28	Sensível	0,1
Can 41	L13	C:2/3	34	Sensível	0,53	36	Sensível	0,02
Can 45	L14	A:2	29	Sensível	1,8	41	Sensível	<0,01
Can 47	L15	A:2/3	31	Sensível	1,1	36	Sensível	0,02
Can 54	L16	A:3/4	37	Sensível	<0,25	37	Sensível	<0,01
Can 56	L17	A:3	31	Sensível	1,1	34	Sensível	0,03
Can 63	L18	B:3	36	Sensível	0,32	35	Sensível	0,32
Can 64	L19	A:3/4	34	Sensível	0,53	31	Sensível	0,05
Can 65	L20	C:3	29	Sensível	1,8	26	Sensível	0,15

Tabela 35. Resultados do estudo da sensibilidade aos antifúngicos Fluconazol e Voriconazol pelo método de difusão em disco das leveduras provenientes de Viseu.

Nº amostra	Nº de trabalho	Genótipo	Fluconazol			Voriconazol		
			Diâmetro do halo	S/R	MIC	Diâmetro do halo	S/R	MIC
Can 93	V1	A:3/4	32	Sensível	0,87	35	Sensível	0,02
Can 94	V2	A:3/4	36	Sensível	0,32	37	Sensível	<0,01
Can 95	V3	A:3/4	32	Sensível	0,87	37	Sensível	<0,01
Can 97	V4	A:3/4	35	Sensível	0,41	35	Sensível	0,02
Can 98	V5	A:2	33	Sensível	0,68	32	Sensível	0,04
Can 99	V6	A:3	31	Sensível	1,1	34	Sensível	0,03
Can 101	V7	A:2/3	34	Sensível	0,53	36	Sensível	0,02
Can 102	V8	A:2/3	34	Sensível	0,53	36	Sensível	0,02
Can 103	V9	A:3	32	Sensível	0,87	37	Sensível	<0,01
Can 105	V10	A:2/3	37	Sensível	<0,25	35	Sensível	0,02
Can 106	V11	A:2/3	36	Sensível	0,32	35	Sensível	0,02
Can 108	V12	A:3	28	Sensível	2,4	31	Sensível	0,05
Can 111	V13	A:3	35	Sensível	0,41	25	Sensível	0,18
Can 112	V14	A:2/3	36	Sensível	0,32	34	Sensível	0,03
Can 119	V15	A:3/4	31	Sensível	1,1	32	Sensível	0,04
Can 121	V16	A:3	29	Sensível	1,8	33	Sensível	0,03
Can 123	V17	A:3	31	Sensível	1,1	34	Sensível	0,03
Can 124	V18	A:3	30	Sensível	1,4	31	Sensível	0,05
Can 125	V19	A:3	31	Sensível	1,1	33	Sensível	0,03
Can 126	V20	A:3	31	Sensível	1,1	33	Sensível	0,03

ANEXO IV

Tabela 36. Resultados estatísticos do One-Way ANOVA, para determinação de diferenças na sensibilidade das estirpes mais comuns ao Fluconazol e Voriconazol.

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Fluconazole A:2/3	9	35,22	2,949	,983	32,96	37,49	31	41
A:3	21	32,71	3,810	,831	30,98	34,45	25	43
A:3/4	13	34,69	2,926	,812	32,92	36,46	29	39
Total	43	33,84	3,505	,534	32,76	34,92	25	43
Voriconazole A:2/3	9	35,44	2,351	,784	33,64	37,25	31	40
A:3	21	34,52	4,490	,980	32,48	36,57	25	45
A:3/4	13	34,77	5,644	1,565	31,36	38,18	21	45
Total	43	34,79	4,459	,680	33,42	36,16	21	45

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Fluconazole	Between Groups	53,250	2	26,625	2,302	,113
	Within Groups	462,611	40	11,565		
	Total	515,860	42			
Voriconazole	Between Groups	5,348	2	2,674	,129	,879
	Within Groups	829,768	40	20,744		
	Total	835,116	42			

