

# Suscetibilidade a antifúngicos e fatores de virulência de *Candida* spp. isoladas em Russas, Ceará

## Antifungal susceptibility and virulence factors of strains *Candida* spp. isolated in Russas, Ceará

Everardo Albuquerque Menezes<sup>1</sup>

Alana Cláudia Lima Barbosa<sup>2</sup>

Maria da Conceição dos Santos Oliveira Cunha<sup>1</sup>

Luana Guabiraba Mendes<sup>1</sup>

Francisco Afrânio Cunha<sup>1</sup>

### Resumo

O objetivo desse estudo foi avaliar a suscetibilidade e os fatores de virulência de cepas de *Candida* spp. isoladas de amostras de urina de pacientes em Russas, Ceará, Brasil. As cepas foram semeadas em agar batata dextrose e incubadas a 37°C por 24/48 horas. Após esse período, as cepas foram inoculadas em meio cromogênico e incubadas a 37°C por 24/48 horas. Doze cepas de leveduras foram identificadas (Oito *Candida albicans*, duas *Candida tropicalis*, uma *Candida glabrata*, uma *Candida parapsilosis*). A produção de slime e de exoenzimas (proteínase, coagulase e fosfolipase) foram determinadas. O perfil de sensibilidade foi realizado pelo método de disco difusão em meio Mueller-Hinton agar modificado. Os discos continham: fluconazol (25 µg), itraconazol (30 µg) e anfotericina B (100 µg). As placas foram lidas após 24 horas. As zonas de inibição foram mensuradas e a interpretação foi realizada como descrita no protocolo do CLSI M44-A. *C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 14053, *C. parapsilosis* ATCC 22019. foram incluídas no estudo. Foi observada uma elevada atividade de fosfolipase e coagulase, principalmente em cepas de *C. albicans*. Foi observada uma elevada proporção de cepas de *C. albicans* resistentes aos antifúngicos triazólicos. Todas as cepas foram sensíveis a anfotericina B. Candidúria era relativamente incomum e ignorada.

### Palavras-chave

Candidúria; Fatores de virulência; Antifúngicos

## INTRODUÇÃO

O termo candidúria, que não necessariamente envolve a presença de sinais e/ou sintomas de infecções urinárias, pode ser definido como o crescimento de *Candida* spp. em culturas de urina coletada por técnicas apropriadas. Trata-se de evento muito frequente entre pacientes expostos a fatores de riscos, sendo que até 20% de pacientes hospitalizados podem apresentar candidúria ao longo de sua internação, particularmente pacientes de unidade de terapia intensiva. Este achado laboratorial traz dilemas em relação à sua interpretação, visto que pode corresponder à simples contaminação da urina durante a coleta até candidúria assintomática, cistite ou pielonefrite, candidíase renal primária, bola fúngica ureteropélvica ou candidíase disseminada com manifestação renal.<sup>(1)</sup>

A incidência de fungos no trato urinário tem aumentado gradualmente e é um importante problema de saúde

pública. Cerca de 10% a 15% de infecções urinárias são devidas à *Candida* spp.<sup>(2,3)</sup>

A capacidade patogênica das *Candida* spp. está relacionada a uma combinação de fatores que contribuem para a sua virulência, destacando-se a produção de enzimas extracelulares. Diversas enzimas hidrolíticas, que auxiliam no processo de invasão tecidual, são produzidas por *Candida* spp. Dentre essas, as principais são proteínase, fosfolipase, hialuronidase, coagulase e condroitina sulfatase.<sup>(4-6)</sup>

Antifúngicos existem em número limitado e muitos atuam na síntese do ergosterol, o principal esteroide presente nas membranas fúngicas. Essas substâncias podem ainda agir em constituintes da parede celular de fungos. Agindo sobre a membrana celular, os derivados poliênicos se ligam ao ergosterol, provocando a formação de canais que ocasionam a morte da célula. Poliênicos têm sido empregados há mais de 50 anos, mas sua utilização é limitada devido à sua elevada toxicidade.<sup>(7)</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará DACT/FFOE/UFC – Fortaleza, CE, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório da Prefeitura Municipal de Russas, CE, Brasil.

Artigo recebido em 24/05/2011

Artigo aprovado em 19/02/2016

Os antifúngicos azólicos, que também atuam sobre o ergosterol da membrana celular, são os mais utilizados e foram desenvolvidos acerca de duas décadas. Estes são compostos heterocíclicos que inibem a enzima fúngica lanosterol 14 $\alpha$ -demetilase, que catalisa um passo tardio da síntese do ergosterol. Essa inibição depleta o conteúdo de ergosterol das membranas e resulta em acumulação de esteróis intermediários tóxicos que inibem o crescimento fúngico.<sup>(7-9)</sup>

O objetivo desse trabalho foi avaliar a sensibilidade de cepas de *Candida* spp. isoladas de urina de pacientes atendidos no Laboratório de Análises Clínicas da Prefeitura Municipal de Russas, município localizado no interior do estado do Ceará.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Origem das amostras

Foram incluídas no estudo 12 amostras de *Candida* spp. provenientes de pacientes com candidúria atendidos no Laboratório de Análises Clínicas no município de Russas, durante o período de janeiro de 2008 a dezembro de 2008. Os pacientes que apresentavam *Candida* spp. na urina, observadas na realização do sumário de urina, tinham a urina semeada em agar batata dextrose (ABD) com antibióticos e cicloheximida. As cepas foram incubadas a 35°C por 24/48 horas e, após o crescimento, foram guardadas na geladeira em temperatura de 2° a 8°C, até o momento do transporte para o Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Ceará, na cidade de Fortaleza.

### Identificação das amostras

As cepas foram semeadas em meio cromógeno agar Hicrome Candida® e incubadas a 35°C, por 24/48 horas. Esse meio cromógeno identifica as cepas de leveduras de acordo com a cor produzida, a saber, verde: *Candida albicans*; azul: *Candida tropicalis*; rosa: *Candida krusei*; violeta: *Candida glabrata*; branca a rósea: outras espécies, incluindo *Candida parapsilosis*. A confirmação das identificações das cepas foi realizada com o teste do microcultivo em agar arroz com tween 80.<sup>(10)</sup>

### Avaliação dos fatores de virulência

**Proteinase e fosfolipase:** A determinação da proteinase e fosfolipase foi realizada segundo a metodologia descrita por Price et al.<sup>(11)</sup> e Rùchel et al.,<sup>(12)</sup> e as leituras realizadas após cinco dias. A presença da atividade da proteinase foi verificada pela formação de um halo transparente e de fosfolipase pela formação de um halo opaco ao redor da colônia. A atividade enzimática de ambas as enzimas foi medida, e foi calculado o PZ (zona de precipitação). Quando o PZ=1,0 (não apresentava enzi-

mática), 0,63 <PZ<1,0 (atividade enzimática moderada) e PZ<0,63 (forte atividade enzimática).<sup>(11,12)</sup>

**Coagulase:** *Candida* spp. tem a habilidade de produzir coagulase e pode ser um importante fator de virulência. Em um tubo foram colocados 500  $\mu$ L de plasma humano e 100  $\mu$ L de uma suspensão de leveduras 0,5 na escala de MacFarland. As cepas foram incubadas a 35°C por quatro horas. Após esse período, a formação de coágulos foi avaliada. Se coágulos não eram observados, nova incubação era procedida, por até 24 horas.<sup>(13)</sup>

**Slime:** O slime é um polímero de carboidrato secretado por cepas de *Candida* spp. que ajuda a fixação em próteses e cateteres, semelhante a um biofilme. Cada cepa foi semeada em placa de agar infusão de cérebro-coração (BHIA) suplementado com 5% de glicose e vermelho do congo. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas e, após a incubação, as colônias positivas para produção de slime apresentaram coloração negro-brilhante.<sup>(14)</sup>

### Teste de sensibilidade a antifúngicos

A sensibilidade das cepas de *Candida* spp. isoladas de pacientes com candidúria foi avaliada pelo método de disco difusão em agar Mueller-Hinton suplementado com 2% glicose e 0,5  $\mu$ g/mL de azul de metileno (AMHGAM). Os discos de antifúngicos testados foram: anfotericina B (100  $\mu$ g), fluconazol (25  $\mu$ g) e itraconazol (30  $\mu$ g). As cepas foram inoculadas em meio AMHGAM e incubadas a 35°C, por 24 horas. Decorrido esse período, os halos foram medidos e as cepas foram classificadas de acordo com seu perfil de sensibilidade em sensível (S), sensível dose-dependente (SDD) e resistente (R), de acordo com o protocolo M44-A2 do CLSI.<sup>(15,16)</sup> Em todas as fases do experimento, foram utilizadas, como controle, as cepas *C. albicans* ATCC- 14053, *C. albicans* ATCC-10231 e *C. parapsilosis* ATCC 22019. Os testes foram realizados em triplicata.

## RESULTADOS

Cepas de *C. albicans* são as mais comumente isoladas de amostras de urina, no entanto, outras cepas de *Candida* spp. começam a ser isoladas desse sítio anatômico. No presente estudo, foram isoladas 12 cepas de *Candida* spp. A distribuição das cepas encontradas pode ser visualizada na Figura 1.

Nos últimos anos, diferentes meios cromógenos de cultura com capacidade de diferenciar *C. albicans* e outras leveduras de interesse clínico têm sido comercializados. Esses meios têm como fundamento a alteração na cor desenvolvida pelas colônias através de indicadores de pH e fermentação de compostos específicos ou substratos cromógenos.<sup>(17-19)</sup>

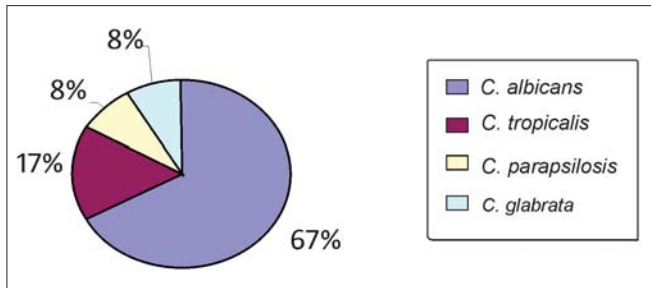


Figura 1. Identificação das cepas de *Candida* spp. isoladas de amostras de urina no município de Russas, Ceará.

Foram avaliados diversos fatores de virulência: proteínase, fosfolipase, coagulase e produção de slime.

Na Figura 2 são destacados os halos de precipitação em torno da colônia de *Candida* spp. Algumas espécies de *Candida* spp. não apresentam halo. A espécie de *C. parapsilosis* não produz fosfolipase. Das cepas de *C. albicans*, sete (87,5%) produziram fosfolipase com a atividade entre moderada e forte. O valor de PZ variou entre  $0,63 \leq PZ \leq 0,88$ . As cepas nas condições experimentais utilizadas não apresentaram atividade proteolítica.

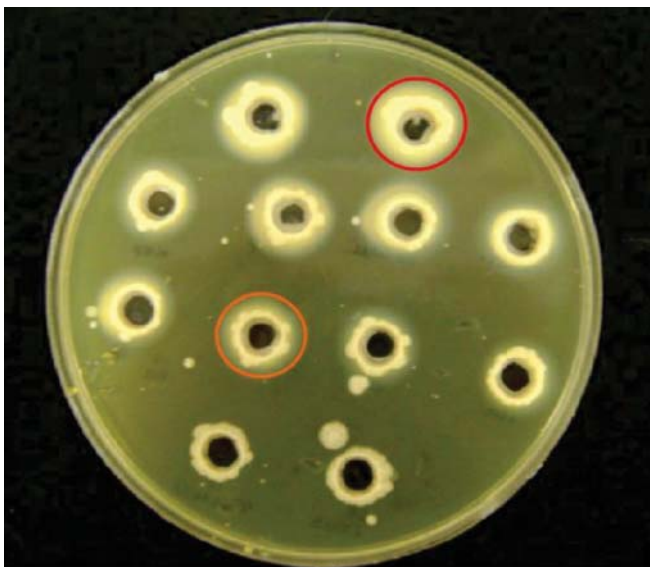


Figura 2. Teste de Fosfolipase de cepas *Candida* spp. isoladas de urina no município de Russas, Ceará.

Cepas de *Candida* spp. podem produzir coagulase responsável pela coagulação do plasma *in vitro* e *in vivo*. Setenta e cinco por cento das cepas produziram coagulase. Outro fator de virulência importante é o slime. Somente uma cepa de *C. albicans* produziu esse elemento.

A sensibilidade de cepas de *Candida* spp. é importante para o acompanhamento da resistência aos antifúngicos. O perfil de sensibilidade é mostrado na Tabela 1.

Em populações que não estão expostas a fatores de risco, em indivíduos saudáveis e assintomáticos, a candidúria é um achado raro, podendo ser uma simples contaminação da amostra. Alguns autores sugerem que existe maior relação entre candidúria e infecção urinária quando a contagem de colônias na urina atinge valores na ordem de 103 a 104 UFC/mL.<sup>(1)</sup>

Pfaller et al.<sup>(20)</sup> avaliaram 140.767 isolados clínicos de leveduras provenientes de 127 centros médicos distribuídos entre Ásia (23), América Latina (16), Europa (74), América do Norte (12) e Oriente Médio (2).

Esses isolados foram obtidos de diferentes materiais biológicos como sangue, trato genital, trato gastrointestinal e trato respiratório, no período de janeiro de 1997 a dezembro de 2003. Mais de 16 espécies diferentes de *Candida* foram isoladas, sendo que *C. albicans* foi a espécie mais frequente (66,2%). Uma diminuição no número de isolados de *C. albicans* foi observada no decorrer dos sete anos de estudo, variando de 10% a 11%. Em contraste, durante este mesmo período, observou-se um aumento no número de isolados de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* da ordem de 2,9% e 3,1%, respectivamente. No presente trabalho foram identificados 67% de cepas de *C. albicans*, sendo esta a espécie mais isolada (Figura 1).

Em um estudo com cem amostras de leveduras isoladas de urina, provenientes de Hospital Público Infantil de São Paulo Brasil, no período de 1999-2004, a espécie mais prevalente foi *C. albicans*, seguida de *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*.<sup>(21)</sup> A segunda levedura mais isolada neste estudo foi a *C. tropicalis* (Figura 1).

Nos EUA, em outro estudo com um total de 67 *Candida* spp. isoladas de urina, foi observada a seguinte

Tabela 1 - Perfil de sensibilidade das cepas de *Candida* spp. isoladas de candidúria

Cepa	Anfotericina B		Fluconazol			Itraconazol	
	S	R	S	SDD	R	S	R
<i>Candida albicans</i> (8)	8 (100%)	-	2 (25%)	3 (37,5%)	3 (37,5%)	4 (50%)	4 (50%)
<i>Candida tropicalis</i> (2)	2 (100%)	-	1 (50%)	1 (50%)	-	1 (50%)	1 (50%)
<i>Candida parapsilosis</i> (1)	1 (100%)	-	-	-	-	1(100%)	-
<i>Candida glabrata</i> (1)	1 (100%)	-	1 (100%)	-	-	1 (100%)	-

S - sensível; R - resistente; SDD - sensível dose dependente.

distribuição: *C. albicans* (54%), *C. glabrata* (36%) e *C. tropicalis* (10%).<sup>(22)</sup>

A identificação de leveduras é realizada pela utilização de meios que avaliam fermentação, assimilação de carboidratos. Esses testes são laboriosos, demandam tempo e podem apresentar resultados incertos. Os kits comerciais de identificação são caros e tornam-se de difícil aquisição para laboratórios de microbiologia de pequeno e médio porte no Brasil, ficando a identificação de leveduras das espécies a cargo de laboratórios de microbiologia de referência. Os laboratórios de microbiologia de pequeno porte realizam apenas o isolamento primário e a coloração de Gram, ou seja, técnicas que não permitem a identificação das espécies. Neste sentido, a utilização de meios seletivos e diferenciais para o isolamento de *Candida* spp. tem se tornado comum, nos últimos anos, em laboratórios menores. O CHROMagar *Candida* é um meio seletivo para o isolamento de leveduras que facilita a diferenciação e a identificação das principais espécies de *Candida*. As leveduras produzem enzimas que reagem com substratos cromógenos, produzindo colônias de diferentes cores. Essas enzimas são específicas e algumas leveduras podem ser identificadas em nível de espécie a partir da coloração que apresentam. Colônias de *C. albicans* e *C. dubliniensis* produzem colônias verde claro e verde escuro, respectivamente. As colônias de *C. tropicalis* aparecem azul metálico, colônias de *C. krusei* aparecem rosa claro. Outras leveduras aparecem creme ou desenvolvem um pigmento roxo.<sup>(23)</sup> Esses meios cromógenos têm demonstrado eficiência na identificação de cepas de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis* em vários estudos, sendo que a identificação da *C. glabrata* continua controversa.<sup>(24,25)</sup> No presente estudo foi possível a identificação, e a confirmação ocorreu com a micromorfologia.

Araújo et al.<sup>(26)</sup> observaram, em seu estudo, que o meio cromógeno se mostra útil na detecção de leveduras em material clínico que contenha cultura mista de *Candida*, cuja característica de crescimento em agar de Sabouraud dextrose não permite esta diferenciação. Os autores concluíram que a utilização desse meio contribui para um diagnóstico rápido das infecções causadas por leveduras do gênero *Candida*, favorecendo a aplicação de uma terapia antifúngica precoce e adequada.

Entre as enzimas mais importantes secretadas pela *C. albicans* tem-se a fosfolipase, que degrada fosfolípidios da membrana das células; a proteinase, que pode degradar anticorpos dentre outros substratos proteicos. Em relação à ação fosfolipásica, foi verificado, em estudo realizado por Menezes et al.,<sup>(5)</sup> com cepas de *C. albicans* isoladas de candidíase mamária, que 45,4% apresentaram atividade enzimática moderada (entre 0,64 e 0,99), e 54,6%, uma elevada atividade enzimática (PZ menor do

que 0,63). As amostras não apresentaram ação da enzima proteinase. No presente trabalho, as cepas apresentaram atividade fosfolipásica e não apresentaram atividade proteolítica. A atividade enzimática de *C. albicans* isoladas da mucosa bucal de crianças foi avaliado por Menezes et al.<sup>(6)</sup> Foram observadas que seis (20%) cepas apresentaram PZ positiva para proteinase e dez (33%) mostraram positividade para fosfolipase.<sup>(6)</sup>

A produção de slime e coagulase podem ser fatores de virulência importantes na determinação da patogenicidade de *Candida*. A produção de slime entre as cepas aqui estudadas foi muito pequena, apenas uma cepa foi slime-positivo. No entanto, 75% das cepas produziram coagulase.

O uso de discos de fluconazol é um método adequado para triagem e detecção de leveduras resistentes a esse antifúngico. O teste apresenta boa reprodutibilidade quando lido após 24 horas (95%).<sup>(27)</sup> Na presente análise, todos os halos foram medidos após 24 horas. O teste se mostrou de fácil execução e interpretação.

A partir dos estudos de Barry et al.,<sup>(28)</sup> foi demonstrado que o teste de disco difusão com discos de fluconazol pode ser maximizado pelo uso de agar Mueller-Hinton com glicose e azul de metileno com incubação restrita de 24 horas. De acordo com esses autores, somente 1% das cepas não cresceram adequadamente em 24 horas. Houve boa concordância entre o método de referência microdiluição em caldo e o teste de disco difusão.

Um total de 2.949 de *Candida* spp. foi testado pelo método de disco difusão e pelo método de referência microdiluição em caldo. Foram obtidos concordância de 92,8% entre os métodos. O teste de disco difusão foi adequado para detectar cepas de *Candida* spp. resistentes aos antifúngicos.<sup>(29)</sup> Na presente avaliação, os testes foram lidos com 24 horas e demonstraram ser reprodutíveis e de fácil execução.

Todas as cepas estudadas neste trabalho foram sensíveis à anfotericina B. Ocorreu uma elevada resistência ao fluconazol (37,5%) e ao itraconazol (50%) entre as cepas de *C. albicans* isoladas de amostras de urina. Foram encontradas 37,5% das cepas de *C. albicans* sensível dose dependente (SDD) – Tabela 1. A resistência aos antifúngicos azólicos foi mais elevada do que normalmente relatado na literatura.<sup>(1,30)</sup>

## CONCLUSÃO

A partir deste estudo, realizado na cidade de Russas, Ceará, é possível concluir que:

(1) Foram isoladas em Candidúria, em Russas, as seguintes leveduras: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*;

- (2) Foi observada uma elevada atividade de fosfolipase e coagulase, principalmente em cepas de *C. albicans*;
- (3) Foi observada uma elevada proporção de cepas de *C. albicans* resistentes aos antifúngicos triazólicos;
- (4) Todas as cepas foram sensíveis a anfotericina B.

### Agradecimentos

Ao CNPQ pelo financiamento do projeto.

### Abstract

The purpose of this study was to evaluate the susceptibility and virulence factors of strains *Candida* spp. isolated of urine in Russas, Ceará-Brazil. The strains were streaked onto Potato glucose agar plates at 37°C for 24/48 hours. After this period, the strains were streaked onto chromogenic media agar plates and incubated at 37°C for 24/48 hours. Twelve yeasts isolates have been evaluated (Eight *Candida albicans*, two *Candida tropicalis*, one *Candida glabrata*, one *Candida parapsilosis*). Slime and exoenzymes (proteinase, coagulase, and phospholipase) production tests and determination of their levels were performed. Susceptibility testing was evaluated in medium Mueller-Hinton agar modified was used disk diffusion testing. Paper disks containing: fluconazole (25 µg), itraconazole (30 µg) and amphotericin B (100 µg) were used. Plates were read after 24 hours. Zones of inhibition were read and interpretation of zone diameters was as described in CLSI M44-A. The following reference strains were also included in the studies: *C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 14053, *C. parapsilosis* ATCC 22019. A higher phospholipase and coagulase activity was also observed for *C. albicans*. A relatively higher proportion of triazole-resistant isolates was obtained from *Candida* spp. isolated of urine in Russas. All strains were susceptible to amphotericin B. Candiduria was previously uncommon and largely ignored.

### Keywords

Candiduria; Virulence factors; Antifungal agents

### REFERÊNCIAS

- Colombo AL, Guimaraes T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36(5):599-607.
- Alvarez-Lerma F, Nolla-Salas J, León C, Palomar M, Jordá R, Carrasco N, Bobillo F; EPCAN Study Group. Candiduria in critically ill patients admitted to intensive care medical units. *Intensive Care Med*. 2003 Jul;29(7):1069-76.
- Weinberger M, Sweet S, Leibovici L, Pitlik SD, Samra Z. Correlation between candiduria and departmental antibiotic use. *J Hosp Infect*. 2003 Mar;53(3):183-6.
- Ashman RB, Papadimitriou JM Production and function of cytokines in natural and acquired immunity to *Candida albicans* infection. *Microbiol Rev*. 1995 Dec;59(4):646-72.
- Menezes EA, et al. *Candida* ssp. isolation in the breast feeding mothers' nipples from the human milk bank at the Universidade Federal do Ceará and susceptibilities to the antifungal agents tests. *J Bras Patol Med Lab*. 2004;40(5):299-305.
- Menezes EA, et al. Frequência e atividade enzimática de *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de crianças de uma creche da prefeitura de Fortaleza. *J Bras Patol Med Lab*. 2005;41(1):9-13.
- Cowen LE, Steinbach WJ. Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. *Eukaryot Cell*. 2008 May;7(5):747-64.
- Atkins RA. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol*. 2005 Jun;43(4):285-318.
- Canon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Tanabe K, Niimi M, Monk BC. *Candida albicans* drug resistance another way to cope with stress. *Microbiology*. 2007 Oct;153(Pt 10):3211-7.
- Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heinz-Vaccari EM, Melo NT. Tratado de Micologia Médica. Lacaz. 9a edição, São Paulo, SP: Sarvier. 2002.
- Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*. 1982 Mar;20(1):7-14.
- Rüchel R, Tegeler R, Trost M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia*. 1982 Sep;20(3):233-44.
- Rodrigues, AG, Pina-Vaz, C, Costa-De-Oliveira S, Tavares C. Expression of plasma coagulase among pathogenic *Candida* species. *J Clin Microbiol*. 2003 Dec;41(12):5792-3.
- Gündogan N, Citak S, Turan E. Slime production, DNase activity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk, pasteurized milk and ice cream samples. *Food Control*. 2006;17:389-92.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved standard M44-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2009.
- Espinel-Ingroff A, et al. Standardized disk diffusion method for yeasts. *Clin Microbiol. Newsletter*. 2007;29: 97-100.
- Carrillo-Muñoz AJ, Quindós G, Cárdenes CD, Alonso-Vargas R, Arévalo P, Brió S, Madariaga L. Evaluation of Chromalbicans Agar for presumptive identification of *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol*. 2001 Sep;18(3):105-8. [Article in Spanish].
- Foongladda S, Haouharn P, Sakulmaiwatana P, Chairprasert A. Comparative evaluation of Candi Select test and conventional methods for identification of *Candida albicans* in routine clinical isolates. *Mycoses*. 2002 Apr;45(3-4):75-8.
- Fotadar R, al-Hedaithy SS. Identification of chlamydospore-negative *Candida albicans* using CHROMagar *Candida* medium. *Mycoses*. 2003 Apr;46(3-4):96-103.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Rinaldi MG, Barnes R, Hu B, Veselov AV, et al. Results from the Artemis Disk Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(12): 5848-59.
- Silva V, Diaz MC, Febré N; Chilean Invasive Fungal Infections Group. Invasive fungal infections in Chile: a multicenter study of fungal prevalence and susceptibility during a 1-year period. *Med Mycol*. 2004 Aug;42(4):333-9.
- Jain N, Kohli R, Cook E, Gialanella P, Changt, Fries BC. Biofilm formation by and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from urine. *Appl Environ Microbiol*. 2007 Mar;73(6):1697-703.
- Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol*. 1994 Aug;32 (8): 1923-9.
- Hospenthal DR, Murray CK, Beckius ML, Green JA, Dooley DP. Persistence of pigment production by yeast isolates grown on CHROMagar *Candida* medium. *J Clin Microbiol*. 2002 Dec;40(12): 4768-70.
- Huang LU, Chen CH, Chou CF, Lu JJ, Chi WM, Lee WH. A comparison of methods for yeast identification including CHROMagar *Candida*, Vitek system YBC and a traditional biochemical method. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)*. 2001 Oct;64(10):568-74.
- Araújo CR, Miranda KC, Passos XS, Souza LKH, Lemos JA, Khrais Cha, et al. Identificação das leveduras do gênero *Candida* por métodos manuais convencionais e pelo método cromogênico chromagar *Candida*. *Rev Patol Trop*. 2005; 34:37-42.

27. Kirkpatrick WR, Turner TM, Fothergill AW, McCarthy DI, Redding SW, Rinaldi MG, Patterson TF. Fluconazole disk diffusion susceptibility testing of *Candida* species. *J J Clin Microbiol.* 1998 Nov;36(11):3429-32.
28. Barry AL, Pfaller MA, Rennie RP, Fuchs PC, Brown SD. Precision and accuracy of fluconazole susceptibility testing by broth microdilution, Etest, and disk diffusion methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Jun;46(6):1781-4.
29. Pfaller MA, Hazen KC, Messer SA, Boyken L, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ. Comparison of results of fluconazole disk diffusion testing for *Candida* species with results from a central reference laboratory in the ARTEMIS global antifungal surveillance program. *J Clin Microbiol.* 2004 Aug;42(8):3607-12.
30. Girmenia C, Tuccinardi C, Santilli S, Mondello F, Monaco M, Cassone A, Martino P. In vitro activity of fluconazole and voriconazole against isolates of *Candida albicans* from patients with haematological malignancies. *J Antimicrob Chemother.* 2000 Sep; 46(3):479-83.

---

Correspondência

**Everardo Albuquerque Menezes**

*Rua Capitão Francisco Pedro 1210 – Rodolfo Teófilo  
60430-370 – Fortaleza, CE, Brasil  
menezes@ufc.br*