

SÔNIA UEDA PURISCO

Prevalência e sensibilidade a antifúngicos de espécies de *Candida* pouco freqüentes como agentes de candidemia.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção de Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração:

Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador:

Profa. Dra. Márcia de Souza Carvalho Melhem

São Paulo

2010

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Élio e Yassuko pelo amor, apoio e força na concretização de um sonho. A minha irmã Emília pela amizade e suas palavras de carinho. E a todos os amigos do Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz – São Paulo.

AGRADECIMENTOS

À Dra Márcia de Souza Carvalho Melhem pela orientação, disponibilidade, confiança, carinho e amizade. A sua experiência me fez crescer e me interessar cada dia mais pela pesquisa. Meu sincero agradecimento e minha eterna admiração.

À Dra Maria Walderez Szeszs pela co-orientação, sugestões, atenção e principalmente pela sua amizade. O meu amor na realização dos testes de sensibilidade é fruto do tempo que passamos juntas.

À Marilena dos Anjos Martins que aprendi a admirar com a convivência. Obrigada por sua atenção e suas palavras de carinho.

À Dulcilena de Matos obrigada por tudo. Durante esses anos que passamos juntas aprendi muito com você. Essa caminhada não foi fácil, mas você sempre me fez enxergar a realidade e me deu forças para lutar. Foi difícil, mas posso dizer que consegui. Meu carinho por você é imenso. Obrigada!

À Sandra R. B. S. Pukinskas, minha primeira chefe. Você sempre será lembrada. Obrigada pela amizade, preocupação e por sempre querer saber um pouquinho do que estava acontecendo em minha vida.

Ao Andres Avelino Baez meu querido amigo. O que seria da Seção sem a sua presença? Nada! Você é amigo, companheiro e sempre está disposto a ajudar. Agradeço de coração tudo o que fez por mim durante esse tempo. Quero que você saiba que sempre poderá contar comigo.

À Leonor B. Fernandez por dividir comigo o espaço para a realização dos testes e por proporcionar condições para o desenvolvimento deste estudo.

Ao Fabio Antonio Colombo por sua amizade e por sua imensa colaboração na concretização desse trabalho.

Ao Lucas X. Bonfietti por me ajudar sempre quando precisei e principalmente na pesquisa de artigos científicos relacionados a meu tema.

A todos os funcionários do Serviço de Parasitologia que de uma forma direta ou indireta auxiliaram na concretização desse projeto.

A minhas amigas que moram em outro país, cidades e aquelas de maior convivência O apoio de vocês sempre foi fundamental e de imensa importância nessa longa jornada. Minha eterna gratidão.

A minha querida auxiliar Alexandra por sua paciência, compreensão, apoio, palavras de carinho, enfim por todo seu amor. Você sempre será muito especial em minha vida.

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo contribuir para o conhecimento dos agentes de candidemia menos freqüentes, i.e. não-*Candida albicans* e não-*Candida tropicalis*, em hospitais do Estado de São Paulo. Cento e sessenta e seis isolados, obtidos entre 2005 a 2008 de onze unidades hospitalares, foram avaliados quanto à freqüência de espécies e fenótipos de resistência (CLSI e AFST-EUCAST). A distribuição observada para as espécies foi: *Candida parapsilosis* (70%), *C. glabrata* (23%), *C. krusei* (4%), *Pichia anomala* (*Candida pelliculosa*), *C. famata*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii* (0,6% cada). Fluconazol (FCZ), itraconazol (ITZ), voriconazol (VCZ) e anfotericina B (AMB) mostraram alta eficácia frente todos os agentes de candidemia avaliados, com exceção de *C. krusei*, espécie comprovadamente resistente ao FCZ. AMB foi a droga mais ativa, não sendo encontrado nenhum fenótipo de resistência à droga, seguida de FCZ e VCZ; a droga menos eficaz foi ITZ. O único isolado de *P. anomala* (*C. pelliculosa*) apresentou menor sensibilidade a FCZ e ITZ na metodologia EUCAST. *Candida krusei*, com comprovada resistência intrínseca ao fluconazol, foi S-DD a ITZ (EUCAST) na maioria dos isolados, mas sensível ao VCZ e à AMB. Resistência a VCZ foi observada com maior freqüência no método EUCAST do que no CLSI, devido aos distintos *breakpoints*. Resistência cruzada entre azóis foi encontrada neste estudo em cepas de *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. Estes dados contribuem para a consolidação de banco de dados sobre as espécies causadoras de candidemia e para delineamento e monitoramento do perfil de resistência aos antifúngicos de uso corrente em hospitais brasileiros.

ABSTRACT

This paper aims to contribute to the knowledge of less frequent candidemia agents, ex. non-*Candida albicans* and non-*Candida tropicalis*, in hospitals in the State of São Paulo. One hundred and sixty-six isolates obtained between 2005 to 2008 from eleven hospital units, were evaluated for the frequency of species and resistance phenotypes (CLSI and AFST-EUCAST). The distribution observed for the species were: *Candida parapsilosis* (70%), *C. glabrata* (23%), *C. krusei* (4%), *Pichia anomala* (*Candida pelliculosa*), *C. famata*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii* (0.6% each). Fluconazole (FCZ) itraconazole (ITZ), voriconazole (VCZ) and amphotericin B (AMB) showed high efficacy against all agents of candidemia evaluated, with the exception of *C. krusei*, species with proved resistant to FCZ. AMB drug was more active, not being found any phenotype drug resistance, followed by FCZ and VCZ; the less effective drug was ITZ. The only strain of *P. anomala* (*C. pelliculosa*) showed lower sensitivity to FCZ and ITZ for AFST-EUCAST methodology. *Candida krusei*, with demonstrated intrinsic resistance to FCZ, was S-DD to ITZ (EUCAST) for most isolates, but sensitive to VCZ and AMB. Resistance to VCZ was observed more frequently in the EUCAST method than in the CLSI, due to different breakpoints. Cross-resistance between azoles was found in this study on strains of *C. glabrata* and *C. parapsilosis*. These data contribute to the consolidated database on the species that causes candidemia and for delineation and monitoring of resistance profile to antifungal drugs in current use in Brazilian hospitals.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – Graus centígrados

AFST - EUCAST – Antifungal Susceptibility Testing - European
Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

AmarCand - *Analyse Du Management en Anesthésie et Réanimation
dês Candidoses Invasives*

AMB – Anfotericina B

ATCC – American Type Culture Collection

C. albicans – *Candida albicans*

CDC – Centers for Disease Control and Prevention

C. famata – *Candida famata*

C. glabrata – *Candida glabrata*

C. guilliermondii – *Candida guilliermondii*

CIM – concentração inibitória mínima

C. kefyr – *Candida kefyr*

C. krusei – *Candida krusei*

C. lusitaniae – *Candida lusitaniae*

CLSI – Clinical Laboratory Standards Institute

C. parapsilosis – *Candida parapsilosis*

C. pelliculosa – *Candida pelliculosa*

C. tropicalis – *Candida tropicalis*

CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxiribonucleico

D.O. - Densidade ótica

et al. - e outros

FCZ – Fluconazol

FDA – Food and Drug Administration

ICS – Infecção de corrente sanguínea

IAL – Instituto Adolfo Lutz

ITZ – Itraconazol

LCR – líquido cefalorraquidiano

MS – Mato Grosso do Sul

P. anomala – *Pichia anomala*

pH – potencial hidrogênico

RNA – ácido ribonucleico

rRNA – ácido ribonucléico ribossômico

SENTRY – Programa Internacional de Vigilância Antimicrobiana

VCZ – Voriconazol

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

LISTA DE TABELAS E QUADRO

Página

Tabela 1- Valores de <i>breakpoints</i>	36
Tabela 2- Distribuição dos valores de CIM de quatro drogas antifúngicas frente a 166 agentes de candidemia.....	43
Tabela 3- Sensibilidade de 166 amostras de agentes de candidemia em onze hospitais do Estado de São Paulo, a quatro antifúngicos, segundo método utilizados.....	47
Tabela 4- Distribuição dos valores de CIM de quatro drogas antifúngicas frente a 116 amostras de <i>C. parapsilosis</i> como agente de candidemia.....	49
Tabela 5- Distribuição dos valores de CIM de quatro drogas antifúngicas frente a 38 amostras de <i>C. glabrata</i> como agente de candidemia.....	54
Quadro 1 – Distribuição das espécies de leveduras agentes de candidemia em 166 amostras de hemoculturas, período de 2005 a 2008, obtidas em onze hospitais de São Paulo.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figuras 1a. leveduras; 1b. fungos filamentosos.....	13
Figura 2- Estrutura química da molécula de fluconazol.....	25
Figura 3 - Estrutura química da molécula de itraconazol.....	26
Figura 4- Estrutura química da molécula de voriconazol.....	26
Figura 5- Estrutura química da molécula de anfotericina B.....	28
Figura 6– Amostras de <i>Candida</i> spp. em Ágar ChomAgar Candida.....	37
Figura 7– Procedimento de inoculação das placas no método de microdiluição em caldo (AFST-EUCAST ou CLSI).....	37
Figura 8. Espectrofotômetro utilizado na leitura dos resultados da metodologia AFST-EUCAST.....	38
Figura 9. Correlação entre as metodologias,AFST-EUCAST e CLSI, frente ao fluconazol, para os 166 isolados de hemocultura.....	44
Figura 10. Correlação entre as metodologias,AFST-EUCAST e CLSI, frente ao itraconazol, para os 166 isolados de hemocultura.....	44
Figura 11. Correlação entre as metodologias,AFST-EUCAST e CLSI, frente ao voriconazol, para os 166 isolados de hemocultura.....	45
Figura 12. Correlação entre as metodologias,AFST-EUCAST e CLSI, frente a anfotericina B, para os 166 isolados de hemocultura.....	45
Figura 13. Correlação entre as metodologias,AFST-EUCAST e CLSI, frente ao fluconazol, para os 116 isolados de <i>C. parapsilosis</i>	50

Figura 14. Correlação entre as metodologias,AFST-EUCAST e CLSI, frente ao itraconazol, para os 116 isolados de <i>C. parapsilosis</i>	50
Figura 15. Correlação entre as metodologias,AFST-EUCAST e CLSI, frente ao voriconazol, para os 116 isolados de <i>C. parapsilosis</i>	51
Figura 16. Correlação entre as metodologias,AFST-EUCAST e CLSI, frente ao anfotericina B, para os 116 isolados de <i>C. parapsilosis</i>	51
Figura 17. Correlação entre as metodologias,AFST-EUCAST e CLSI, frente ao fluconazol, para os 38 isolados de <i>C. glabrata</i>	55
Figura 18. Correlação entre as metodologias, AFST-EUCAST e CLSI, frente ao itraconazol, para os 38 isolados de <i>C. glabrata</i>	55
Figura 19. Correlação entre as metodologias,AFST-EUCAST e CLSI, frente ao voriconazol, para os 38 isolados de <i>C. glabrata</i>	56
Figura 20. Correlação entre as metodologias,AFST-EUCAST e CLSI, frente ao anfotericina B, para os 38 isolados de <i>C. glabrata</i>	56
Figura 21. Correlação entre os fármacos fluconazol e voriconazol pela metodologia AFST-EUCAST, para os 38 isolados de <i>C. glabrata</i>	57
Figura 22. Correlação entre os fármacos fluconazol e voriconazol pela metodologia CLSI, para os 38 isolados de <i>C. glabrata</i>	57

Índice

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Candidemia	16
1.2 Agentes de Candidemia.....	18
1.3 Drogas antifúngicas.....	23
1.3.1 Derivados azólicos	24
1.3.2 Anfotericina B.....	27
1.4 Resistência dos agentes de candidemia a antifúngicos e métodos para determinação	28
2. OBJETIVOS	32
2.1 Geral.....	32
2.2 Específicos.....	32
3. MATERIAIS e MÉTODOS	33
3.1 Origem das amostras.....	33
3.2 Processamento e identificação dos isolados.....	33
3.3 Testes de Sensibilidade a Antifúngicos.....	34
4. FORMA DE ANÁLISE DE RESULTADOS	39
5. RESULTADOS	40
6. DISCUSSÃO	59
7. CONCLUSÕES	76
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
APÊNDICE 1	

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Purisco, Sônia Ueda

Prevalência e sensibilidade a antifúngicos de espécies de *Candida* puco frequentes como agentes de candidemia / Sônia Ueda Purisco - São Paulo, 2010.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública
Orientadora: Márcia Carvalho de Souza Melhem

1. *Candida* 2. Sangue 3. Fungos/efeitos de drogas 4. Testes de sensibilidade microbiana

SES/CCD/CD-231/10

1 INTRODUÇÃO

Os fungos constituem um grupo de organismos eucariotos, sem mobilidade própria, heterotróficos, aeróbios e com limitada capacidade anaeróbica que podem sintetizar lisina pela via biossintética do ácido L-alfa-aminoadípico. Esses microrganismos acumulam glicogênio como material de reserva, são desprovidos de clorofila e possuem núcleo rodeado por membrana nuclear. Fungos reproduzem-se por meio de esporos, apresentam parede celular rígida e quitinosa, têm retículo endoplasmático, mitocôndrias semelhantes às de células vegetais e animais, além de vacúolos, microtúbulos e ribossomos. A membrana plasmática contém ergosterol, rRNA 80s e microtúbulos compostos de tubulina; o aparelho de Golgi nem sempre está presente. Fungos podem ser unicelulares, ou multicelulares, e podem ser divididos em dois grandes grupos: filamentosos (bolores ou mofos) e leveduras, conforme sua morfologia (Ferreira *et al.*, 2002) (Figuras 1a e 1b).



Figuras 1a. leveduras; **1b.** fungos filamentosos (cedidas gentilmente por Dulcilena de Matos, Núcleo de Micologia IAL – SP).

As leveduras são fungos que não apresentam grande variação na estrutura micromorfológica e, por isso, sua identificação em gênero e espécie, tem como base provas fisiológicas e bioquímicas e, algumas vezes, análise molecular. A estrutura básica das leveduras é unicelular e esse grupo de fungos se reproduz por gemulação, ou brotamento, de células denominadas blastoconídios. Alguns gêneros, como *Candida* spp. têm a capacidade de produção de hifa, seja a partir dos blastoconídios, no caso de hifa verdadeira, seja pela junção de vários brotos que se mantêm ligados, no caso de pseudo-hifa. Alguns gêneros, em especial, um de grande interesse em micologia médica – *Cryptococcus* spp. -, apresentam como característica principal, cápsula de natureza mucopolissacarídica (Ferreira *et al.*, 2002).

Leveduras, assim como fungos filamentosos, são seres ubiqüitários e importantes na decomposição de material orgânico e são encontrados em inúmeros nichos na natureza. O papel patogênico de leveduras há muito foi demonstrado por Langenbeck (1839) que, pela primeira vez, observou a mais importante levedura patogênica ao homem, hoje conhecida como *Candida albicans*, em aftas bucais de paciente com tifo, tendo considerado, erroneamente, esse microrganismo como agente etiológico da doença. Mais tarde, em 1842, David Gruby definiu a candidíase oral e classificou esse microrganismo no gênero *Sporotrichum*. Em 1846, Berg estudou detalhadamente o microrganismo, estabelecendo definitivamente a sua relação com candidíase oral. Alguns anos mais tarde, em 1853, Charles Robin denominaram esse microrganismo de *Oidium albicans*, renomeado por Zopf, em 1890, de *Monilia albicans*. Somente em 1923, Berkhout transferiu essa espécie para o gênero *Candida* e criou a espécie *Candida albicans* (Sidrim *et al.*, 1999). Essa levedura foi descrita, no decorrer da história, sob distintas denominações, em número superior a 111, as quais se encontram descritas no livro *The Yeasts* (Kreger van Rij, 1984). Até 1963 eram conhecidas apenas cinco espécies de *Candida* como causadoras de doenças em humanos, incluindo *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea* (*C. albicans* var. *stellatoidea*) e *C. guilliermondii*.

Atualmente, são conhecidas cerca de dezessete espécies de *Candida* causadoras de micoses superficiais ou invasivas em seres humanos (Pfaller *et al.*, 2007a).

As principais espécies de interesse clínico são: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii* e *Candida lusitaniae*. Entretanto, número progressivo de casos de doenças superficiais e invasivas relacionadas e espécies emergentes de *Candida* é descrito, como: *Candida dubliniensis*, *Candida kefyr*, *Candida rugosa*, *Candida famata*, *Candida utilis*, *Candida lipolytica*, *Candida norvegensis*, *C. zeylanoides* e *Candida inconspícua*, justificando sua acurada identificação (Pfaller *et al.*, 2007a; Jung *et al.*, 2010).

1. 1 Candidemia

Dentre as infecções causadas por espécies de *Candida*, as de corrente sanguínea, ou candidemias, têm grande significado dado sua alta mortalidade (40 a 50%) e aumento de custo hospitalar para seu controle, ainda que, um recente estudo norte-americano tenha mostrado que a taxa de mortalidade diminuiu ligeiramente ao longo do período de 1991 a 2003 (Patel *et al.*, 2005; Pfaller & Diekema, 2007b). Vale ressaltar que delinear a gravidade dessas infecções é tarefa árdua, desde que a maioria dos casos de candidemia apresenta uma ou mais doenças co-existentes que determinam o desfecho clínico, sendo por isso difícil isolar a variável mais significativa para a má evolução dos casos (Pfaller & Diekema, 2007b).

O aumento progressivo na frequência de ICS (infecção de corrente sanguínea) por leveduras do gênero *Candida* foi observado em muitos países que monitoram esse evento. O fato ocorre, particularmente, entre pacientes que estão recebendo antibióticos, terapia imunossupressiva, nutrição parenteral, bem como, aqueles expostos a procedimentos médicos invasivos (da Matta *et al.*, 2007). Dados do Sistema Nacional de Controle de Infecções Nosocomiais do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dos Estados Unidos mostraram que, durante a década de 90, os fungos foram agentes de 7,9% do total de infecções nosocomiais, em hospitais de grande e pequeno porte, e a incidência desses quadros aumentou para 9% de 1990 a 1996, emergindo como o quinto patógeno nosocomial. Entre os microrganismos que causam ICS, os fungos ocuparam o quarto lugar, à frente de outros microorganismos tão comuns como *Escherichia coli*. As espécies do gênero *Candida* causaram 78% das infecções fúngicas em pacientes imunocomprometidos, ou gravemente enfermos, com taxa de mortalidade superior a 55%; a incidência de candidemia aumentou aproximadamente em 500% em hospitais de alta complexidade (Abid-Said *et al.*, 1997; Diekema *et al.*, 2002b; Pfaller & Diekema, 2002; Pfaller *et al.*, 2000).

Estudos mais recentes têm estimado que 6-11% de todas as infecções invasivas nosocomiais podem ser atribuídas a *Candida* spp. (Wisplinghoff *et al.*, 2004; Pfaller *et al.*, 2007). Estudo realizado na Itália, para descrever a epidemiologia de infecções de corrente sanguínea (ICS) por *Candida* spp., avaliou 9558 hemoculturas obtidas de 4390 pacientes, de 1998 a 2004. Destas, 538 (13%) foram de casos de sepse, sendo 168 (13%) atribuídos a fungos, dentre os quais 155 por *Candida* e os demais 13 pacientes apresentaram por outras espécies de fungos (Caggiano *et al.*, 2007).

As taxas de incidência são variadas na população hospitalizada, com valores médios de 43 casos por 100.000 admissões de pacientes pediátricos e de 30 casos por 100.000 admissões de adultos em hospitais dos Estados Unidos (Zaotis *et al.*, 2005). Wisplinghoff *et al.* (2004) em amplo estudo de vigilância norte-americano mostrou que, por mais de sete anos, a presença de *Candida* spp. foi relatada na mesma incidência (4,6 casos por 10.000 admissões). Deve-se ressaltar que a incidência varia, de modo considerável, nas diversas regiões do globo e segundo o tipo de hospital e população atendida, como pode ser apreciado em estudos europeus. A Dinamarca, por exemplo, demonstrou ter a maior incidência (11,0 casos/100.000 admissões/ano) quando comparada à Finlândia (1,9 casos/100.000 admissões/ano) (Arendrup *et al.* 2005; Poikonen *et al.*, 2003).

Para países desenvolvidos existem vários dados publicados confirmando a magnitude do problema de espécies de *Candida* como agente de ICS. Além de maior quantidade de informação sobre ocorrência de candidemia, os dados desses países trazem detalhes sobre a distribuição de espécies e suscetibilidade a antifúngicos, porém, esse não é o caso ainda, da América Latina, na qual os estudos são bons, mas insuficientes para descrever a epidemiologia dessa grave infecção nessa região (Gonzalez *et al.*, 2008; Colombo *et al.*, 2006; Bruder-Nascimento *et al.*, 2010).

No Brasil, os dados de incidência da candidemia ainda são escassos e inconsistentes, havendo poucos estudos de tendências. A importância da candidemia como problema de Saúde Pública no Brasil é,

ainda, difícil de ser avaliada, já que, muitas unidades hospitalares não notificam oficialmente sua ocorrência. O estado de São Paulo é um dos poucos que possui um sistema organizado de notificações com, aproximadamente, 600 hospitais informando ao sistema público de vigilância a ocorrência de infecções hospitalares (Centro de Vigilância Epidemiológica, 2010). De acordo com os últimos informes do Sistema de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo, sobre os microrganismos isolados em hemoculturas em Unidades de Terapia Intensiva, *Candida* spp. foi de terceiro a quinto agente isolado, com frequência próxima de 5%, no período de 2004 a 2008 (Centro de Vigilância Epidemiológica, 2010).

Ainda que raros, os estudos nacionais contribuem, de modo significativo, para o conhecimento da frequência de candidemias. Colombo *et al.* (2006) relataram, no período de março de 2003 a dezembro de 2004, os casos de candidemia ocorridos em 11 hospitais terciários, situados em 9 cidades brasileiras, com incidência de 2,49 casos por 1,000 admissões e 0,37 casos por 1,000 pacientes-dia. Em recente estudo de Pereira *et al.* (2010) foi observado incidência semelhante (2,4/1000 admissões) em um hospital público terciário no estado de São Paulo. Outros estudos, realizados entre maio de 2002 e fevereiro de 2003, relataram 7.038 episódios de candidemia em quatro hospitais da cidade de São Paulo, com taxa um pouco mais baixa (1,66 episódios/1000 admissões) (Colombo *et al.*, 2003; Brito *et al.*, 2006). Um dos poucos estudos realizados na região nordeste foi publicado por Hinrichsen *et al.* (2008) e indicou maior taxa de incidência (3,9 episódios/1000 admissões) em hospital terciário de Recife (PE).

1. 2 Agentes de candidemia

Candida albicans permanece como a espécie mais comumente isolada de ICS, mas alguns estudos mostraram alteração na distribuição das espécies, com aumento de leveduras diferentes de *Candida albicans* (Pfaller, 1996; Abid-Said *et al.*, 1997; Sandven *et al.* 2000; Pfaller *et al.* 2001;

Diekema *et al.*, 2002a; Pfaller *et al.*, 2000; Pfaller *et al.*, 2002; Patel *et al.*, 2005; Donelli, 2006; Sobel, 2006).

Entre os agentes não-*C. albicans* de candidemia, os mais comuns são: *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida* spp. (Nakamura & Takahashi, 2006; Pfaller *et al.*, 2004). O conjunto dessas espécies e de *Candida albicans* são responsáveis por cerca de 95% de casos de candidíase invasiva em países da Europa, Estados Unidos e Ásia (Nakamura *et al.*, 2006; Ruan *et al.*, 2008). Outras espécies são responsáveis por taxas de 1% a 5%, incluindo: *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. rugosa*, *C. lusitaniae*, *C. lipolytica*, *C. intermedia*, *C. famata* e *C. dubliniensis* (Pfaller *et al.*, 2001).

Em recente estudo multicêntrico na França, denominado AmarCand (*Analyse Du Management en Anesthésie et Réanimation des Candidoses Invasives*), do qual participaram 101 unidades de cuidado intensivo (outubro/2005 a maio/2006), foram avaliados episódios de candidemia ocorridos em 271 pacientes. Desse grupo, 305 amostras foram identificadas, resultando em 57% de *C. albicans*, 16,7% de *C. glabrata*, 7,5% de *C. parapsilosis*, 5,2% de *C. krusei*, 4,9% de *C. tropicalis* e 3,6% *C. kefyr*. Um aspecto diferente nesse estudo, em relação a outros semelhantes, está na incidência de *C. tropicalis* que, em regra, é maior com taxas em torno de 10% (Leroy *et al.*, 2009).

Horn *et al.* (2009) estudaram população de 2019 pacientes com infecção invasiva, pediátricos e adultos (2004-2008) internados em 23 centros norte-americanos. A proporção de *C. albicans* foi de 45,6%, porém predominando espécies não-*C. albicans* (54,4%), sendo: *C. glabrata* (26%), *C. parapsilosis* (15,7%), *C. tropicalis* (8,1%) e *C. krusei* (2,5%).

No Programa Internacional de Vigilância Antimicrobiana (SENTRY) para as Américas, o relato do período entre 1997 e 1999, das espécies causadoras de ICS, ressaltou a maior proporção de *C. tropicalis* em países da América Latina do que em países do hemisfério norte (Pfaller *et al.*, 2001). A última publicação do Programa SENTRY informou mudança na distribuição relativa das espécies na América Latina, sendo que a ordem,

em 2006 e 2007, era: *C. albicans* > *C. tropicalis* > *C. parapsilosis* > *C. glabrata*, mas recentemente, *C. parapsilosis* está ocupando o segundo lugar (Messer *et al.*, 2009).

Um estudo realizado no México englobou 398 isolados de *Candida* obtidos em cinco hospitais universitários terciários na cidade de Monterrey (México) de 2004 a 2007 (Gonzalez *et al.*, 2008). Nesse estudo a frequência de episódios referentes a espécies não-*C. albicans* representou 68% do total. As espécies encontradas foram: *C. parapsilosis* (37,9%), *C. albicans* (31,9%), *C. tropicalis* (14,8%), *C. glabrata* (8%) e outras (7,4%).

No período de 1999 a 2000, foi conduzido um estudo em cidades da América Latina com cinco hospitais terciários, de onde foram isoladas 103 amostras de *Candida* spp. A espécie mais freqüente isolada foi *C. albicans*, seguida de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* (Godoy *et al.*, 2003). Silva *et al* (2004 a, b), observaram *C. tropicalis* em terceiro lugar em frequência no Chile e Argentina.

A maioria das pesquisas realizadas no Brasil e em outros países da América do Sul (Godoy *et al.*, 2003; Silva *et al*, 2004a; Silva *et al* 2004b; Ruiz *et al.*, 2005; Regonasci, 2006; Medrano *et al.*, 2006) confirmam que *C. albicans* supera o conjunto de outras espécies, ainda que em taxas distintas. Em trabalho de revisão, Melhem (2004) ressaltou que as taxas nacionais de prevalência de *C. albicans* são muito variadas, desde 13% a 60%, e isso pode ser atribuído a diversos fatores, entre eles, metodologias de isolamento e identificação, tipo de hospital, população atendida, faixa etária e unidade hospitalar.

Em estudos realizados em hospitais terciários brasileiros, incluindo o de Chang *et al* (2008) em Campo Grande (MS), abrangendo 96 casos, e o de da Matta *et al.* (2007) em São Paulo, com 1000 amostras de isolados de ICS, *C. albicans* foi agente, respectivamente de 45,8% e 40% dos casos. Também em São Paulo, Colombo *et al.* (2006) publicaram trabalho com 712 isolados de *Candida*, sendo 40,9% amostras de *C. albicans*. Na cidade de Botucatu, estado de São Paulo, Ruiz *et al.* (2005) em 75 amostras de leveduras causadoras de ICS confirmaram *Candida*

albicans (38,7%) como espécie prevalente. Do mesmo modo, Goldani & Mário (2003) em Porto Alegre, observaram em 101 casos de candidemia, *C. albicans* em 33%. Em estudo de 200 casos de candidemia realizado no Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo, foi observado freqüência de 49% de *C. albicans* (Colombo *et al* 2003). Taxa semelhante foi observada em 4 hospitais terciários da cidade de São Paulo, nos quais *C.albicans* foi agente de 38% de 282 casos de candidemia, estudados por Brito *et al.* (2006). Pasqualoto *et al.* (2005) no Rio Grande do Sul, descreveram a menor taxa de *C. albicans*, 22% em 79 casos de candidemia, em relação a outras espécies.

Nos trabalhos brasileiros com maior número de amostras, pode-se verificar que *C. tropicalis* é o segundo agente etiológico de ICS. Em onze hospitais terciários do Brasil (Colombo *et al.*, 2006) descreveram *C. albicans* como responsável por 40,9% dos casos seguida de *C. tropicalis* (20,9%). No estudo de da Matta *et al.* (2007) *C. tropicalis* situou-se também em segundo lugar, com freqüência de 24,3%.

A importância do conhecimento da prevalência relativa das distintas espécies de *Candida* e ocorrência de outros gêneros de leveduras, além de *Candida* spp., está nos diferentes perfis de sensibilidade a antifúngicos e nas características epidemiológicas das infecções causadas pelos distintos agentes (Cawley *et al.*, 2000; Falk *et al.*, 2003; Perniola *et al.*, 2006; Lunardi *et al.*, 2006).

Apesar de ser parte da microbiota de humanos, o gênero está relacionado a infecções humanas. *Candida tropicalis*, por exemplo, está relacionada a infecções endógenas pós-cirúrgicas pois habita o trato intestinal. *Candida parapsilosis*, sendo comensal da pele humana e menos de superfícies mucosas, está associada à ICS por manipulação do paciente, sendo bem conhecida por causar infecções em crianças e neonatos (Pfaller *et al.*, 2007a). Está, quase sempre relacionada à presença de cateteres e sua grande habilidade em formar biofilmes favorece a patogênese. *Candida parapsilosis* considerada espécie única é, desde os anos 90, considerada um complexo englobando três espécies: *C. parapsilosis (strictu sensu)*, *C.*

metapsilosis e *C. orthopsilosis* (Tavanti *et al.*, 2005). *Candida glabrata*, por sua vez, também está hoje muito relacionada a outras duas espécies (*C. bracarensis* e *C. nivariensis*), separadas, apenas, por análise molecular do DNA e assimilação de trealose. A ocorrência de *C. glabrata* é associada ao uso prévio de fluconazol e sua freqüência é maior em população acima de 60 anos (Diekema *et al.*, 2002a; Bishop *et al.*, 2008; Guery *et al.*, 2009). *Candida guilliermondii* faz parte da microbiota normal da pele e superfícies mucosas humanas, sendo recuperada mais freqüentemente de pacientes imunocomprometidos. É uma espécie com potencial de causa de infecção de corrente sangüínea, particularmente, em pacientes com neoplasias hematológicas e internados em unidades de terapia intensiva (Wingard *et al.*, 1995; Mardani *et al.*, 2000). Estas infecções são, clinicamente, similares às causadas por *C. parapsilosis*, desde que, invasão sangüínea pelas suas espécies está intimamente relacionada à presença de cateter.

A importância na tipagem molecular destas novas espécies permite melhor definição da prevalência, distribuição e susceptibilidade antifúngica dos agentes de infecções invasivas. Outras espécies como *C. kefyr* e *Pichia anomala* são descritas em taxas variáveis conforme a região (Cuenca-Estrella *et al.*, 2006).

A causa possível para alteração da proporção entre as espécies poderia estar associada ao uso amplo de fluconazol, profilático ou empírico. Esta hipótese é plausível para países do hemisfério norte, mas não é factível com a realidade de países em desenvolvimento como o Brasil, que também parece apresentar essa alteração, mas nos quais a profilaxia e terapia empírica ainda são práticas onerosas (Girmentia *et al.* 1996; Magill *et al.*, 2006). No entanto, esse argumento para explicar o aumento considerável de infecções por espécies antes menos freqüentes, não é compartilhado por todos os especialistas, os quais consideram que a utilização ampla de fluconazol não foi proporcional ao aumento pequeno de espécies resistentes à droga (Marr *et al.*, 2000; Kaufman *et al.* 2001). Para estes e outros estudiosos, o aumento de espécies não-*C. albicans* é resultante do uso crescente de procedimentos invasivos hospitalares com artefatos que, a

partir de fontes abióticas ou mãos de profissionais, veiculam esses agentes para a corrente sanguínea de pacientes internados (Gudlaugsson *et al.*, 2003). De fato, desde muito tempo o uso de cateteres é considerado um fator de risco para infecção de corrente sanguínea por leveduras do gênero *Candida* (Girmenia *et al.*, 1996).

1.3 Drogas antifúngicas

Com o advento da quimioterapia sulfamídica, por Domagk em 1935, e após a descoberta da penicilina por Fleming (1929), ambos Prêmio Nobel de Medicina, começaram a surgir, por síntese orgânica ou biossíntese, numerosas drogas ou fármacos com atividade antifúngica, atuando por via tópica ou sistêmica em diversas micoses, superficiais ou profundas (Lacaz *et al.*, 2002).

As drogas antifúngicas, para tratamento de micoses cutâneas e profundas, podem ser divididas em: 1-aquelas que alteram a membrana celular, 2-as que atuam intracelularmente interrompendo processos celulares vitais, como síntese de RNA, DNA ou proteínas e, 3- aquelas que agem na parede celular. As mais utilizadas são os derivados poliênicos, imidazólicos, pirimidínicos, sulfamídicos, benzofurênicos e outros compostos como iodetos, tiosulfatos, sulfetos e tolnaftatos, com grau variável de sucesso.

Para o tratamento de infecções fúngicas invasivas existem quatro principais classes de antifúngicos: os polienos (por ex. anfotericina B), os azóis (fluconazol, voriconazol, itraconazol, posaconazol), as pirimidinas (5-fluorocitosina) e as equinocandinas (caspofungina, anidulafungina, micafungina) (Pappas *et al.*, 2003; Pappas *et al.*, 2009).

1.3.1 Derivados azólicos

Fluconazol, itraconazol e voriconazol são derivados azólicos, especificamente, triazólicos e, como tais, inibem a enzima esterol 14- α -demetilase de um sistema de enzimas microssômicas dependentes do citocromo P450 (Figuras 2, 3 e 4). O citocromo P-450, alvo de todos os azóis, possui papel vital na síntese e no metabolismo dos ácidos graxos, esteróides, glicosteróides, etc (Lacaz *et al.*, 2002). Por conseguinte, a inibição da enzima esterol 14- α -demetilase, impede a biossíntese do ergosterol, lipídeo que dá rigidez à membrana citoplasmática dos fungos e leva ao acúmulo de 14- α -metilesteróis. Esses metilesteróis podem desagregar o arranjo compacto das cadeias acíclicas dos fosfolipídios, comprometendo as funções de determinados sistemas enzimáticos ligados à membrana, como a ATPase e enzimas do sistema de transporte de elétrons, inibindo, assim, o crescimento do fungo (Goodman & Gilman, 2003).

Fluconazol tem sido utilizado, amplamente, no tratamento de infecções por *Candida* spp., sendo efetivo em infecções causadas por *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. A droga não é efetiva no tratamento de *C. krusei*, por ser naturalmente resistente. A resposta a essa droga, em infecções causadas por *C. glabrata* é variável (Rodriguez-Tudella *et al.*, 2008).

Entre os azóis, o fluconazol tem maior penetração no líquido (LCR) e corpo vítreo, alcançando concentrações de ao menos 50% da concentração no soro. Na urina alcança concentrações de 10 a 20 vezes mais do que no soro. O itraconazol é utilizado, principalmente, em pacientes com candidíase em mucosa, em geral aqueles que não responderam ao tratamento com fluconazol (Pappas *et al.*, 2009).

O voriconazol é um novo triazol com atividade de amplo espectro, sendo utilizado contra *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* spp. e outros fungos oportunistas. O FDA (U.S. Food and Drug Administration) aprovou o uso de voriconazol para o tratamento de candidíase invasiva, incluindo candidemia, em pacientes não-neutropênicos,

e também para o tratamento de candidíase esofágica, aspergilose invasiva, infecções sérias causadas por *Fusarium* spp. e *Scedosporium apiospermum* em pacientes intolerantes ou com infecção refratária a outros antifúngicos. Indicações similares para o uso de voriconazol foram aprovadas na Europa, incluindo o uso no tratamento de casos com resistência ao fluconazol. Seu uso clínico tem sido, principalmente, em terapias orais para pacientes com infecção para isolados de *C. krusei* e *C. glabrata* resistentes a fluconazol e sensíveis a voriconazol. A biodisponibilidade oral do voriconazol é superior a 90%, não sendo afetada pelo pH gástrico, mas diminuindo quando o fármaco é administrado com alimentos (Pappas *et al.*, 2009).

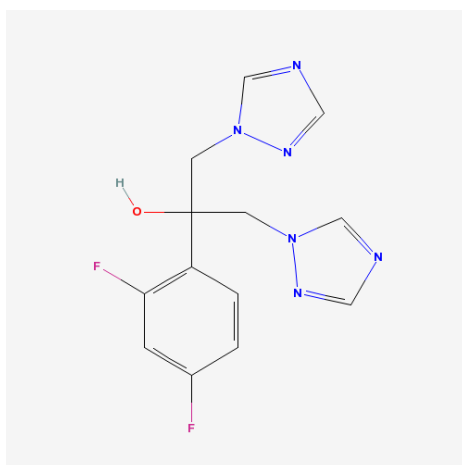


Figura 2. Estrutura química da molécula de fluconazol

Fonte: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=3365>

1.3.2 Anfotericina B

Anfotericina B é um derivado poliênico que foi isolado pela primeira vez, em 1956, de *Streptomyces nodosus*. É uma droga que se liga à membrana citoplasmática dos fungos celular de forma irreversível; porém é tóxica, pois da mesma forma, interage com a célula humana. Formulações coloidais e lipossomais de anfotericina B foram desenvolvidas na década de 90, como encapsulamento com base lipossômica, formas lipídicas e coloidais resultaram na diminuição da toxicidade (Fillipin *et al.*, 2006).

Os poliênicos combinam-se com esteróides da membrana, ergosterol na célula fúngica e colesterol na humana. Essa ligação resulta no rompimento da membrana o que a torna incapaz de efetuar suas funções normais. Seguem-se alterações na permeabilidade celular e perda de constituintes essenciais das células como potássio, açúcares, proteínas, fosfatos inorgânicos, ácidos carboxílicos e ésteres de fosfatos. A sensibilidade de um organismo aos derivados poliênicos está estreitamente relacionada com a presença de esteróis na sua membrana e, portanto, quanto menor o conteúdo de esterol, maior será a sua resistência a estes compostos (Trabulsi, 2005).

Apesar de sua alta potência, a forma tradicional de desoxicolato da anfotericina B tem a nefrotoxicidade como o maior efeito adverso, que resulta em insuficiência renal aguda em até 50% dos pacientes. Isso torna restrito o uso dessa formulação, para a qual existe uma nova, lipídica, menos tóxica (Pappas *et al.*, 2009).

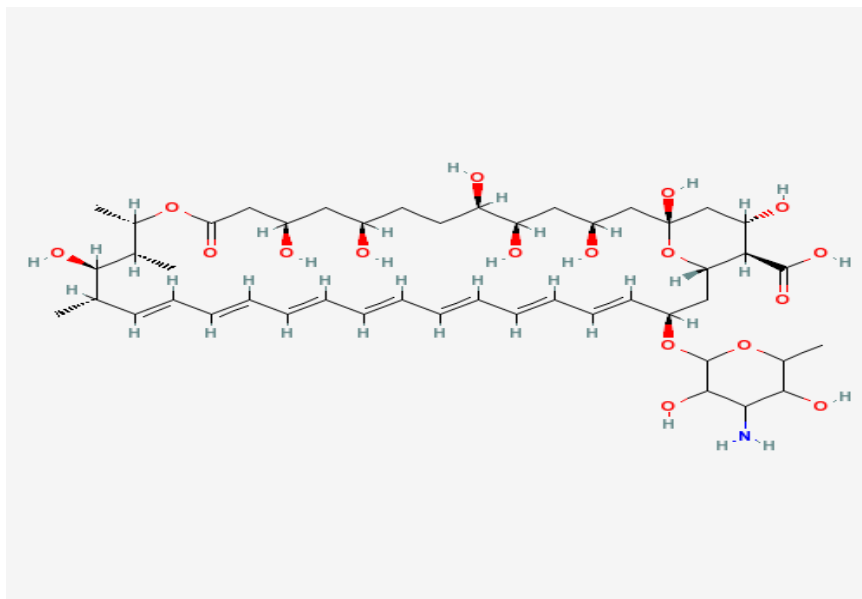


Figura 5. Estrutura química da molécula de anfotericina B

[http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5231054
&loc=ec_rcs](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5231054&loc=ec_rcs)

1.4 Resistência de agentes de candidemia a antifúngicos e métodos para sua determinação

A preocupação do risco associado ao controle de candidemias, desde que, as condições subjacentes contribuem para a gravidade do quadro é grande. Soma-se a isso, os relatos, desde a década de 90, da ocorrência de cepas de leveduras resistentes aos antifúngicos tradicionais e novos .

A resistência aos antifúngicos pode ser classificada em resistência microbiológica e resistência clínica. A resistência clínica é definida, classicamente, como persistência ou progressão de uma infecção, mesmo com a administração do tratamento antifúngico adequado. Resistência microbiológica, por sua vez, é um fenômeno verificado *in vitro*, no qual o agente etiológico consegue se desenvolver na presença de concentrações terapêuticas da referida droga (Perea & Patterson, 2002).

A resistência microbiológica subdivide-se em três tipos: intrínseca ou inata, primária e secundária ou adquirida. A intrínseca é dita quando

nenhum membro de uma espécie é sensível ao antifúngico. Resistência primária é quando dentro de uma espécie normalmente sensível a determinado antifúngico, encontra-se uma cepa com resistência natural contra o mesmo, sem necessidade de haver estado em contato com a droga. Denomina-se resistência secundária, ou adquirida, quando uma cepa, previamente sensível desenvolve resistência à droga após a exposição a ela que pode ser devido a alterações fenotípicas, ou genotípicas, que se manifestam de forma estável ou transitória (Mellado *et al.*, 2002; Melhem, 2004).

A determinação de resistência em laboratório é feita por testes de sensibilidade a antifúngicos que visam à correlação entre atividade *in vitro* e evolução clínica do caso tratado com a droga. Além disso, os testes visam à comparação da eficácia relativa de duas ou mais drogas e, ainda, dar parâmetros para monitorar o aparecimento de cepas resistentes (Melhem, 2004).

Para determinação da sensibilidade o parâmetro mais utilizado é a concentração inibitória mínima (CIM). O CIM é definido como a menor concentração de um agente antifúngico que inibe o crescimento do fungo (E Def 7.1, 2008). Diversos grupos dedicaram-se ao tema, em especial, o subcomitê para testes de sensibilidade a antifúngicos do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, até 2005 denominado *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, NCCLS). Este instituto publicou uma série de documentos para testes com leveduras (M27) e fungos filamentosos (M38). O mais recente deles (M27-A3, com suplemento M27-S3) traz o protocolo de referência para análise de leveduras do gênero *Candida* e *Cryptococcus* frente a diversas drogas. A interpretação de resultados, ou seja a definição de *breakpoints* não existe para *Cryptococcus*, mas somente para *Candida*, sendo: sensível, sensibilidade dependente da dose (azóis)/intermediária (5-fluorocitosina), resistente ou não-sensível (caspofungina).

O subcomitê europeu (AFST-EUCAST) publicou, por sua vez, a partir de 2002, notas técnicas sobre antifúngicos e métodos de determinação de resistência. O mais recente documento E. Def. 7.1 (2008) descreve

método de microdiluição para leveduras fermentadoras de glicose, como é o caso de espécies de *Candida*. Esta metodologia apresenta algumas alterações em relação ao método de referência do CLSI e é, atualmente, também considerado referência, sendo usado em vários países europeus (Cuenca-Estrella *et al.*, 2002a). As modificações propostas no documento europeu, são: maior concentração de células para inóculo da levedura, meio de cultura com 2% de glicose, uso de placas de microtitulação de fundo plano e leitura em espectrofotômetro, que permite maior objetividade na leitura dos resultados e menor tempo de incubação da reação (AFST-EUCAST E Def 7.1, 2008, disponível em www.eucast.org, acessado em 2/2/2010). *Breakpoints* para os isolados analisados por este método estão propostos, por enquanto, apenas para fluconazol e voriconazol. Além disso, somente três espécies podem ser classificadas: *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*.

A despeito das metodologias, norte-americana e européia, serem consideradas de referência para leveduras, os resultados dos testes com anfotericina B não têm interpretação precisa, não havendo *breakpoints* para esta droga e a correlação com a clínica ainda está por ser definida.

Estudos realizados com metodologia de referência e publicados em todo o mundo demonstram que *C. albicans* tem alta sensibilidade não somente a fluconazol, mas também a outras drogas azólicas (Hajjej *et al.*, 2004). Os raros casos de resistência estão associados ao uso prévio de fluconazol em pacientes com doenças hematológicas (Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2003). Resistência a fluconazol em isolados de *Candida* spp. é encontrada, quase que exclusivamente em espécies de *Candida* não-*albicans* (Pfaller *et al.*, 2004). De modo particular, *Candida krusei* possui resistência intrínseca ao fluconazol. Alta sensibilidade ao fluconazol de isolados de *C. tropicalis* provenientes de hemoculturas é descrita em distintos estudos, sendo as taxas de resistência, muito baixas e inferiores a 12% (Diekema *et al.*, 2002a; Hajjej *et al.*, 2004; Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2003). *C. parapsilosis* é, em regra, sensível a todas as drogas azólicas e à anfotericina B (Pfaller *et al.*, 2004; Magill *et al.*, 2006). A rapidez com que *C.*

glabrata desenvolve resistência *in vivo* desperta a atenção e preocupação de especialistas em todo o mundo e, este fenômeno foi demonstrado por ensaios *in vitro*. Dados mundiais apontam *C. guilliermondii* como um agente com prevalência estável, porém, com tendência ao aumento de taxas de resistência a fluconazol (Pfaller *et al.*, 2006; Pfaller *et al.*, 2007a). *Candida lusitanae* é, também, agente incomum de fungemia que, no entanto, ganha destaque pelo seu potencial em desenvolver resistência à anfotericina B (Pfaller *et al.*, 1994; Pfaller & Diekema, 2002).

Diferenças acentuadas na distribuição de espécies e susceptibilidade às drogas antifúngicas entre isolados de diferentes países, ressaltam a necessidade de vigilância contínua em cada país para acompanhar as tendências da distribuição de patógenos e suscetibilidade de drogas (Zepelin *et al.* 2007). O monitoramento temporal em cada região do globo é de igual importância pelo alerta de emergência de cepas resistentes a antifúngicos (Jones *et al.*, 2001; Pfaller & Diekema, 2007b)

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Contribuir para o conhecimento dos agentes menos freqüentes de candidemia, não-*C. albicans* e não-*C. tropicalis*, em hospitais do estado de São Paulo, no período de 2005 a 2008.

2.2 Específicos

2.2.1 Determinar as espécies causadoras de infecção de corrente sangüínea, excluindo-se *Candida albicans* e *Candida tropicalis*;

2.2.2 Avaliar resistência frente ao fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B;

2.2.3 Investigar ocorrência de resistência cruzada dos isolados a mais de um fármaco da classe dos azóis;

2.2.4 Comparar as taxas de resistência obtidas segundo as duas metodologias de referência: norte-americana CLSI e européia AFST-EUCAST .

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Origem das amostras

As amostras de espécies não-*Candida albicans* e não-*Candida tropicalis* foram obtidas da Micoteca da Seção de Micologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São Paulo. As amostras estavam armazenadas em freezer, à temperatura de -20°C, contidas em flaconetes com miçangas plásticas imersas em meio semi-sólido contendo infusão cérebro-coração (BHI), adicionado de glicerol a 30%. Os isolados de hemocultura foram provenientes de pacientes internados, entre janeiro de 2005 a dezembro de 2008, em hospitais da Rede Nacional para Monitoramento de Resistência Microbiana no país, área do estado de São Paulo e outros hospitais que têm no IAL sua referência para exames de micologia, perfazendo total de onze unidades de atendimento.

3.2 Processamento e identificação das amostras

As amostras foram retiradas do freezer e duas a três miçangas foram semeadas em ágar ChromAgar *Candida* (Difco) distribuídos em placa de Petri para confirmação de sua pureza (Figura 6), a partir do aspecto e cor indicativas de espécie. As colônias que apresentaram contaminação foram purificadas por repiques sucessivos em outras placas de Petri contendo o mesmo ágar e analisadas por microscopia após coloração de Gram e/ou adição de corante azul de lactofenol (Mendes-Giannini & Melhem, 2001).

As colônias puras foram transferidas para ágar Sabouraud, contendo cloranfenicol, distribuídas em tubos de ensaio e re-identificadas, em gênero e espécie, por características macromorfológicas e micromorfológicas. Realizada a identificação, foi feito um repique em ágar

Sabouraud sem cloranfenicol para a realização dos testes de sensibilidade a antifúngicos.

3.3 Testes de Sensibilidade a Antifúngicos

A sensibilidade das leveduras foi determinada *in vitro*, pelo método de microdiluição em caldo (Figura 7), segundo procedimentos do documento M27-A3 (CLSI, 2008) e, também, pelo método descrito no documento E. Def. 7.1 (EUCAST, 2008).

O método de microdiluição avaliou a sensibilidade do isolado frente a distintas concentrações, preparadas em série, de um determinado agente antifúngico. O inóculo do isolado conteve número padrão de células e foi incubado por um período prescrito junto com o antifúngico. O objetivo deste método foi a determinação da CIM.

Foram utilizados os antifúngicos anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol sob forma de pó p.a. A solução-mãe de fluconazol (FCZ), com concentração de 5120 µg/mL, foi preparada em água destilada estéril e as soluções-mãe de voriconazol (VCZ), itraconazol (ITZ) e anfotericina B (AMB), com concentração de 1600 µg/mL, foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO). As soluções foram mantidas em freezer a -70° C e aliqüotadas em flaconetes contendo 2mL por períodos de até 6 meses.

Os antifúngicos foram diluídos em 10 concentrações diferentes, conforme documentos M-27 A3 (CLSI, 2008) e E. Def 7.1 (EUCAST, 2008) e distribuídos em placas de microtitulação contendo 96 orifícios. As placas contendo os antifúngicos diluídos foram embaladas, identificadas e congeladas à -70°C. Na hora do teste, as placas foram descongeladas e adicionadas dos inóculos de leveduras.

Três controles de qualidade foram realizados em cada teste: 1- controle positivo ou de crescimento, preparado somente com inóculo em meio de cultura, sem adição de antifúngico; 2- Controle-negativo ou de esterilidade, realizado com meio de cultura, servindo também como branco do espectrofotômetro; 3- controle interno de qualidade para verificar a

atividade de cada antifúngico, sendo utilizadas duas cepas-padrão de referência: *Candida krusei* (ATCC 6258), resistente a fluconazol e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), sensível a fluconazol, cujos valores de CIM para diversos antifúngicos são conhecidos e estão publicados nos documentos de referência.

Adicionados os inóculos e preparados os controles de qualidade, foi iniciada a reação de inibição que teve tempo de incubação de 48h para o método do CLSI e de 24h para o método de AFST-EUCAST. Para ambos os métodos a temperatura foi de 35°C. A sensibilidade aos azóis foi baseada na análise da CIM dos antifúngicos sobre o crescimento das leveduras. Para CLSI os resultados foram analisados a olho-nú, segundo graus de inibição definidos em cruces, variando de zero a 4 cruces. Os resultados foram expressos em densidade ótica (d.o.) e registrados em fita impressa, diretamente do espectrofotômetro, para método AFST-EUCAST (figura 8). Em testes com azóis a CIM foi considerada aquela capaz de inibir o crescimento do inóculo em padrão denominado 2 cruces (CLSI) ou 50% (IC₅₀) ou mais (AFST-EUCAST) em relação ao controle-positivo. Para AMB foi considerada a CIM aquela que inibir grau zero equivalente a 100% (IC₁₀₀) (CLSI) de inibição e 90% (IC₉₀) (AFST-EUCAST), ou mais, do crescimento.

A partir do valor de CIM, o isolado é classificado segundo *breakpoints* estabelecidos pelos comitês internacionais. Os *breakpoints* são valores específicos de CIM que permitem a caracterização do fungo em categorias clínicas, i.e. Sensível, intermediário, sensibilidade dependente da dose e resistente (Cuenca-Estrella *et al.*, 2002b; Rodriguez-Tudela *et al.*, 2007; CLSI, 2008; Cuesta *et al.*, 2009).

A tabela 1 mostra os valores de *breakpoints* adotados neste estudo. Para itraconazol, não existe breakpoint no AFST-EUCAST e, portanto, foi adotado critério interpretativo do CLSI, considerado: sensível CIM $\leq 0,125\mu\text{g/mL}$, S-DD CIM de 0,25-0,5 $\mu\text{g/mL}$ e R CIM $\geq 1\mu\text{g/mL}$.

Para anfotericina B, não existe proposta de *breakpoint* nos métodos de referência, sendo considerados valores elevados de CIM >

2µg/mL. Este breakpoint foi considerado neste estudo para classificar amostras resistentes (Nolte *et al.*, 1997; Pfaller *et al.*, 1994).

Para fluconazol e voriconazol os valores de *breakpoints* foram adotados conforme o método empregado (CLSI ou AFST-EUCAST).

Tabela 1. Valores de *breakpoints* para quatro antifúngicos segundo duas metodologias de referência

Antifúngico	Fonte	Sensível	S-DD/Intermediário	Resistente
		(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)
Fluconazol	AFST-EUCAST*	≤ 2	4	> 4
	CLSI**	≤ 8	16-32	≥ 64
Itraconazol	CLSI	≤ 0,125	0,25-0,5	≥ 1
Voriconazol	AFST-EUCAST*	≤ 0,125	-	> 0,125
	CLSI	≤ 1	2	≥ 4
Anfotericina B	Nolte <i>et al.</i> , 1997 Pfaller <i>et al.</i> , 1994	-	-	≥ 2

AFST-EUCAST, *European Committee for Antifungal Susceptibility Testing*;
CLSI, *Clinical Laboratory Standard Institute*; S-DD, sensibilidade dependente da dose

(*) *breakpoints* aplicáveis apenas para *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*; (**) *breakpoint* não aplicável para *C. krusei*

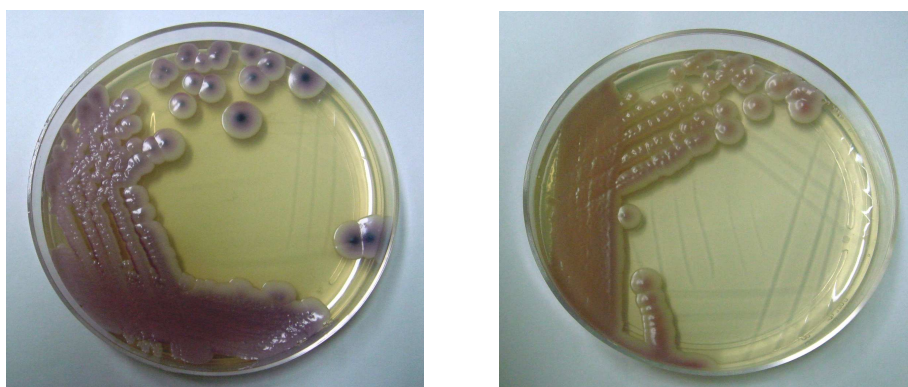


Figura 6. Amostras de *Candida* spp. em ágar ChromAgar *Candida*®.

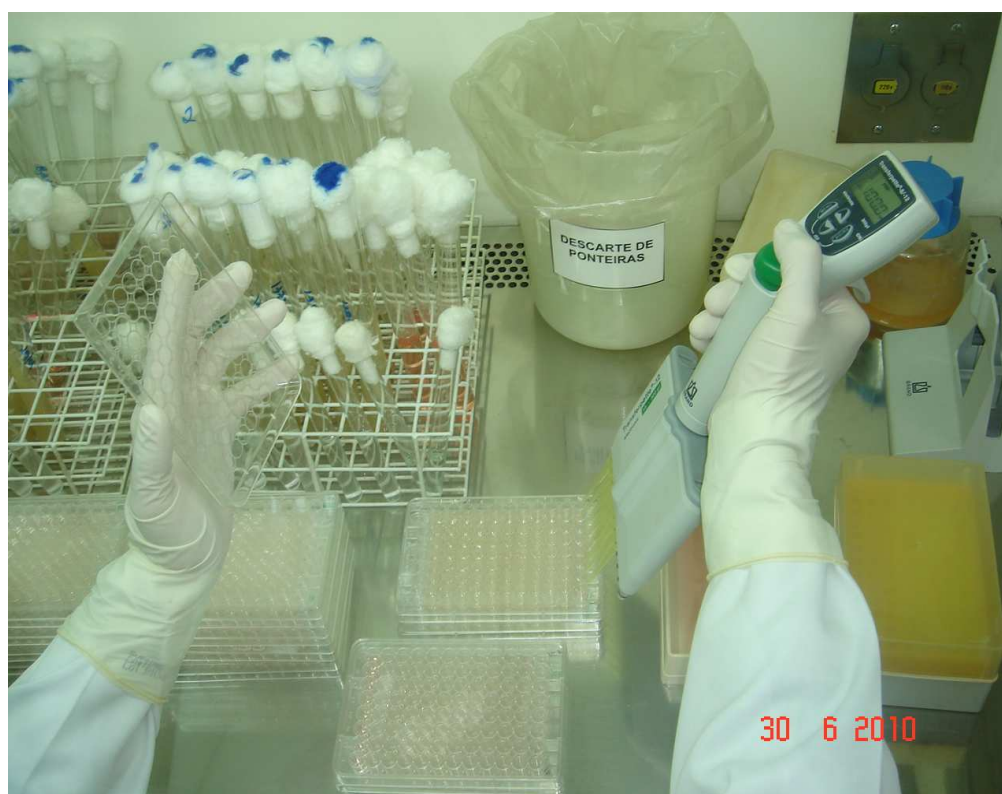


Figura 7. Procedimento de inoculação das placas no método de microdiluição em caldo (AFST-EUCAST ou CLSI).

4. FORMA DE ANÁLISE DE RESULTADOS

Os resultados foram analisados segundo freqüência das espécies e valores de CIM para cada antifúngico, além das categorias segundo metodologia. Os resultados de CIM em termos de valores brutos e categorias de sensibilidade (sensível, sensibilidade dependente da dose/intermediária e resistente). Foi avaliada a resistência a mais de um fármaco, em um único isolado, a saber: 1) resistente a todos os azóis e sensível à anfotericina B; 2) resistente a apenas um ou dois azóis e sensível à anfotericina B; 3) resistente a um ou mais azóis e resistente à anfotericina B. Os parâmetros de valor médio, valor modal, CIM₅₀ e CIM₉₀, definidos, respectivamente, como a concentração do fármaco necessária para inibir 50% e 90% das amostras analisadas também foram calculados. Foi calculada correlação (r^2 , Pearson) por programa Prisma versão 5 (GraphPad) e concordância (%) entre os resultados obtidos pelos métodos CLSI e AFST-EUCAST. O nível de significância foi $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

Cento sessenta e seis isolados de ICS de espécies outras que *C. albicans* e *C. tropicalis* foram analisadas neste estudo. De acordo com a pesquisa no banco de dados da Micoteca, as hemoculturas foram provenientes de hospitais do Estado de São Paulo, sendo sete na cidade de São Paulo, três situados na Grande São Paulo e um na cidade de Campinas.

Os hospitais, segundo o tipo de instituição foram: universitário ($n=2$), infantil ($n=1$), especializado em doenças infecciosas ($n=1$) e geral ($n=7$). *C. parapsilosis* foi prevalente em todos os tipos de hospitais. O único isolado de *Pichia anomala* (*C. pelliculosa*) foi obtido de paciente internado em hospital geral.

Após a identificação morfológica e bioquímica a distribuição das espécies ficou demonstrada no **Quadro 1** sendo: *C. parapsilosis* (70%), *C. glabrata* (23 %), *C. krusei* (4%), *C. guilliermondii* (0,6%), *Pichia anomala* (*C. pelliculosa*) (0,6%), *C. lusitaniae* (0,6%), *C. famata* (0,6%), *C. kefyr* (0,6%). **(Apêndice 1).**

Quadro 1- Distribuição das espécies de leveduras agentes de candidemia em 166 amostras de hemoculturas, período de 2005 a 2008, obtidas de onze hospitais no estado de São Paulo.

Espécies	Número (%)
<i>C. parapsilosis</i>	116 (70)
<i>C. glabrata</i>	38 (23)
<i>C. krusei</i>	7 (4)
<i>C. lusitaniae</i>	1 (0,6)
<i>C. famata</i>	1 (0,6)
<i>C. pelliculosa</i>	1 (0,6)
<i>C. guilliermondii</i>	1 (0,6)
<i>C. kefyr</i>	1 (0,6)
Total	166 (100)

Os testes para 166 isolados frente aos quatro antifúngicos, pelas duas metodologias de referência: AFST-EUCAST e CLSI, perfizeram total de 1328 testes, que realizados em duplicata somaram 2656 procedimentos.

A sensibilidade aos antifúngicos fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B, de cada isolado consta do **Apêndice 1**. Os valores de CIM, avaliados sob os parâmetros de intervalo, moda, média, CIM₅₀ e CIM₉₀, estão expressos na **Tabela 2**.

O perfil de sensibilidade, frente ao fluconazol, analisado por AFST-EUCAST e CLSI, das 166 amostras, indicou respectivamente, intervalo de CIM de 0,12µg/mL-64µg/mL, moda 0,50µg/mL e 0,25µg/mL, média 3,04µg/mL e 2,82µg/mL, CIM₅₀ 1µg/mL e 0,5µg/mL, CIM₉₀ 4µg/mL.

Para itraconazol, os valores correspondentes a CIM, foram: intervalo 0,015µg/mL-8µg/mL e 0,015µg/mL-4µg/mL para AFST-EUCAST e

CLSI, respectivamente, moda 0,06µg/mL e 0,03µg/mL, média 0,17µg/mL e 0,11µg/mL, CIM₅₀ 0,06µg/mL e 0,03µg/mL, CIM₉₀ 0,25µg/mL para as duas metodologias.

Frente ao voriconazol em relação às metodologias AFST-EUCAST e CLSI, respectivamente, os resultados foram: intervalo 0,015µg/mL-0,2µg/mL e 0,015µg/mL-4µg/mL, moda 0,02µg/mL para as duas metodologias, média 0,08µg/mL e 0,06µg/mL para metodologia AFST-EUCAST e CLSI, CIM₅₀ 0,015µg/mL, CIM₉₀ 0,12µg/mL e 0,06µg/mL.

Frente à anfotericina B os valores de CIM foram: intervalo 0,03µg/mL-1µg/mL, moda 0,5µg/mL, média 0,48µg/mL e 0,68µg/mL para as duas metodologias, CIM₅₀ 0,5µg/mL e CIM₉₀ 1µg/mL, para as duas metodologias.

Para os 166 isolados de hemocultura foi observada concordância de 98,2% para fluconazol, de 99,4% tanto para itraconazol, quanto para voriconazol e de 99,2% para anfotericina B.

A correlação entre os métodos para fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B para os 166 isolados de hemocultura, constam nas figuras 9, 10, 11, 12.

As correlações entre as metodologias AFST- EUCAST e CLSI, foram: $r^2 = 0,9179$ e $p < 0,0001$ para fluconazol; $r^2 = 0,8538$ e $p < 0,0001$ para itraconazol; $r^2 = 0,7243$ e $p < 0,0001$ para voriconazol e para anfotericina B $r^2 = 0,07922$ e $p = 0,0002$.

De acordo com esses resultados a maior correlação foi observada para fluconazol. E o valor da hipótese ($p < 0,001$) frente aos fármacos azóis utilizados é significativo.

Tabela 2 - Distribuição dos valores de concentração inibitória mínima (CIM) de fármacos antifúngicos frente a 166 agentes de candidemia, em relação a dois métodos de referência

		CIM ($\mu\text{g/mL}$)					
Método	Antifúngico	Moda	Média	Desvio	Intervalo	CIM ₅₀	CIM ₉₀
				Padrão (σ)			
AFST- EUCAST	Fluconazol	0,5	3,04	8,50	0,12 - 64	1	4
	Itraconazol	0,06	0,17	0,37	0,015-8	0,06	0,25
	Voriconazol	0,02	0,08	0,19	0,015-2	0,015	0,12
	Anfotericina B	0,5	0,48	0,23	0,03-1	0,5	1
CLSI	Fluconazol	0,25	2,82	8,88	0,12 - 64	0,5	4
	Itraconazol	0,03	0,11	0,85	0,015-4	0,03	0,25
	Voriconazol	0,02	0,06	0,31	0,015-4	0,015	0,06
	Anfotericina B	0,5	0,68	0,29	0,03-1	0,5	1

AFST-EUCAST, *European Committee for Antifungal Susceptibility Testing*; CLSI, *Clinical Laboratory Standard Institute*

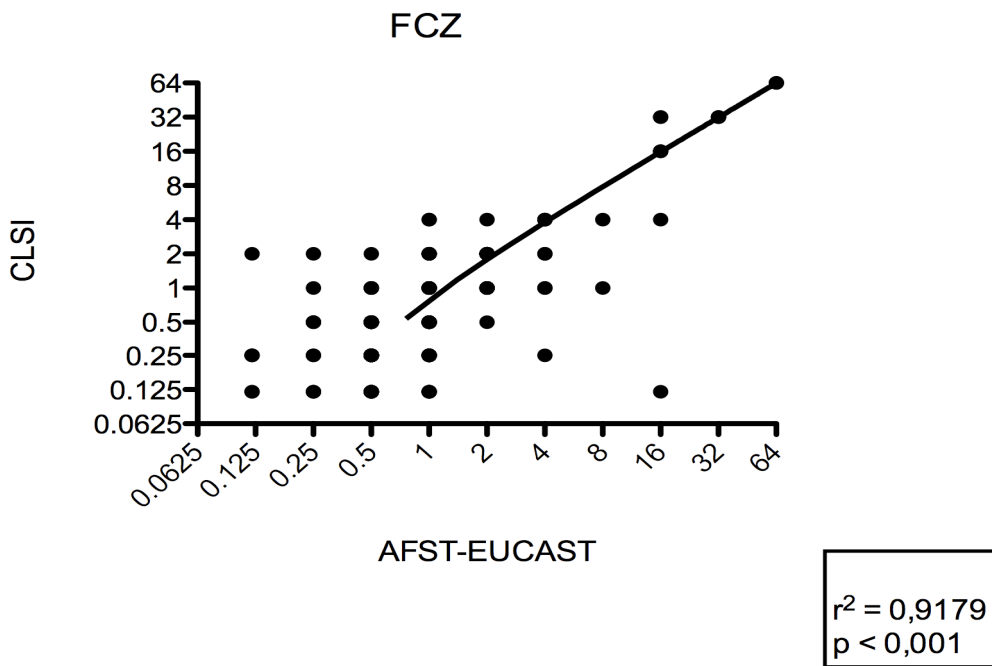


Figura 9. Correlação entre as metodologias,AFST-EUCAST e CLSI, frente ao fluconazol, para os 166 isolados de hemocultura.

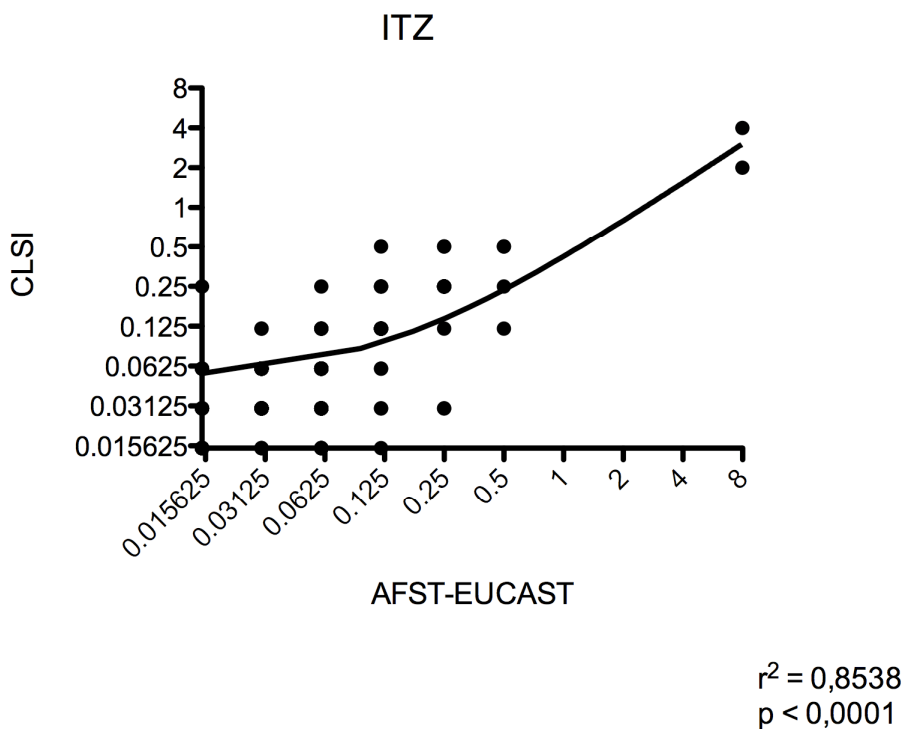


Figura 10. Correlação entre as metodologias,AFST-EUCAST e CLSI, frente ao itraconazol, para os 166 isolados de hemocultura.

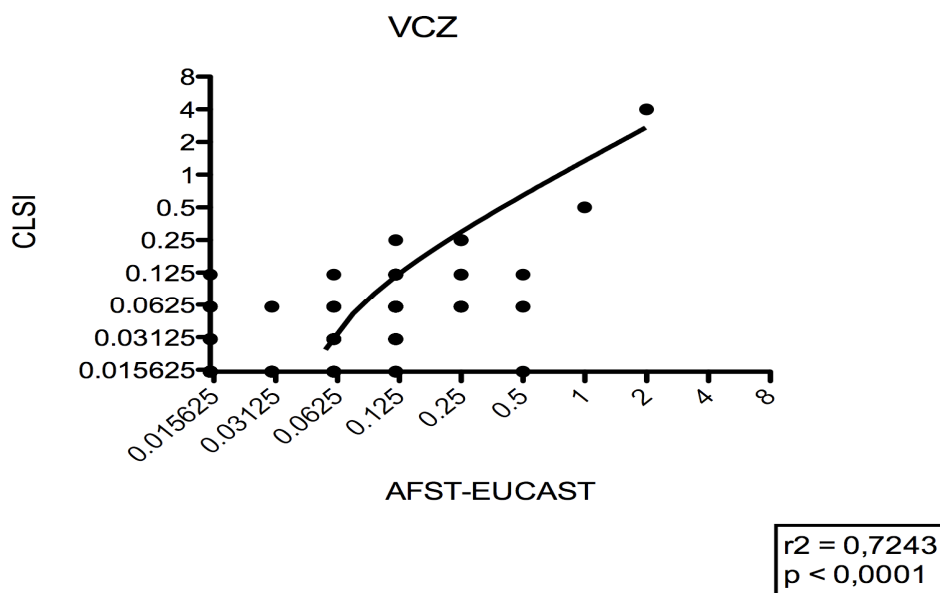


Figura 11. Correlação entre as metodologias,AFST-EUCAST e CLSI, frente ao voriconazol, para os 166 isolados de hemocultura.

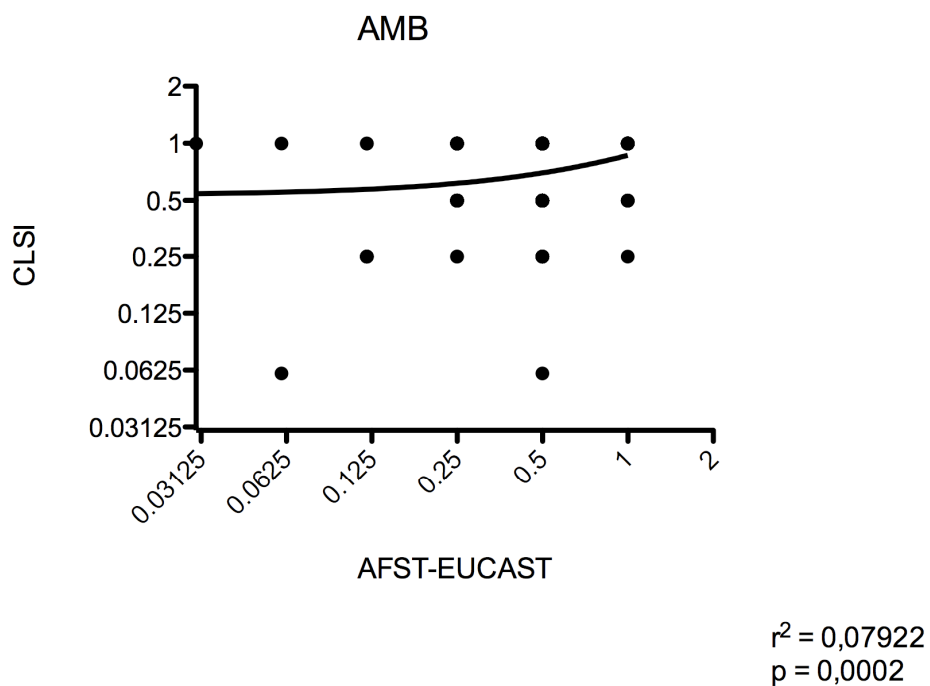


Figura 12. Correlação entre as metodologias,AFST-EUCAST e CLSI, frente a anfotericina B, para os 166 isolados de hemocultura.

Os valores de CIM dos quatro antifúngicos frente aos 166 isolados permitiram a classificação em categorias de sensibilidade (**Tabela 3**). Essa análise permitiu verificar em *C. parapsilosis* frente a fluconazol: um isolado (1468 SP3-07) resistente (AFST-EUCAST) e S-DD (CLSI) e outro isolado (22315 1/8) com sensibilidade intermediária (AFST-EUCAST). Frente ao voriconazol, dois isolados de *C. parapsilosis* (1220 SP3-07; 1468 SP3-07) foram resistente (AFST-EUCAST). Um desses isolados (1468 SP3-07) foi S-DD (CLSI) para itraconazol e outro isolado (1464 SP3/07) também apresentou essa mesma classificação.

Em *C. glabrata*, frente ao fluconazol, foram identificados dois isolados (72267 1/8; 1394 SP3-07) resistentes por metodologia CLSI. E um isolado (1471 SP3/07) classificado como S-DD a fluconazol por CLSI. Ao voriconazol foi encontrada resistência em um isolado (1394 SP3/07) por CLSI. Ao itraconazol, foram observados doze isolados com S-DD por CLSI (1214 SP/07; 1221 SP3/07; 1234 SP3/07; 1133 SP3/07; 1167 SP3/07; 1192 SP3/07; 1245 SP3/07; 1454 SP3/07; 174 H/06; 60694 1/8; 69694 2-08; 1471 SP3/07). Um isolado de *C. glabrata* (1394 SP3/07) foi resistente a todos os três azóis e sensível à anfotericina B em testes por CLSI. Um isolado (72267 1/8) foi resistente a fluconazol e itraconazol por CLSI.

Entre os isolados de *C. krusei*, foi encontrado quatro isolados (1229 SP3/07; 1442 SP3/07; 1477 SP3/07; 183 H/06) com S-DD por CLSI a itraconazol.

Tabela 3- Sensibilidade de 166 amostras de agentes de candidemia em onze hospitais do Estado de São Paulo, a quatro antifúngicos, segundo método utilizado.

Método AFST-EUCAST*			
Antifúngico	Sensível	SDD/I	Resistente
Fluconazol	114	1	1
Itraconazol	116	0	0
Voriconazol	114	-	2
Anfotericina B	116	-	0
Método CLSI			
Fluconazol	156**	1	2
Itraconazol	145	19	2
Voriconazol	165	0	1
Anfotericina B	166	-	0

AFST-EUCAST, *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*; CLSI, *Clinical and Laboratory Standards Institute*.

(*) *Breakpoints* apenas para *C. parapsilosis*, excluídos isolados de *C. krusei*, *C. glabrata*, *Pichia anomala*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. famata*, *C. lusitaniae* que não são passíveis de classificação por AFST-EUCAST.

(**) Excluídos isolados de *C. krusei*

A maior frequência de *C. parapsilosis* e *C. glabrata*, em relação às outras espécies estudadas, justificou a apresentação, em separado, da sensibilidade destas duas espécies.

O perfil de sensibilidade, analisado por AFST-EUCAST e CLSI, das amostras de *C. parapsilosis* (n = 116), pode ser observado na **Tabela 4**. As correlações entre as duas metodologias e seus respectivos fármacos podem ser observada nas **Figuras 13,14,15,16**.

Os resultados frente ao fluconazol para *C. parapsilosis* indicaram respectivamente, intervalo de CIM de 0,12µg/mL- 16µg/mL e 0,12 µg/mL a 32 µg/mL, moda 0,50 µg/mL e 0,25 µg/mL, média 0,95 µg/mL e 0,85 µg/mL, CIM₅₀ 0,5 µg/mL e 0,25 µg/mL, CIM₉₀ 2µg/mL nas duas metodologias empregadas.

Para o itraconazol, os valores correspondentes frente a *C. parapsilosis*, foram: intervalo 0,015µg/mL – 0,12µg/mL e 0,015µg/mL – 0,25µg/mL, moda 0,03µg/mL, média 0,04µg/mL, CIM₅₀ 0,03µg/mL e CIM₉₀ 0,06µg/mL, para ambas metodologias.

Ainda para *C. parapsilosis* frente ao voriconazol, AFST-EUCAST e CLSI, o intervalo de CIM 0,015µg/mL – 0,25µg/mL, moda 0,02µg/mL, média 0,03µg/mL e 0,02µg/mL, CIM₅₀ 0,015µg/mL e CIM₉₀ 0,06µg/mL e 0,03µg/mL, para as duas metodologias.

Em relação à anfotericina B para AFST-EUCAST E CLSI, os valores de CIM frente a *C. parapsilosis*, foram: intervalo 0,06µg/mL - 1µg/mL, moda 0,5µg/mL e 1µg/mL, média 0,46µg/mL e 0,71µg/mL, CIM₅₀ 0,5µg/mL e CIM₉₀ 0,5µg/mL e 1µg/mL.

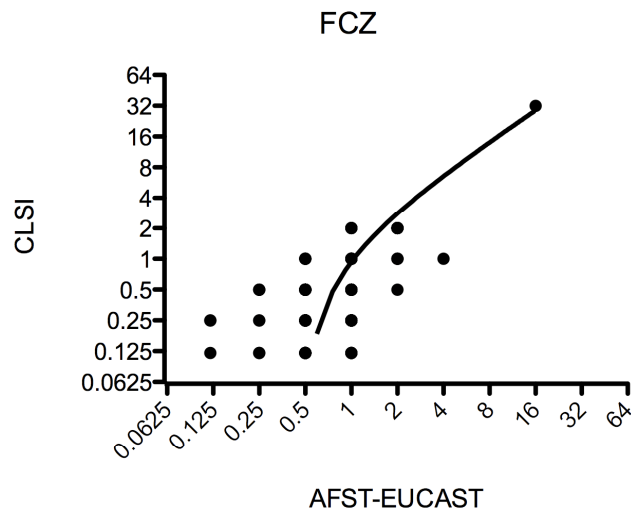
Essa análise permitiu verificar em *C. parapsilosis* frente a fluconazol: um isolado (1468 SP3/07) resistente (AFST-EUCAST) e S-DD (CLSI) e outro isolado (22315 1/8) com sensibilidade intermediária (AFST-EUCAST). Frente ao voriconazol, dois isolados de *C. parapsilosis* (1220 SP3/07; 1468 SP3/07) foram resistente (AFST-EUCAST). Dois isolados (1464 SP3/07, 1468 SP3/07) foram S-DD (CLSI) para itraconazol.

As correlações entre as metodologias AFST- EUCAST e CLSI, na análise de 116 isolados de *C. parapsilosis* foram: $r^2 = 0,9095$ e $p < 0,0001$ para fluconazol; $r^2 = 0,1771$ e $p < 0,0001$ para itraconazol; $r^2 = 0,3544$ e $p < 0,0001$ para voriconazol e para anfotericina B, $r^2 = 0,1058$ e $p = 0,0004$.

Tabela 4- Distribuição dos valores de concentração inibitória mínima (CIM) de quatro fármacos antifúngicos frente a 116 amostras de *C. parapsilosis* agentes de candidemia

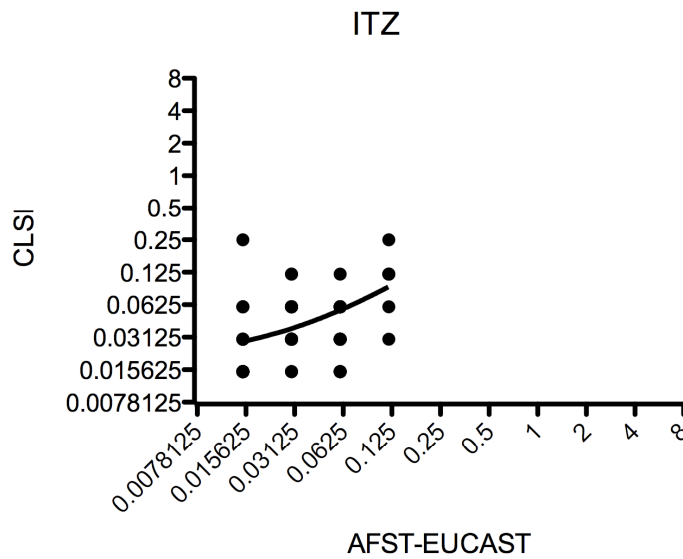
Método	Antifúngico	CIM (µg/mL)					
		Moda	Média	Desvio	Intervalo	CIM ₅₀	CIM ₉₀
				Padrão (σ)			
AFST-EUCAST	Fluconazol	0,5	0,95	1,52	0,12 – 16	0,5	2
	Itraconazol	0,03	0,04	0,03	0,015-0,12	0,03	0,06
	Voriconazol	0,02	0,03	0,04	0,015-0,25	0,015	0,06
	Anfotericina B	0,5	0,46	0,21	0,06 – 1	0,5	0,5
CLSI	Fluconazol	0,25	0,85	2,97	0,12 – 32	0,25	2
	Itraconazol	0,03	0,04	0,04	0,015 -0,25	0,03	0,06
	Voriconazol	0,02	0,02	0,03	0,015-0,25	0,015	0,03
	Anfotericina B	1	0,71	0,29	0,06 – 1	0,5	1

AFST-EUCAST, *European Committee for Antifungal Susceptibility Testing*; CLSI, *Clinical Laboratory Standard Institute*



C. parapsilosis (n = 116)
 $r^2 = 0,9095$
 $p < 0,0001$

Figura 13. Correlação entre as metodologias,AFST-EUCAST e CLSI, frente ao fluconazol, para os 116 isolados de *C. parapsilosis*.



C. parapsilosis (n = 116)
 $r^2 = 0,1771$
 $p < 0,0001$

Figura 14. Correlação entre as metodologias,AFST-EUCAST e CLSI, frente ao itraconazol, para os 116 isolados de *C. parapsilosis*.

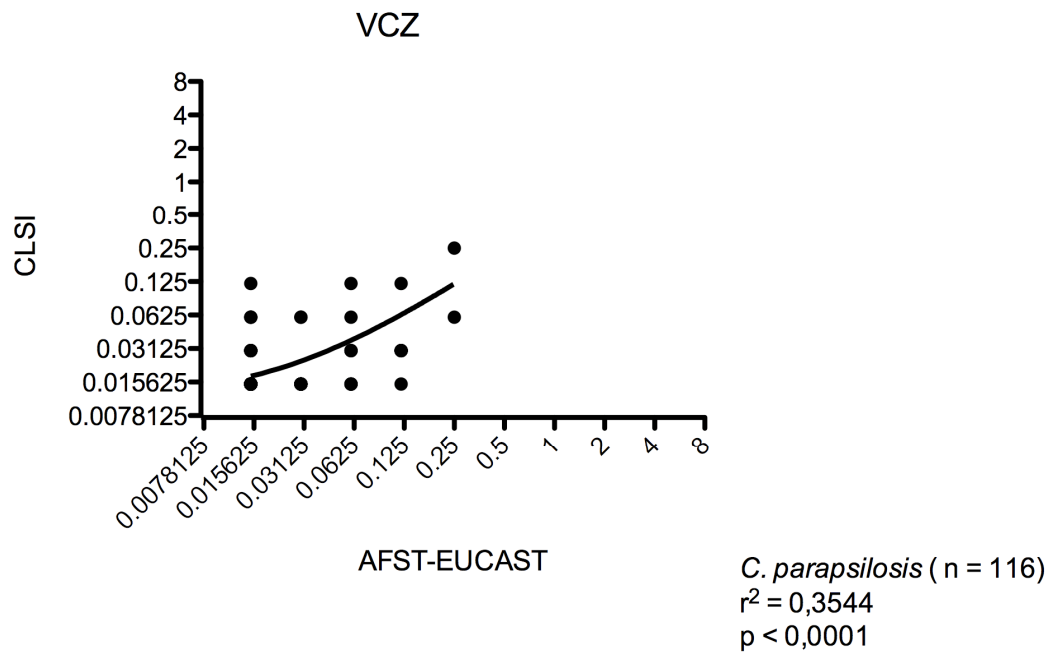


Figura 15. Correlação entre as metodologias,AFST-EUCAST e CLSI, frente ao voriconazol, para os 116 isolados de *C. parapsilosis*.

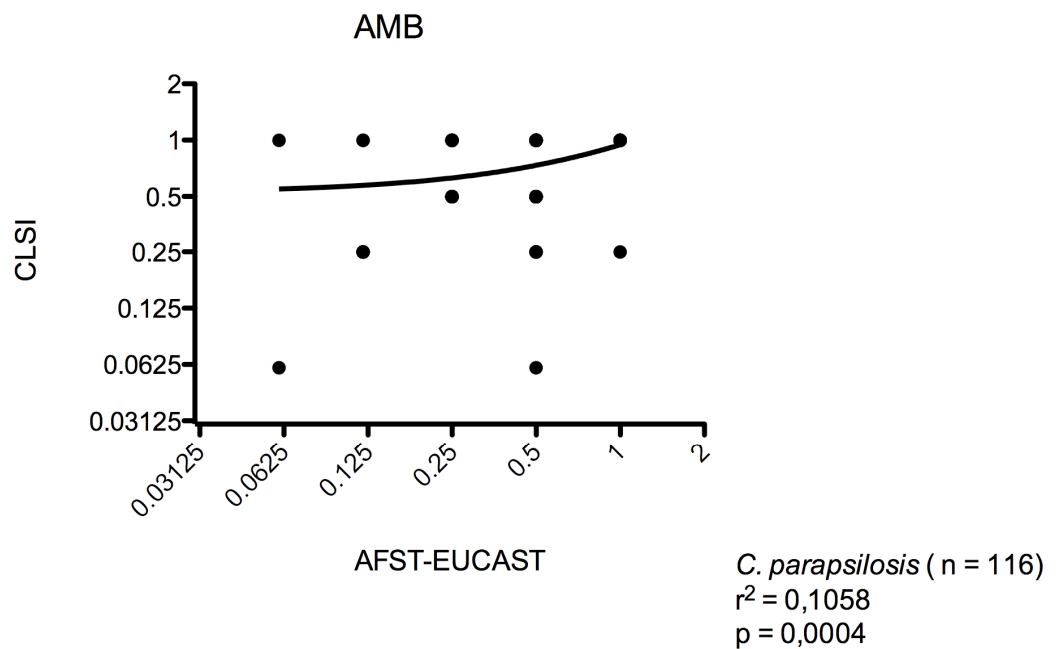


Figura 16. Correlação entre as metodologias,AFST-EUCAST e CLSI, frente ao anfotericina B, para os 116 isolados de *C. parapsilosis*.

O perfil de sensibilidade, analisado por AFST-EUCAST e CLSI, das amostras de *C. glabrata* (n= 38), pode ser observado na **Tabela 5** e suas correlações podem ser observadas nas **figuras 17,18,19,20**.

Candida glabrata frente ao fluconazol resultou, intervalos de CIM de 0,12µg/mL-64µg/mL, moda 1µg/mL, média 2µg/mL e 5,74µg/mL, CIM₅₀ 2µg/mL e 1 µg/mL, CIM₉₀ 16µg/mL e 4µg/mL.

Para os testes com itraconazol e *C. glabrata*, por metodologias AFST-EUCAST e CLSI, os valores de CIM foram: intervalo 0,03µg/mL - 8µg/mL e 0,015µg/mL - 4µg/mL, moda 0,25µg/mL e 0,03µg/mL, média 0,58µg/mL e 0,31µg/mL, CIM₅₀ 0,12µg/mL, CIM₉₀ 0,5µg/mL.

Candida glabrata frente ao voriconazol, em relação as metodologias, AFST-EUCAST e CLSI, respectivamente: intervalo 0,015µg/mL - 2µg/mL e 0,0015µg/mL-4µg/mL, moda 0,12µg/mL e 0,06µg/mL, média 0,23µg/mL e 0,17µg/mL, CIM₅₀ 0,12µg/mL e 0,06µg/mL, CIM₉₀ 0,5µg/mL e 0,12µg/mL.

Para anfotericina B e *C. glabrata* avaliada segundo AFST-EUCAST e CLSI respectivamente, foram obtidos os seguintes resultados: intervalo 0,03µg/mL-1µg/mL, moda 0,5µg/mL, média 0,51µg/mL e 0,64µg/mL, CIM₅₀ 0,5µg/mL e CIM₉₀ 1µg/mL.

Essa análise permitiu verificar que em *C. glabrata*, frente ao fluconazol, foram identificados dois isolados (72267 1/8; 1394 SP3/07) resistentes e um isolado (1471 SP3/07) S-DD por CLSI. Frente ao itraconazol, foram identificados 12 isolados (1214 SP3/07, 1221 SP3/07, 1234 SP3/07, 1133 SP3/07, 1167 SP3/07, 1192 SP3/07, 1245 SP3/07, 1454 SP3/07, 174 H/06, 60694 1/8, 60694 2-08, 1471 SP3/07) com S-DD por CLSI. Dois isolados de *C. glabrata* (1394 SP3/07, 72267 1/8) resistentes a itraconazol por CLSI. O isolado (1394 SP3/07) apresentou resistência aos 3 azóis, porém foi sensível a anfotericina B na metodologia CLSI. O isolado (72267 1/8) apresentou resistência a FCZ e ITZ na metodologia CLSI.

As correlações para os 38 isolados de *C. glabrata* entre os métodos foram: fluconazol ($r^2 = 0,9058$ e $p < 0,0001$), itraconazol ($r^2 = 0,8627$ e $p < 0,0001$), voriconazol ($r^2 = 0,7766$ e $p < 0,0001$) e anfotericina B ($r^2 = 0,08118$

e $p = 0,0829$). De acordo com os dados a maior associação foi para fluconazol e a menor associação foi para anfotericina B. Para verificar uma possível reação cruzada entre os azóis fluconazol e voriconazol, foram realizadas mais duas análises com as metodologias AFST-EUCAST ($r^2 = 0,6742$ e $p < 0,0001$) e CLSI ($r^2 = 0,5371$ e $p < 0,0001$), que podem ser observados nas **figuras 21 e 22**.

Tabela 5 - Distribuição dos valores de concentração inibitória mínima (CIM) de quatro fármacos antifúngicos frente a 38 amostras de *C. glabrata* agentes de candidemia

Método	Antifúngico	CIM ($\mu\text{g/mL}$)					
		Moda	Média	Desvio	Intervalo	CIM ₅₀	CIM ₉₀
				Padrão (σ)			
AFST- EUCAST	Fluconazol	1	2	14,42	0,12 - 64	2	16
	Itraconazol	0,25	0,58	1,78	0,03 – 8	0,12	0,5
	Voriconazol	0,12	0,23	0,35	0,015 – 2	0,12	0,5
	Anfotericina B	0,5	0,51	0,24	0,03 – 1	0,5	1
CLSI	Fluconazol	1	5,74	14,82	0,12 – 64	1	4
	Itraconazol	0,03	0,31	0,7	0,015 – 4	0,12	0,5
	Voriconazol	0,06	0,17	0,64	0,015 – 4	0,06	0,12
	Anfotericina B	0,5	0,64	0,28	0,03 – 1	0,5	1

AFST-EUCAST, *European Committee for Antifungal Susceptibility Testing*; CLSI, *Clinical Laboratory Standard Institute*

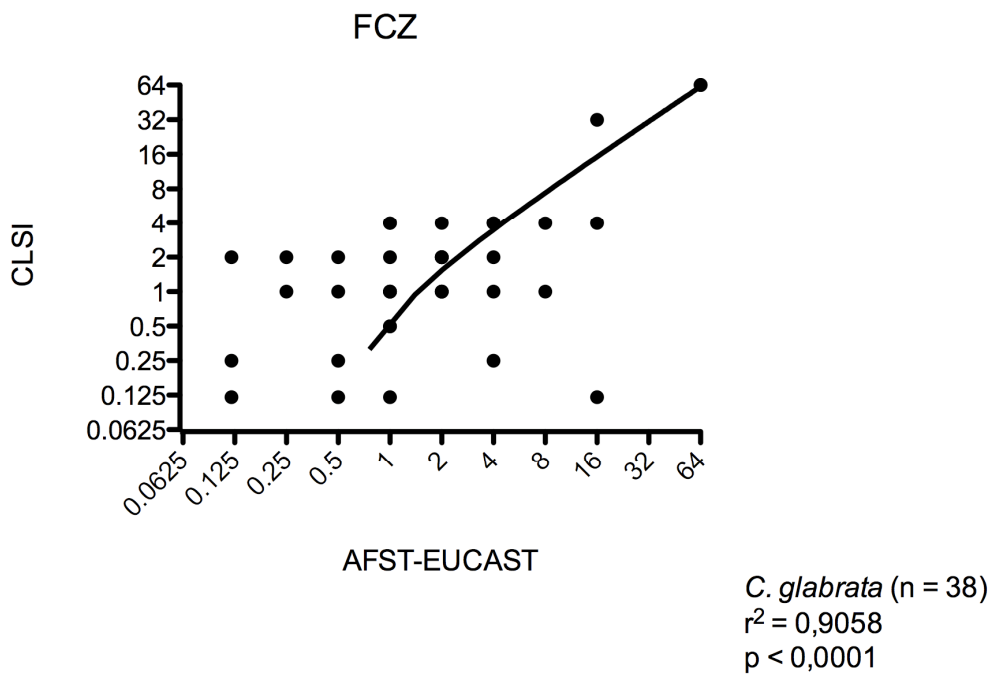


Figura 17. Correlação entre as metodologias, AFST-EUCAST e CLSI, frente ao fluconazol, para os 38 isolados de *C. glabrata*.

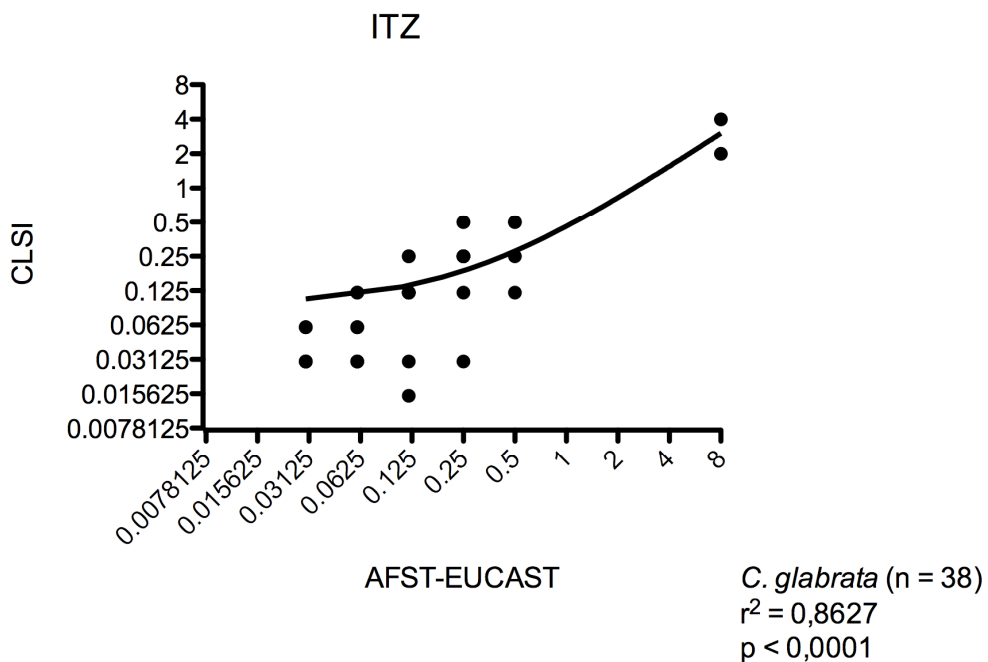


Figura 18. Correlação entre as metodologias, AFST-EUCAST e CLSI, frente ao itraconazol, para os 38 isolados de *C. glabrata*.

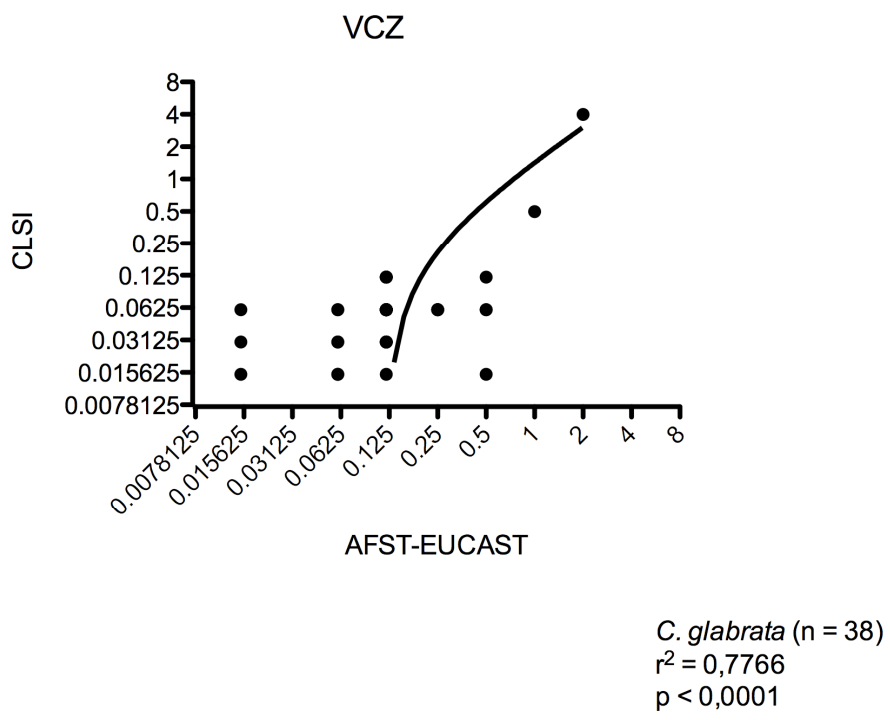


Figura 19. Correlação entre as metodologias,AFST-EUCAST e CLSI, frente ao voriconazol, para os 38 isolados de *C. glabrata*.

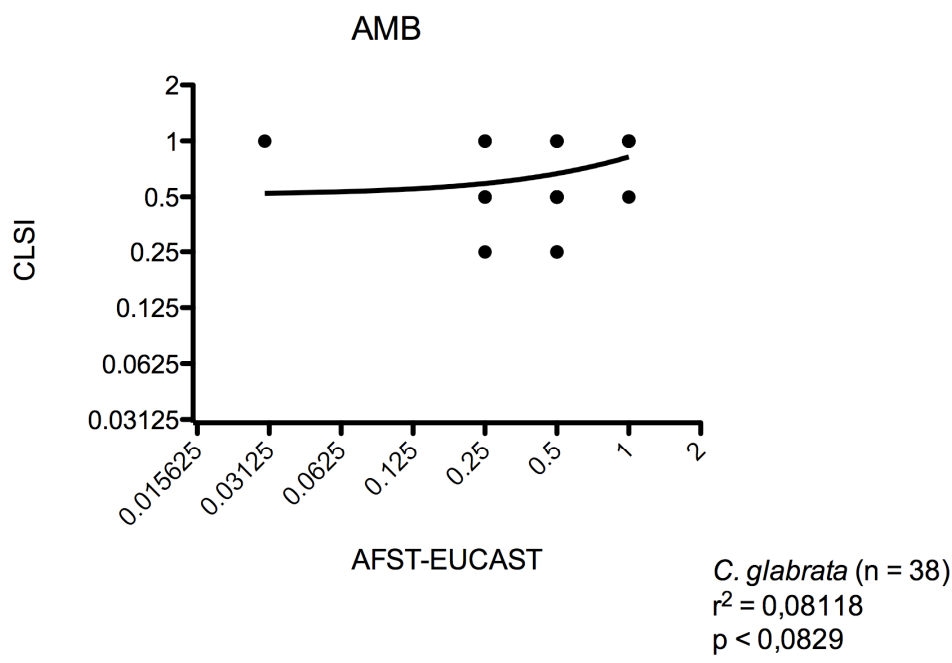


Figura 20. Correlação entre as metodologias,AFST-EUCAST e CLSI, frente ao anfotericina B, para os 38 isolados de *C. glabrata*.

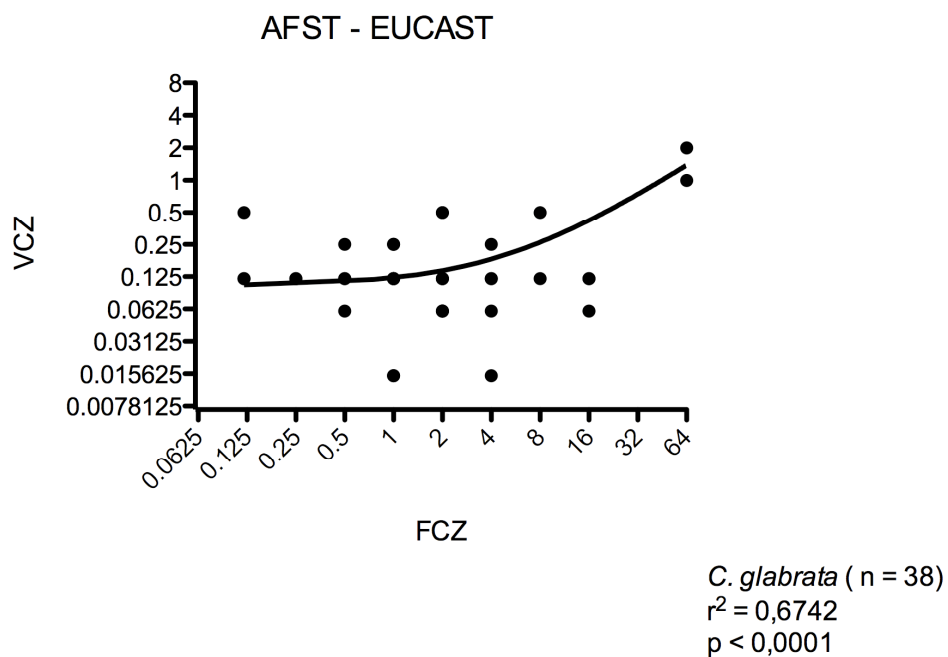


Figura 21. Correlação entre os fármacos fluconazol e voriconazol pela metodologia AFST-EUCAST, para os 38 isolados de *C. glabrata*.

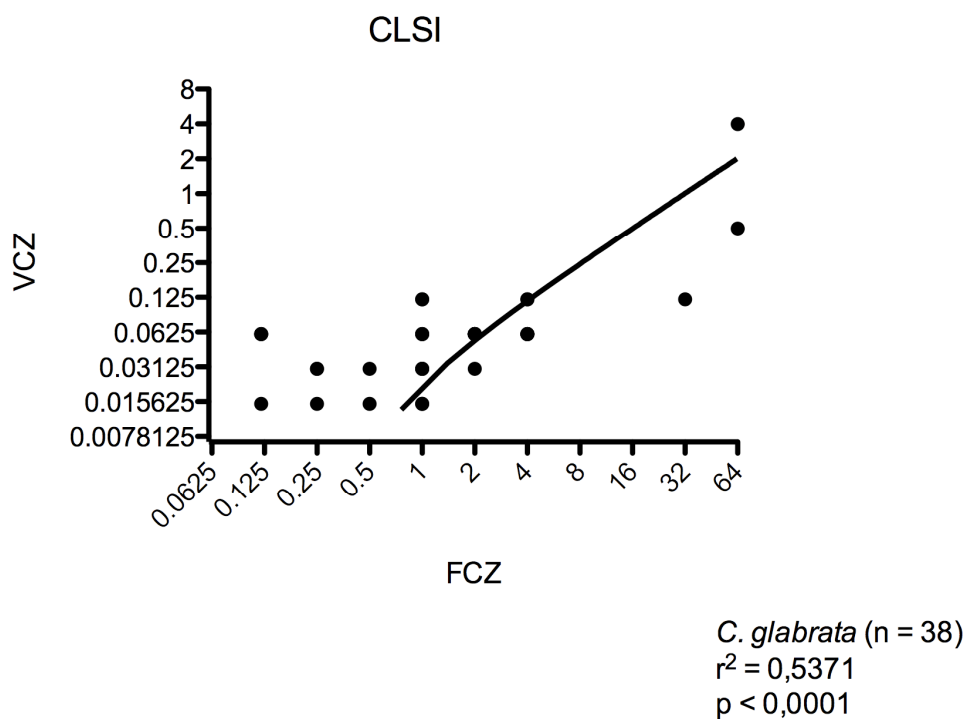


Figura 22. Correlação entre os fármacos fluconazol e voriconazol pela metodologia CLSI, para os 38 isolados de *C. glabrata*.

Os valores de CIM de fluconazol para *C. krusei* (n= 07) não podem ser interpretados, desde que, esta espécie é intrinsicamente resistente a esta droga. Em relação ao itraconazol, foram encontrados 4 isolados (1229 SP3/07, 1442 SP3/07, 1477 SP3/07, 183 H/06) com S-DD na metodologia CLSI.

Para a única amostra de *C. famata* foram observados valores de CIM (AFST-EUCAST/CLSI) para fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B, respectivamente, de: 0,5/0,5µg/mL, 0,12/0,06µg/mL, 0,015/0,015µg/mL, 0,5/0,5µg/mL.

O isolado único de *C. guilliermondii* apresentou valores de CIM (AFST-EUCAST/CLSI) para fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B, respectivamente, de: 4/4µg/mL, 0,25/0,25µg/mL, 0,12/0,12µg/mL, 0,25/0,5µg/mL.

A única amostra de *C. kefyr* apresentou valores de CIM (AFST-EUCAST/CLSI) para fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B, respectivamente, de: 1/0,5µg/mL, 0,06/0,06µg/mL, 0,015/0,015µg/mL, 1/1µg/mL.

Para a única amostra de *C. lusitaniae* foram observados valores de CIM (AFST-EUCAST/CLSI) para fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B, respectivamente, de: 0,5/0,25µg/mL, 0,03/0,06µg/mL, 0,015/0,015µg/mL, 0,25/0,5µg/mL.

O único isolado de *P. anomala* (*C. pelliculosa*) apresentou altos valores de CIM frente à FCZ e ITZ na metodologia AFST-EUCAST e sensível aos outros antifúngicos por ambas metodologias. Os isolados únicos de *C. kefyr*, *C. famata* e *C. lusitaniae* foram sensíveis aos antifúngicos testados (**Apêndice 1**).

6. DISCUSSÃO

Candida albicans e *C. tropicalis* são as espécies de maior prevalência em infecções invasivas humanas, segundo os maiores estudos nacionais (Colombo *et al.*, 2003; Colombo *et al.*, 2006; da Matta *et al.*, 2007). Apesar de sua importância nas taxas de morbidade, a alta sensibilidade *in vitro* dessas espécies às drogas azólicas e à anfotericina B, podem predizer boa resposta à terapia. Por outro lado, existem evidências de que infecções invasivas por outras espécies representam um problema crescente.

Na Europa, alguns estudos mostram que, apesar de *C. albicans* ainda ser a mais freqüente, outras espécies estão em ascensão em alguns países, sendo que a sua posição relativa é distinta nos diversos países (Voss *et al.*, 1996; Cuenca-Estrella *et al.*, 2005; Almirante *et al.*, 2005). Na Itália, Caggiano *et al.* (2007) publicaram estudo que mostra essa tendência, com aumento proporcional da incidência de espécies não-*C. albicans*, de 63,2% (1999) para 76,9% (2004), como agentes de candidemia.

Um longo estudo realizado por Mokaddas *et al.* (2007) de 1996 a 2005 com isolados de *Candida* de corrente sanguínea, em hospitais terciários no Kuwait, mostrou dentre 607 isolados, *C. albicans* (40%), *C. parapsilosis* (31%), *C. tropicalis* (12%), *C. glabrata* (6%), *C. krusei* (2%) e outras espécies (11%). Os autores observaram que a relação de isolados de *C. albicans* e não-*C. albicans*, nos dois períodos de estudo (1996-2000 e 2001-2005), foi de 59:139 e 181:228, respectivamente. O aumento significativo, maior do que o dobro, no segundo período do estudo de isolados não-*C. albicans* pode ser uma prova da tendência de seu aumento.

O programa americano SENTRY, que avalia os agentes de candidemia em distintos países, permitiu observar no período de 2006 a 2007 que, dentre 1448 isolados de *Candida* spp., os agentes foram: *C. albicans* (53,2%), *C. parapsilosis* (16,4%), *C. glabrata* (13,9%), *C. tropicalis* (10,8%), *C. krusei* (2%) e outras espécies de *Candida* spp (3,5%). A distribuição das espécies foi semelhante à descrita na série anterior, referente a 1997 até 1999 (SENTRY). Porém, na Europa houve alteração

importante na ordem das quatro espécies mais comuns (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*). *C. glabrata* passou do terceiro para segundo lugar e *C. parapsilosis* passou ao terceiro. Desse modo, a posição das espécies européias, segundo a frequência, ficou igual a das norte-americanas (Messer *et al.*, 2009). No entanto, estudo espanhol verificou *C. tropicalis* na terceira posição de frequência naquele país (Cuenca-Estrella *et al* 2002a).

Na Ásia, *C. albicans* também é a espécie mais comumente isolada de casos de candidemia, seguida de *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* (Tan *et al.*, 2008).

Pfaller *et al.* (2007a) ressalta a importância de *C. parapsilosis* no continente americano, cuja frequência como agente de infecções invasivas aumentou nos últimos anos, com maior evidência na América Latina.

No Brasil, no maior estudo sobre etiologia de candidemia, da Matta *et al.* (2007) avaliaram isolados de período de 9 anos, em que as taxas de *C. parapsilosis* subiram de 19% (1995) para 25% (2003) e ressaltam a importância de monitorar as taxas de frequência dessa espécie. Pereira *et al.*, (2010) observaram que *C. albicans* (18%) não foi a espécie prevalente como agente de candidemia em hospital público terciário, situando-se depois de *C. parapsilosis* (26%) e *C. tropicalis* (26%). Ainda mais relevante foi o fato desses autores não encontrarem isolados de *C. albicans* no último ano do estudo, realizado entre 2004 e 2008, em que foi objeto do estudo. Em outro estudo brasileiro, realizado também em hospital público terciário, mas no estado de Ceará, Medrano *et al.* (2006) observaram que *C. parapsilosis* foi o agente mais encontrado (64%) como agente de candidemia. A posição de destaque de *C. parapsilosis*, (34,4%), logo após *C. albicans* (45,8%) dentre os agentes de candidemia, foi ressaltada também por Chang *et al.* (2008), em hospital público terciário no estado de Mato Grosso do Sul, com 96 casos (55,2% adultos e 44,8% crianças), ocorridos entre 1998 e 2006. No estado de Goiás, *C. parapsilosis* teve frequência de 24,2%, seguindo *C. albicans* (48,5%) (Passos *et al.*, 2010). O mais recente estudo do Brasil, segundo literatura consultada,

confirma também a importância de *C. parapsilosis*, como a espécie não-*C. albicans* mais prevalente (76,5%) em 102 casos de candidemia na cidade de Botucatu, interior de São Paulo (Bruder-Nascimento *et al.*, 2010).

Todos estes estudos nos fornecem informações valiosas sobre a etiologia das candidemias, desde que, dados oficiais são inexistentes, em nosso país e, em particular, no estado de São Paulo. O problema é sério, tendo em vista o número de hospitais existentes (~900) neste estado segundo o CVE-SP (2010). Destes, apenas 600 hospitais notificaram, em 2008, a incidência (17%) de infecção de corrente sanguínea, tanto bacteriana quanto fúngica. Dentre os patógenos, leveduras referidas como *Candida* foram responsáveis por cerca de 5% dessas infecções.

O Instituto Adolfo Lutz, como laboratório de referência Estadual de Saúde Pública, recebe a grande maioria das amostras de leveduras isoladas na rede hospitalar do estado de São Paulo, tanto para confirmação da identificação de espécie, quanto para avaliar a sua sensibilidade a fluconazol. Este estudo foi desenvolvido no sentido de descrever o possível aparecimento de novas espécies e a distribuição dos agentes menos freqüentes de candidemia, i.e. não-*C. albicans* e não-*C. tropicalis*, em 11 hospitais do Estado de São Paulo. Além disso, teve como objetivo avaliar a ocorrência de fenótipos de resistência a drogas antifúngicas. Os resultados deste estudo podem contribuir para a formação de banco de dados sobre freqüência de espécies e fenótipos de resistência, de modo a permitir um monitoramento das candidemias no Estado de São Paulo.

O estudo das freqüências das espécies permitiu observar que *Candida parapsilosis* ocupou o primeiro lugar (70%) dentre as espécies analisadas, seguida de *C. glabrata* (23%), *C. krusei* (4%), *C. famata*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii* e *Pichia anomala* (*C. pelliculosa*) (0,6% cada). Este estudo descreveu essas oito espécies, também prevalentes em trabalhos anteriores, mas não identificou algumas espécies raras emergentes, como, *C. lipolitica*, *C. rugosa* e *C. zeylanoides*, já descritas em publicações nacionais recentes (da Matta *et al.* 2007; Pereira *et al.*, 2010; Passos *et al.*, 2010).

Assim como neste estudo, da Matta *et al.* (2007), Colombo *et al.* (2003) e Colombo *et al.* (2006) também descreveram *C. parapsilosis* como a espécie, não-*C. albicans* e não-*C. tropicalis*, mais freqüente com taxas altas (respectivamente 67%, 59% e 54%) relativas às demais espécies, aproximadas à encontrada neste estudo.

O estudo de sensibilidade dos 166 isolados de hemocultura permitiu verificar alta correlação entre os resultados das duas metodologias empregadas neste estudo. Para fluconazol a concordância foi de 98,2%, para itraconazol e voriconazol foi de 99,4% e para anfotericina B de 99,2%. De fato, desde 2005, sabe-se que os métodos são correspondentes nos valores de CIM, mas estudos com cepas brasileiras ainda carecem dessa conclusão. Esta pesquisa contribui também para esse conhecimento.

A discordância pequena observada nos resultados de fluconazol deveu-se, exclusivamente, a testes com *C. glabrata*. Para itraconazol observou-se discordância em apenas um isolado de *C. parapsilosis* e para voriconazol a discordância foi verificada para *C. glabrata*. Para anfotericina B os resultados discordantes foram vistos em testes com duas cepas, incluindo *C. glabrata* e *C. parapsilosis*.

A sensibilidade de *C. parapsilosis* frente ao fluconazol foi alta, independente do método utilizado na microdiluição. Estes dados confirmam achados prévios (Pfaller *et al.*, 2004). Encontrou-se apenas um isolado (1468 SP3/07) classificado como resistente e outro como intermediário (22315 1/8) por AFST-EUCAST. Apesar de serem raros os relatos de cepas resistentes em *C. parapsilosis*, destaca-se o de Magill *et al.* (2006). A resistência por AFST-EUCAST do primeiro isolado foi comprovada por CIM de 16 µg/mL, valor equivalente a 32 µg/mL observado por método CLSI. Se o *breakpoint* de FCZ adotado por CLSI fosse idêntico ao do AFST-EUCAST, o isolado seria resistente pelos dois métodos. No entanto, por CLSI o valor de CIM situa o isolado na categoria S-DD. Importante notar que esse isolado não foi sensível em testes pelos dois métodos.

O isolado de *C. parapsilosis* (22315 1/8) classificado como sensibilidade intermediária (CIM 4µg/mL) por AFST-EUCAST, foi sensível no

CLSI (CIM 1 µg/mL). Os valores de CIM observados nos dois métodos não apresentam diferença importante (≤ 2 diluições). A diferença da categoria do isolado deve-se aos distintos *breakpoints* dos métodos. Todos esses achados comprovam a alta correlação ($r^2 = 0,9095$; $p < 0,0001$) entre AFST-EUCAST e CLSI para análise de *C. parapsilosis* e fluconazol.

Análise da sensibilidade ao fluconazol das 116 amostras de *C. parapsilosis* revelou CIM₉₀ de 2µg/mL. Este valor foi igual ao encontrado em estudo brasileiro de Matsumoto *et al.*, 2007 e maior ao descrito (CIM₉₀ de 1µg/mL) em estudos espanhóis de Almirante *et al.*, 2005 e Cuenca-Estrella *et al.*, 2005. Os resultados de sensibilidade obtidos (CIM₉₀ de 2µg/mL) com metodologia CLSI, foram idênticos aos verificados por Jung *et al.* (2010), da Matta *et al* (2007) no Brasil e Odds *et al.* (2007) na Escócia. O valor de CIM₉₀, encontrado neste estudo por ambas as metodologias, encontra-se no limite superior daquele relatado para esta espécie (0,125 µg/mL a 2 µg/mL) na base de dados do site europeu (www.eucast.org).

Os resultados referentes à itraconazol (CIM₅₀ de 0,03µg/mL) neste estudo foi equivalente ao obtidos por Matsumoto *et al.* (2007) no Brasil e Cuenca-Estrella *et al.* (2005). O valor de MIC₉₀ (0,06 µg/mL) foi idêntico ao descrito por Cuenca-Estrella *et al.* (2005) e um pouco menor do que o obtido por Matsumoto *et al.* (2007) e Pereira *et al.* (2010) que também utilizaram AFST-EUCAST como metodologia, não relataram cepas resistentes ao itraconazol. Para os testes feitos segundo CLSI o resultado de CIM₅₀ (0,03µg/mL) coincide com aquele encontrado por Colombo *et al.* (2006) e da Matta *et al.* (2007), no Brasil, e por Godoy *et al.* (2003) para isolados obtidos em diversos países da América Latina, indicando ausência de fenótipos resistentes para itraconazol.

Do mesmo modo a sensibilidade de *C. parapsilosis* foi alta frente ao voriconazol. Somente dois isolados (1468 SP/07; 1220 SP3/07) foram resistentes ao fármaco no método AFST-EUCAST. Ainda que no método CLSI um deles tenha apresentado valor idêntico de CIM nos dois métodos (0,25µg/mL), quando este valor é interpretado segundo *breakpoint* o isolado é classificado em grupos distintos, sendo sensível pelo CLSI e resistente

pelo AFST-EUCAST. Vale lembrar que esse isolado mostrou resistência cruzada entre voriconazol e fluconazol no método AFST-EUCAST. Para itraconazol o isolado foi classificado como S-DD. No segundo isolado (1220 SP3/07) o valor de CIM para voriconazol foi equivalente nas duas metodologias, respectivamente, 0,25 µg/mL para AFST-EUCAST e 0.06 µg/mL para CLSI. No entanto, o isolado também foi classificado como sensível pelo CLSI e resistente pelo AFST-EUCAST. Para fluconazol e itraconazol o isolado foi sensível, sem reação cruzada, portanto.

Para *C. parapsilosis* os valores de CIM₅₀ 0,015µg/mL e CIM₉₀ 0,06µg/mL, pelo método AFST-EUCAST, foram idênticos aqueles descritos por Matsumoto *et al.* (2007) e superior à descrita por Cuenca-Estrella *et al.* em 2005 (CIM₉₀ 0,03 µg/mL). Interessante foi o encontro de um isolado (isolado 1220 SP3/07) para o qual CIM de voriconazol foi 0,25 µg/mL, o que a classifica segundo *breakpoint* de AFST-EUCAST, na categoria de resistente. De acordo com os dados disponíveis no site de AFST-EUCAST, apenas 1,2% das cepas de *C. parapsilosis* foi comunicado como resistentes a essa droga. (www.eucast.org). Vale ressaltar que o isolado foi sensível a fluconazol (CIM 1 µg/mL) e ao itraconazol (CIM 0,03 µg/mL). Para resultados obtidos pela metodologia CLSI, os dados mostraram também alta sensibilidade dessa espécie (*C. parapsilosis*) frente ao voriconazol (CIM₅₀ de 0,015µg/mL e CIM₉₀ de 0,03µg/mL) assim como descrito por Jung *et al.* (2010) e Matta *et al.* (2007) De fato, os valores de CIM de voriconazol, tanto por AFST-EUCAST quanto CLSI, frente a cepas de *C. parapsilosis*, situam-se entre 0,008 µg/mL e 0,125 µg/mL (www.eucast.org).

Importante citar que, particularmente, para voriconazol o tempo de leitura deve ser realizado, obrigatoriamente, somente às 48 h, visto que resultados incorretos podem decorrer de leituras de 24 h, conforme descrito por Espinel-Ingroff *et al.* (2009).

A alta sensibilidade à anfotericina B foi verificada neste estudo, em concordância com o de Pereira *et al.* (2010). O resultado de CIM₉₀ 0,5µg/mL foi menor ao encontrado (CIM₉₀ 1µg/mL) por Matsumoto *et al.*

(2007) e maior ao relatado (CIM₉₀ 0,25µg/mL) por Cuenca-Estrella *et al.* (2005).

O valor de CIM₉₀ 1 µg/mL para anfotericina B obtido por CLSI foi igual ao encontrado por Colombo *et al.* (2003), Godoy *et al.* (2003) e Colombo *et al.* (2006) no Brasil, por Gonzalez *et al.* (2008) no México e por Messer *et al.* (2009) no programa americano SENTRY, englobando diversos países. O valor de CIM₅₀ 0,5µg/mL, foi também o mesmo verificado (Godoy *et al.* 2003).

Todos esses valores de anfotericina B classificam as cepas de *C. parapsilosis* como sensíveis ao polieno, como extensivamente citado em literatura. Raras exceções da ocorrência de cepas resistentes como a descrita por Bruder-Nascimento *et al.* (2010) e Passos *et al.* (2010), mostram isolados (únicos) de *C. parapsilosis* resistente à anfotericina B.

Dentre as demais espécies analisadas neste estudo, *Candida glabrata* (23%) foi observada em taxa semelhante à descrita por Hinrichsen *et al.* (2008) no Brasil e por Jung *et al.* (2010) na Coreia do Sul (20% x 27%). No entanto, este valor é alto se comparado aos de estudos realizados no Brasil. Nos trabalhos de Chang *et al.* (2008), Colombo *et al.* (2006) e da Matta *et al.* (2007) as frequências dessa espécie foram menores (13%, 12,5% e 12%, respectivamente). Trabalhos de Pereira *et al.* (2010), Medrano *et al.* (2006) e Ruiz *et al.* (2005) mostram porcentagens ainda menores de *C. glabrata* (8%, 7% e 2,4% respectivamente), em relação às outras espécies não-*C. albicans* e não *C. tropicalis*. Interessante notar que poucos estudos, como os de Bruder-Nascimento *et al.* (2010) e Ruiz *et al.* (2005) mostrou a posição de *C. glabrata* atrás de *C. guilliermondii* dentre os isolados menos frequentes.

A posição relativa de *C. glabrata*, como agente de candidemia, varia consideravelmente em diferentes regiões geográficas. Recentemente, foi publicado um grande estudo realizado em hospitais da Coreia do Sul em que *C. glabrata* foi responsável por taxas de 26,5% entre as espécies não-*C. albicans* e não-*C. tropicalis* (Jung *et al.*, 2010). Dentre todas as espécies é descrita em taxas de 20% nos EUA, 15% na Europa, 10% na Ásia e 5% na

América Latina, (Pfaller *et al.*, 2004). Gudlaugsson *et al.* (2003) em investigação de 5 anos (1997-2001), desenvolvida em um hospital norte-americano, verificaram que *C. glabrata* foi o segundo agente de candidemia, com taxa de 17%, mas com frequência muito menor do que *C. albicans* (63%). De fato, a espécie situa-se em segundo lugar nos Estados Unidos (Pappas *et al.*, 2003; Magill *et al.*, 2006) e entre segundo e quarto lugar em países da Europa e Ásia (Abi-Said *et al.* 1997; Chryssanthou *et al.*, 2002; Diekema *et al.*, 2002; Cuenca-Estrella *et al.* 2002a; Hajjej *et al.*, 2004; Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2003; Tortorano *et al.*, 2004).

O estudo da sensibilidade de *C. glabrata*, segundo método AFST-EUCAST, permitiu observar valor de CIM₉₀ de 16µg/mL para fluconazol, sendo este superior ao descrito (CIM₉₀ de 8µg/mL) em trabalhos realizados na Espanha, como o de Almirante *et al.* (2005) que investigaram a sensibilidade de 31 isolados de *C. glabrata*. Esse valor é alto, mas o *breakpoint* europeu (CIM 8µg/mL) não é aplicável a esta espécie, o que não permite a classificação desta espécie em resistente. Note-se, no entanto, que os valores de fluconazol (16 µg/mL), enquadram-se no intervalo descrito para cepas de *C. glabrata* (2 µg/mL a 32µg/mL) no banco de dados europeu (www.eucast.org).

Por método do CLSI, isolados de *C. glabrata* apresentaram CIM₉₀ de 4µg/mL para fluconazol, valor que está dentro do intervalo de valores mais observados nos testes realizados com essa metodologia (CIM 0,5 µg/mL a 32 µg/mL) de acordo com dados disponíveis em www.eucast.org. Porcentagem de 5,2% (2/38 isolados) de resistência ao fluconazol foi verificada em *C. grabrata* neste estudo. Em países da Ásia a taxa de cepas resistentes situa-se entre 2% a 16% (Nakamura *et al.*, 2006; Ruan *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2010). Taxas maiores são encontradas em países da Europa (~40%) e Estados Unidos (~14%) (Hajjej *et al.*, 2004; Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2005; Tortorano *et al.*, 2004).

O sucesso terapêutico em infecções causadas por *Candida glabrata* depende da cepa relacionada à infecção, desde que, esta espécie apresenta resistência primária e, principalmente, secundária ao fluconazol.

Valores altos de CIM para fluconazol indicam risco de falha terapêutica com este medicamento. Há cepas sensíveis que respondem ao tratamento com a droga, mas que rapidamente, podem desenvolver resistência (Pfaller, 2005). De fato, é notória a grande capacidade de *C. glabrata* em adquirir resistência após exposição ao fluconazol. A resistência adquirida ocorre em *C. glabrata* por aumento na expressão de genes responsáveis por bombas de expulsão (tipo ABC) de drogas azólicas (Magill *et al.*, 2006).

Cepas de *C. glabrata*, resistentes ao fluconazol têm valores de CIM mais altos para voriconazol, do que aquelas sensíveis, prevendo, portanto a sua capacidade para desenvolver resistência cruzada. O mais novo triazol comercializado no Brasil, voriconazol, pode se tornar, portanto, inadequado para tratar casos com cepas de *C. glabrata* (Pappas *et al.*, 2003; Cuenca-Estrella & Rodriguez-Tudela 2002; Pfaller *et al.* 2004; Gadea & Cuenca-Estrella 2004; Marchetti *et al.* 2004; Yang *et al.* 2004).

Para voriconazol, pela metodologia AFST-EUCAST, os isolados de *C. glabrata* deste estudo (CIM₅₀ 0,12µg/mL e CIM₉₀ 0,5µg/mL) foram menos sensíveis do que aqueles estudados por Matsumoto *et al.* (2007), mas com perfil de sensibilidade idêntico (CIM₉₀ 0,5 µg/mL) ao observado por Cuenca-Estrella *et al.* (2005) e dentro do intervalo mais relatado para esta espécie (CIM 0,08 µg/mL e 1 µg/mL). O *breakpoint* europeu não permite classificação de *C. glabrata*, mas valores altos (0,5µg/mL) para voriconazol foram verificados, assim como frente a fluzonazol CIM de (16 µg/mL).

Ainda avaliando *C. glabrata* frente a voriconazol foi encontrado um isolado (1394 SP3/07) resistente, por CLSI. Esse isolado foi também resistente para fluconazol e itraconazol, chamando a atenção da baixa eficácia que pode ter a classe dos triazóis frente a determinados isolados clínicos. No conjunto dos isolados o valor de CIM₅₀ foi 0,06µg/mL e de CIM₉₀ foi de 0,12µg/mL. O mesmo valor de CIM₅₀ foi observado por Colombo *et al.* (2006) no Brasil e Jung *et al.* (2010) na Coréia do Sul, porém valores mais baixos foram publicados (0,125 µg/mL) por Matta *et al.* (2007). O valor de CIM₉₀ foi semelhante ao relatado por outros autores tanto no Brasil (Colombo *et al.*; 2006; Matta *et al.*, 2007) e Jung *et al.*, 2010.

Para itraconazol frente a *C. glabrata* desperta atenção a taxa alta de isolados classificados como S-DD (26,3%), sendo baixa a ocorrência de isolados resistentes (5,8%). Da Matta *et al.* (2007) verificou taxas maiores de resistência (15,9%) e maior (50%) de cepas S-DD. A taxa de resistência é menor que aquela observada (33,3%) na Escócia (ODDS *et al.*, 2007). A mais alta taxa de resistência (88%) de *C. glabrata* (n=25) frente ao itraconazol foi publicada no estudo brasileiro de Bruder-Nascimento *et al.* (2010). Ainda segundo metodologia CLSI, o valor de CIM₅₀ (0,12µg/mL) foi próximo e menor do que o descrito (CIM₅₀ 0,25 µg/mL) por Colombo *et al.* (2006) e Matta *et al.* (2007). O valor observado de CIM₉₀ (0,5µg/mL), metodologia AFST-EUCAST, confere com o descrito por Cuenca-Estrella *et al.* (2005) e é equivalente (1µg/mL) ao encontrado para 11 isolados incluídos no estudo brasileiro de Matsumoto *et al.* (2007).

Para anfotericina B frente a *C. glabrata*, por método AFST-EUCAST o valor (CIM₉₀ 1µg/mL) foi superior ao encontrado (0,25µg/mL) por Cuenca-Estrella *et al.* (2005) e Almirante *et al.* (2005). Já, os valores de CIM₅₀ (0,5µg/mL) e CIM₉₀ (1µg/mL), calculados para testes por CLSI, foram iguais aos dados encontrados no trabalho brasileiro de Colombo *et al.* (2006) e ao estudo escocês Odds *et al.* (2007) contemplando 66 isolados de *C. glabrata*. Todos os valores de CIM descritos classificam os isolados de *C. glabrata* como sensível à anfotericina B, em concordância com investigações anteriores (Pfaller *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2010).

Candida krusei representou 4% dos agentes estudados nesta dissertação e foi superior ao valor de Colombo *et al.* (2006) com taxa de 3%. Essa espécie foi descrita em taxa de 5,5% do total de espécies menos freqüentes no extenso Programa Sentry (Pfaller & Diekema, 2002). Por sua prevalência, *Candida krusei* não é um agente importante de candidemia, desde que é responsável por apenas 2% dessas infecções nos Estados Unidos, 1% na Coréia do Sul e taxas ainda baixas e bastante variadas (0 a 11%) no Brasil (Gudlaugsson *et al.*, 2003; Ruiz *et al.*, 2005; Regonaschi, 2006; da Matta *et al.*, 2007; Hinrichsen *et al.*, 2008; Jung *et al.* 2010).

Por outro lado, a resistência intrínseca ao fluconazol, reconhecida em *C. krusei*, ressalta a importância de seu estudo. O fato de ser resistente não permite sua classificação pelos *breakpoints* estabelecidos para essa droga. Para itraconazol os isolados de *C. krusei* (CIM₉₀ de 0,25µg/mL) apresentaram a mesma sensibilidade observada por Cuenca-Estrella *et al.* (2005). Porém, por método CLSI os isolados de *C. krusei* foram classificados em S-DD em sua maioria (57%), dado semelhante ao de Matta *et al.* (2007) que descreveu taxa semelhante (66,5%).

Em relação a voriconazol nos testes por AFST-EUCAST, foram encontrados valores altos (CIM \geq 0,25 µg/mL) para 4 isolados de *C. krusei*, não sendo, porém possível a classificação desta espécie por esta metodologia. Todos os valores de CIM ficaram dentro do intervalo (CIM 0,016µg/mL a 1 µg/mL) publicado para a maioria dos isolados dessa espécie (www.eucast.org). Nos testes por CLSI os valores também estão dentro daqueles mais observados (0,032 µg/mL a 1 µg/mL).

Candida krusei frente à anfotericina B o valor de CIM₉₀ 1µg/mL foi um pouco superior ao descrito (CIM₉₀ 0,5µg/mL) por autores espanhóis que utilizaram a metodologia AFST-EUCAST. Por CLSI (CIM₉₀ 0,5 µg/mL) foi inferior ao verificado (1µg/mL) por Colombo *et al.* (2003). Todos os isolados de *C. krusei* foram sensíveis, independente do método AFST-EUCAST ou CLSI, confirmando achados prévios descritos em literatura nacional e internacional (Matta *et al.*, 2007; Ruiz *et al.*, 2006; Messer *et al.*, 2009; Pfaller & Diekema, 2002; Cuenca-Estrella *et al.*, 2005; Almirante *et al.*, 2005).

A incidência global de candidemia por *C. guilliermondii* parece ser baixa, mesmo em pacientes com câncer; a distribuição, no entanto, não é homogênea e as mais altas frequências são observadas em centros hematológicos. A incidência dessas infecções na Ásia e Europa é ligeiramente superior à descrita na América do Norte. Girmenia *et al.* (2006) analisaram 21 isolados de leveduras isoladas de sangue, no período de 1983 a 2005, na Itália e *C. guilliermondii* representava 11,7% do total de isolados de *Candida*, taxa inferior apenas à de *C. parapsilosis*, *C. albicans* e *C. tropicalis*.

A frequência de *Candida guilliermondii*, neste estudo foi baixa (0,6%) em relação a outras espécies analisadas e assemelha-se muito a de Jung *et al.* (2010) da Coréia do Sul e a de países de outros continentes do que aqueles do Brasil. Colombo *et al.* (2006) encontraram 6% de *C. guilliermondii* entre as espécies não-*C. albicans* e não-*C. tropicalis*, e relatado posteriormente por Matta *et al.* (2007) taxa de 8,2%. No entanto, a maioria dos outros autores brasileiros relata taxas relativas maiores como 10% (Hinrichsen *et al.*, 2008), 12,2% (Ruiz *et al.* 2005), 13% (Pereira *et al.*, 2010), 21% (Medrano *et al.*, 2006) e 26,5% (Passos *et al.*, 2010). Há de se ressaltar que o número de amostras de Matta *et al.* (2007) é muito mais expressivo do que os demais autores brasileiros e, possivelmente, reflita melhor a distribuição dessa espécie.

Ainda que menos freqüente, a descrição de *C. guilliermondii* como agente de candidemia em unidades hospitalares do estado de São Paulo tem relevância como dado a ser comparado com estudos futuros, de modo a permitir análise de tendências, tanto geográfica quanto temporal, em nosso país. Em estudos internacionais essa espécie é apontada como agente com potencial significativo de resistência ao fluconazol e anfotericina B, enfatizando esses estudos (Yagupsky *et al.*, 1991; Vazquez *et al.*, 1995; Krcmery *et al.*, 1999; Tietz *et al.*, 1999; Mardani *et al.*, 2000; Kovacicova *et al.*, 2001). Poucos relatam o contrário enfatizando apenas a maior resistência dessa espécie ao itraconazol (Girmenia *et al.*, 2006).

Candida guilliermondii apresentou valores limítrofes de sensibilidade tanto para fluconazol (CIM 4µg/mL), quanto para voriconazol (CIM 0,12 µg/mL) na interpretação por AFST-EUCAST. Para itraconazol o valor (CIM 0,25µg/mL) classifica o isolado como S-DD. Matta *et al.*, 2007 também descreveram 15 isolados S-DD para itraconazol. Girmenia *et al.* (2006) verificaram altos valores de CIM (4ug/mL) para voriconazol e relataram 5% de resistência a voriconazol. Comparando este dado com aqueles que englobam grande número de amostras, verifica-se que para fluconazol, no maior estudo brasileiro, Matta *et al.* (2007) encontraram apenas um de 30

(3,3%) isolados, classificados como sensível dose-dependente (S-DD) e nenhum resistente. Para itraconazol não foram encontrados isolados resistentes em desacordo com achados de Girmenia *et al.* (2006) que descreveram cepas resistentes em taxa de 24% entre 21 analisadas, com CIMs atingindo valores acima de 16 µg/mL. Pfaller *et al.* (2003,2004) avaliaram a susceptibilidade *in vitro* de isolados sanguíneos de *Candida guilliermondii*. A maioria deles (85% a 100%) foi sensível fluconazol e voriconazol, mas sensibilidade a itraconazol foi menos comum (10%). De outro modo, para anfotericina B CIM foi baixo (0,5µg/mL) confirmando estudos anteriores (Matta *et al.*, 2007; Girmenia *et al.*, 2006;; Pfaller *et al.* 2003, 2004).

Os dados desta dissertação apontam para uma espécie, *C. guilliermondii* que merece ser bem identificada e analisada quanto ao seu perfil de suscetibilidade, desde que, mostrou ser menos sensível a distintos fármacos azólicos. Esse achado ressalta o potencial de alguns isolados apresentarem resistência cruzada entre medicamentos da mesma classe farmacológica. Este fato é, ainda mais preocupante, visto que *C. guilliermondii* parece ser resistente à caspofungina, uma equinocandina da mais nova classe de antifúngicos (Pfaller *et al.* 2003, 2004; Girmenia *et al.*, 2006). Essa informação é importante na área clínica para controle das infecções invasivas por *C. guilliermondii*.

Uma espécie rara de candidemia, *Candida kefyr*, também foi descrita como agente de candidemia na Coréia do Sul em estudo recente de Jung *et al.* (2010) e na Alemanha (Zepelin *et. al.*, 2007). Pela escassez de dados de sua sensibilidade, seria muito interessante ter acesso a essa informação. No entanto, essa informação não está disponível no estudo da Coréia do Sul e impossibilita análise comparativa com nossos achados. No estudo alemão, os autores chamam a atenção para um alto valor de CIM de anfotericina B (4µg/mL) para um de nove isolados sanguíneos. Na carência de outros estudos com isolados sanguíneos de *C. kefyr*, a sensibilidade

dessa espécie pode ser comparada a isolados de outras fontes, como no estudo espanhol de Cuenca-Estrella *et al.* (2006) os valores de anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol, por método AFST-EUCAST, foram respectivamente, de: CIM₅₀ (0,12 µg/mL) e CIM₉₀ (0,25µg/mL), CIM₅₀ (0,025µg/mL) e CIM₉₀ (1µg/mL), CIM₅₀ (0,03µg/mL) e CIM₉₀ (0,03µg/mL) e CIM₅₀ (0,02µg/mL) e CIM₉₀ (0,02µg/mL). Comparando com resultados desta dissertação, verifica-se valores equivalentes para os fármacos azólicos. Em relação à anfotericina B (CIM 1µg/mL), por AFST-EUCAST e por CLSI.

Candida famata e *C. lusitaniae* representaram apenas 0,6% das espécies avaliadas, mas dada a raridade, ou mesmo ausência, de seu encontro em outros estudos, este achado é importante e enfatiza o papel do laboratório nas investigações epidemiológicas, com vistas a monitorar a ocorrência de agentes emergentes.

Dentre os poucos estudos que descrevem *Candida famata* como agente de candidemia, destaca-se o realizado no Japão por Takakura *et al.* (2004) e de Jung *et al.* (2010) que observaram taxas dessa espécie, respectivamente 1,6% e 1%, entre isolados não-*C. albicans* e não-*C. tropicalis*. Caggiano *et al.* (2007) também descreveram esse agente de candidemia na Itália, com porcentagem relativa equivalente a desses autores (1,6%). Cheng *et al.* (2004) identificaram *Candida famata* em taxa relativa maior (2,8%). Além desses estudos, um grande trabalho realizado na Austrália resultou no encontro de três casos (3/1095; 0,3%) de candidemia por *C. famata*, reforçando a necessidade de acompanhar o aparecimento de novos agentes etiológicos invasivos (Chen *et al.*, 1996).

A alta sensibilidade de *C. famata* aos quatro antifúngicos avaliados neste estudo, confere com dados prévios disponíveis na literatura. No site de EUCAST há informação sobre intervalo de CIM de voriconazol frente a 33 isolados de *C. famata* (CIM 0,016µg/mL a CIM 8µg/mL) e frente a 46 isolados frente a fluconazol (CIM 0,125µg/mL a CIM 64 µg/mL) para testes realizados por AFST-EUCAST, pressupondo que há isolados pouco sensíveis a estas drogas. Cheng *et al.* (2004) encontraram CIM₅₀ de 4 µg/mL para fluconazol e 0,5 µg/mL para anfotericina B , por método CLSI,

reforçando a informação sobre a eficácia destas drogas nessa espécie. No site de EUCAST a informação de 16 isolados avaliados frente a voriconazol (CIM 0,08µg/mL a CIM 0,25 µg/mL) e fluconazol (CIM 0,5µg/mL a CIM 8 µg/mL) por método CLSI (www.eucast.org) indicando alta sensibilidade por esta metodologia, provavelmente, pela questão dos distintos *breakpoints*.

Em estudo de Passos *et al.* (2010) foi encontrada maior frequência relativa (6,5%) de *C. lusitaniae* do que a encontrada neste estudo (0,6%) e no de Jung *et al.* (2010). *Candida lusitaniae* apresentou alta sensibilidade às drogas azólicas empregadas neste estudo, fato que está de acordo com dados publicados na literatura consultada (Pfaller *et al.*, 1994; Pfaller & Diekema, 2002). Importante ressaltar que essa espécie não apresentou resistência a anfotericina B, como descrita em alguns estudos anteriores internacionais. Sua habilidade para desenvolver resistência à anfotericina B, mais rapidamente do que outras espécies de *Candida* foi previamente comprovada (Fothergill *et al.*, 2006).

Pelo site de EUCAST, os valores para *C. lusitaniae* situam-se entre CIM 0,125 µg/mL e CIM 1 µg/mL para fluconazol, porém com alguns isolados acima de 8µg/mL, e entre CIM 0,008µg/mL e CIM 0,064µg/mL frente a voriconazol, pelo método AFST-EUCAST. Para testes com método CLSI os valores para fluconazol ficam entre CIM 0,125µg/mL e CIM 2µg/mL, com alguns até 64 µg/mL e entre CIM 0,004µg/mL e CIM 0,064µg/mL frente a voriconazol, informando alta sensibilidade dessa espécie aos azóis (www.eucast.org).

Pichia anomala (*Candida pelliculosa*) é considerada um agente raro de fungemia, e sua taxa de frequência neste estudo foi de 0,6%. Esta espécie foi anteriormente descrita em outros estudos nacionais, como agente de candidemia em pacientes imunocomprometidos e neonatos internados em UTI (Godoy *et al.*, 2003; Paula *et al.*, 2006; da Matta *et al.*, 2007; Caggiano *et al.*, 2007). Chama a atenção o estudo de Colombo *et al.* (2006) que mostra taxa alta (16%) dessa espécie entre aqueles agentes menos frequentes em candidemia. Em outros países, *P. anomala* tem também ocorrência esporádica como agente de infecção invasiva (Odds *et*

al., 2007; Kersun *et al.*, 2008), sempre em baixa frequência relativa (3,3%) (Caggiano *et al.*, 2007).

Intervalos de CIM para voriconazol (0,032µg/mL a 0,5µg/mL) e fluconazol (1µg/mL a 8µg/mL), segundo metodologia CLSI disponíveis em www.eucast.org, indicam que o único isolado de *P. anomala* deste estudo encontra-se dentro desses parâmetros. Os resultados revelam baixos valores de CIM para todos os fármacos avaliados, conforme enfatizado por outros autores brasileiros (Matta *et al.*, 2007). O estudo, realizado com 58 amostras de *P. anomala*, não reporta nenhuma resistente; todavia, foram encontrados valores altos de CIM (1µg/mL) para itraconazol foi alto (Matta *et al.*, 2007)^b. Interessante notar que Cuenca-Estrella *et al.* (2006), também verificaram CIMs altos, não apenas de itraconazol, mas também fluconazol e voriconazol para cepas de *P. anomala* de diversas origens clínicas. Para anfotericina B os valores de CIM são sempre baixos, conforme resultados de vários estudos (Cuenca-Estrella *et al.*, 2006; Matta *et al.*, 2007).

As espécies descritas neste estudo, ainda que poucos frequentes, incluem espécies como *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. lusitaniae* as quais merecem atenção, pois têm alto potencial à resistência adquirida, ou intrínseca, às drogas azólicas e, ainda, podem apresentar menor sensibilidade à anfotericina B. Agentes considerados emergentes, raramente, associados à candidemia e com perfil de sensibilidade ainda pouco conhecido, tal como: *C. famata* e *Pichia anomala* (*C. pelliculosa*) foram descritos neste estudo.

A determinação acurada das espécies, endêmicas e epidêmicas, e a investigação de fenótipos de resistência poderá servir para monitoramento de tendências nas unidades hospitalares avaliadas. Este estudo soma-se a outros para auxiliar na escolha do melhor tratamento, reduzindo a possibilidade de falha terapêutica, ou na alteração da estratégia terapêutica, aumentando a dose ou trocando o antifúngico, ou ainda, induzindo o uso de terapia combinada. Além dessa aplicação direcionada a um caso em particular, a compilação dos dados, seguida de análise temporal

e espacial, serve para programas de vigilância de resistência a antimicrobianos e tratamento empírico.

A alta sensibilidade das espécies outras que *C. albicans* e *C. tropicalis*, apontada nesta pesquisa constitui um dado inédito para muitos hospitais e deverá contribuir e estimular a consolidação de um banco de informações nacionais para manejo empírico e controle das candidemias, em particular no Estado de São Paulo. Ainda, os resultados deste estudo poderão ser subsídios para análise crítica de procedimentos invasivos e política de medicação antifúngica dentro das Comissões de Controle de Infecção Hospitalar de cada Unidade, de acordo com a distribuição das espécies e suas características epidemiológicas e fenótipos de resistência. A análise dos resultados deste estudo poderá ser também um instrumento de suporte a futuras investigações que avaliem a correlação entre a resistência *in vitro* e evolução clínica dos pacientes com infecção de corrente sanguínea por leveduras.

7. CONCLUSÕES

1. *Candida parapsilosis* foi a espécie mais freqüente, seguida de *C. glabrata* e *C. krusei*, totalizando 97% dentre aquelas estudadas.
2. Fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B mostraram alta eficácia contra todos os agentes de candidemia.
3. Anfotericina B foi a droga mais ativa, não sendo encontrado nenhum fenótipo de resistência à droga, seguida de fluconazol e voriconazol; a droga menos eficaz foi itraconazol, particularmente para isolados de *C. glabrata*.
4. Este estudo contribuiu para a confirmação da alta sensibilidade ($\geq 98,3\%$) de isolados de *Candida parapsilosis* frente a fluconazol, voriconazol, itraconazol e anfotericina B.
5. *Candida glabrata* não apresentou alta taxa de resistência (~6%) a fluconazol, mas número considerável de isolados (33%) teve sensibilidade dependente da dose ao itraconazol. Para voriconazol a resistência foi baixa (~3%) e sem boa correlação.
6. *Candida krusei*, espécie com reconhecida resistência intrínseca ao fluconazol, apresentou fato significativo que foi o encontro freqüente (57%) de cepas com valores altos ($>0,25\mu\text{g/mL}$) ao voriconazol, dado raramente citado na literatura mas que atenta para a ocorrência de resistência cruzada entre os fármacos de mesma classe.
7. Espécies mais raras, como *Pichia anomala*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. famata* e *C. lusitaniae* foram identificadas como agentes de candidemia, valorizando a busca, identificação acurada e determinação exata do perfil de sensibilidade desses isolados menos freqüentes.

- 8.** Os métodos europeu (AFST-EUCAST) e norteamericano (CLSI) produziram valores de CIM equivalentes. Para os 166 isolados foi observada alta concordância (>98%) dos métodos para testes com fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B. Do mesmo modo, a correlação foi maior para fluconazol e menor para anfotericina B.
- 9.** Resistência cruzada entre azóis foi encontrada neste estudo em cepas de *C. glabrata* (2,8%) e *C. parapsilosis* (0,8%) e, ainda que em baixas porcentagens, alertam para a ocorrência desse grave fenômeno que pode ter implicação clínica. Futuros estudos podem confirmar essa hipótese.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, Raad I, Pinzcowski H, Vartivarian S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. Clin Infect Dis. 1997; 24(6): 1122 - 8.

Almirante B, Rodríguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M et al. Epidemiology and Predictors of Mortality in Cases of *Candida* Bloodstream Infection: Results from Population-Based Surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. J. Of clinical Microbiology. 2005 Apr. 1829-1835.

Arendrup MC, Fuursted K, Gahrn-Hansen B, Jensen IM, Knudsen JD, Lundgren B et al. Seminal Surveillance of Fungemia in Denmark: Notably High Rates of Fungemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. J. Clin. Microbiol. 2005. 43:4434-4440.

Bishop JA, Chase N, Lee R, Kurtzman CP, Merz WG. Production of white colonies on CHROMagar *Candida* medium by members of the *Candida glabrata* clade and other species with overlapping phenotypic traits. J Clin Microbiol. 2008 Oct;46(10):3498-500.

Brito LR, Guimaraes T, Nucci M, Rosas RC, Paula Almeida L, Da Matta DA et al. Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *Candida parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. Med Mycology. 2006; 44(3):261-6.

Bruder-Nascimento A, Camargo CH, Sugizaki MF, Sadatsune T, Montelli AC, Mondelli AL, et al. Species distribution and susceptibility profile of *Candida* species in a Brazilian public tertiary hospital. Biomed Central, 2010. 3:1.

Caggiano G, Latta R, Laneve A, Manca F, Montagna MT. Observational study on candidaemia at a university hospital in southern Italy from 1998 to 2004. Mycoses 51, 2007; 2:123 – 128.

Cawley MJ, Braxton GR, Haith LR, Reilly KJ, Guilday RE, Patton ML. *Trichosporon beigelii* infection: experience in a regional burn center. *Burns*. 2000;26:483-486.

Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Vigilância epidemiológica das infecções hospitalares no estado de São Paulo, dados 2004 – 2008. Disponível em: www.cve.saude.sp.gov.br

Chang MR, Correia FP, Costa LC, Xavier PC, Palhares DB, Taira DL, et al. *Candida* bloodstream infection: data from a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev, Inst, Med, trop. S. Paulo*. 2008; 50 (5): 265-268.

Chen SCA, Brownlee AG, Sorrell TC, Ruma P, Ellis DH, Pfeiffer T, et al. Identification by random amplification of polymorphic DNA of a common molecular type of *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* in patients with AIDS or other immunosuppressive conditions. *JID* 1996; 173: 754-758.

Cheng MF, Yu DW, Tang RB, Fan YH, Yang YL, Hsieh KS et al. Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species causing candidemia from 1996 to 1999. *Diagn. Microb. and Infec. Dis*. 2004; 33-37.

Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M. Comparison of the antifungal susceptibility testing subcommittee of the European committee on antibiotic susceptibility testing proposed standard and the E-test with the NCCLS broth microdilution method for voriconazole and Caspofungin susceptibility testing of yeast species. *J Clin Microbiol*. 2002 Oct; 40(10): 3841- 4.

Clinical Laboratory standards Institute (CLSI), documento M27-A3, 2008.

Collin B, Clancy CJ, Nguyen MH. Antifungal resistance in non-albicans *Candida* species. *Drug Resist Updat*. 1999 Feb; 2(1): 9-14.

Colombo AL, Zatagawa Z, Valdetaro F, Branchini ML, Kussano EJ, Nucci M. Susceptibility profile of 200 bloodstream isolates of *Candida spp.* collected from Brazilian tertiary care hospitals. *Med Micol.* 2003;41(3): 235 - 9.

Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouer SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA *et al.* Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol.* 2006 ; 44(8): 2816-23.

Cuenca-Estrella M, Lee-Yang W, Ciblak MA, Arthington-Skaggs BA, Mellado E, Warnock DW *et al.* Comparative evaluation of NCCLS M27 A and EUCAST broth microdilution procedures for antifungal susceptibility testing of *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002a; 46(11): 3644 - 7.

Cuenca-Estrella M, Rodero L, Garcia-Effron G, Rodriguez-Tudela JL. Antifungal susceptibilities of *Candida spp.* isolated from blood in Spain and Argentina, 1996 - 1999. *J Antimicrob Chemother.* 2002b Jun; 49(6): 981 - 7.

Cuenca-Estrella M, Rodriguez D, Almirante B, Morgan J, Planes AM, Almela M *et al.* In vitro susceptibilities of bloodstream isolates of *Candida* species to six antifungal agents: results from a population-based active surveillance programme, Barcelona, Spain, 2002-2003. *J of Antimicrobial Chemotherapy.* 2005; 55: 194-199.

Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Mellado E, Buitrago MJ, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 Spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(3):917-21.

Cuesta I, Bielza C, Larrañaga P, Cuenca-Estrella M, Laguna F, Rodriguez-Pardo D, *et al.* Data mining validation of fluconazole breakpoints established

by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. July 2009, p. 2949-2954.

Diekema DJ, Messer SA, Brueggemann AB, Coffman SL, Doern GV, Herwaldt LA *et al.* Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. J Clin Microbiol. 2002a ; 40(4):1298 – 302.

Diekema DJ, Pfaller MA, Jones RN. Age-related trend in pathogen frequency and microbial susceptibility of bloodstream isolates in North America: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-2000. Int J Antimicrob Agents. 2002b ; 20(6): 412-8.

Donelli G. Vascular catheter-related infection and sepsis. Surg Infect. (Larchmt) 2006; 7(2):25-7

Espinel-Ingroff A, Canton E, Peman J, Rinaldi MG, Fothergill AW. Comparison of 24-hour and 48-hour voriconazole MICs as determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution method (M27-A3 document) in three laboratories: results obtained with 2,162 clinical isolates of *Candida* spp. and other yeasts. J Clin Microbiol. 2009; 47(9):2766-71.

EUCAST-European Committee on Antibiotic Susceptibility. Definitive Document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. Clin Microbiol Infect. 2008. 14:398-405.

Falk R, Wolf DG, Shapiro M, Polacheck I. Multidrug-resistant *Trichosporon asahii* isolates are susceptible to voriconazole. J.Clin.Microbiol. 41:911, 2003.

Ferreira AW, Ávila SLM. Infecções fungicas in: Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. 2 edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan SA; 2002.

Fothergill AW, Rinaldi MG, Sutton DA. Antifungal Susceptibility Testing. Infectious Disease Clinics of North America 20 (2006) 699 – 709.

Gadea I, Cuenca-Estrella M; Infeccion Fungica Invasora (MICOMED); Estudio de la Infeccion en el transplante (GESITRA); Sociedade Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clínica (SIMC). Guidelines for fungal diagnosis and antifungal sensitivity studies. Enfer Infecc Microbiol Clin. 2004; 22(1): 32 – 9.

Girmenia C, Martino P, De Bernardis F, Gentile G, Boccanera M, Monaco M *et al.* Rising incidence of *Candida parapsilosis* fungemia in patients with hematogenic malignancies: clinical aspects, predisposing factors, and differential pathogenicity of the causative strains. Clin Infect Dis. 1996 Sep; 23(3): 506-14.

Godoy P, Tiraboschi IN, Severo LC, Bustamante B, Calvo B, Almeida LP *et al.* Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida spp.* bloodstream isolates from Latin American Hospitals. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98: 401 – 5.

Goldani LZ, Mario PS. *Candida tropicalis* fungemia in a tertiary care hospital. J Infect. 2003. Apr; 46(3): 155-60.

Gonzalez GM, Elizondo M, Ayala J. Trends in species distribution and susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* collected in Monterrey, México, to seven antifungal agents: Results of a 3-year (2004 to 2007) surveillance study. J Clin Microbiol 2008, p. 2902 – 2905.

Goodman LS, Gilman A. As bases farmacológicas da terapêutica. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003.

Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S *et al.* Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis.* 2003; 37: 1172 – 7.

Guery BP, Arendrup MC, Auzinger G, Azoulay E, Sá MB, Johnson EM, *et al.* Management of invasive candidiasis and candidemia in adult non-neutropenic intensive care unit patients: Part I. Epidemiology and diagnosis. *Intensive Care Med.* 2009; 35:55-62.

Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, Lyon GM, Arthington-Skaggs BA, Mirza SA, *et al.* Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and *in vitro* susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population based active surveillance program. *J Clin Microbiol* 2004; 42:1519– 1527.

Hinrichsen SL, Falcão E, Vilella TA, Colombo AL, Nucci M, Moura L, *et al.* Candidemia in a tertiary hospital in northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008; 41(4):394-8.

Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, *et al.* Epidemiology and Outcomes of Candidemia in 2019 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy Alliance Registry. *Clinical Infectious Diseases*, 2009, 48:1695 – 703.

Jones RN, Masterton R. Determining the value of antimicrobial surveillance programs. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2001 Dec; 41(4):171-5.

Jung SI, Shin JH, Song JH, Peck KR, Lee K, Kim MN, *et al.* Multicenter surveillance of species distribution and antifungal susceptibilities of *Candida*

bloodstream isolates in South Korea. *Medical Mycology*. 2010; 48 (4): 669-674.

Kaufman D, Boyle R, Hazen KC, Patrie JT, Robinson M, Donowitz LG. Fluconazol prophylaxis against fungal colonization and infection in preterm infants. *N Engl J Med*. 2001; 345(23): 1660-6.

Kersun LS, Reilly AF, Ingram ME, Nicholaou MJ, McGowan KL. Antifungal susceptibility against yeasts isolated from pediatric oncology patients. *Medical Mycology*. 2008 Jun; 46:337-343.

Kovacicova G, Hanzen J, Pisarcikova M, Sejnova D, Horn J, Babela R, Svetlansky I, Lovaszova M, Gogova M, Krcmery V. Nosocomial fungemia due to amphotericin B-resistant *Candida* spp. in three pediatric patients after previous neurosurgery for brain tumors. *J Infect Chemother*. 2001;7(1):45-8.

Krcmery V, Grausova S, Mraz M, Pichnova E, Jurga L. *Candida guilliermondii* fungemia in cancer patients: Report of three cases. *J Infect Chemother*. 1999;5(1):58-59.

Kreger van-Rij (ed.) *The yeasts: a taxonomic study*. 3 edição. Amsterdam: Elsevier Science Publishers;1984.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. *Tratado de Micologia Médica*. S. Paulo: Sarvier; 2002.

Leroy O, Gangneux JP, Montravers P, Mira JP, Guin F, Sollet JP et AL. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: A multicenter, prospective, observational study in France (2005 – 2006). *Crit Care Med* 2009. Vol. 37, n. 5.

Lunardi LW, Aquino VR, Zimmerman RA, Goldani LZ. Epidemiology and outcome of *Rhodotorula* fungemia in a tertiary care hospital. *Clin Infect Dis*. 2006; 15;43(6):e60-3.

Magill SS, Shields C, Sears CL, Choti M, Merz WG. Triazole cross-resistance among *Candida* spp.: a case report, occurrence among bloodstream isolates, and implications for antifungal therapy. *J.Clin.Microbiol* 2006; 44(2): 529-535.

da Matta DA, Almeida LP, Machado Am, Azevedo AC, Kusano EJU, Travassos NF, et al. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis*. 2007; 57: 399-404.

Marchetti O, Bille J, Fluckiger U, Eggimann P, Rued C, Garbino J *et al*. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991- 2000. *Clin Infect Dis*. 2004 Feb; 38(3): 311 – 20.

Mardani M, Hanna HA, Girgawy E, Raad I. Nosocomial *Candida guilliermondii* fungemia in cancer patients. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2000 May;21(5):336-7.

Marr KA, Seidel K, White TC, Bowden RA. Candidemia in allogeneic blood and marrow transplant recipients: evolution of risk factors after the adoption of prophylactic fluconazole. *J Infect Dis*. 2000;181:309– 316.

Matsumoto FE, Dias LT, Melhem MSC, Szesz MW, Auler ME, Ruiz LS et al. Antifungal susceptibility of bloodstream yeasts isolated at a public children's hospital in Brazil: comparison of the Etest and the AFST-EUCAST microdilution method. *Can. J. Microbiol*. 2007; 53: 1300-1306.

Medrano DJ, Brilhante RSN, Cordeiro RA, Rocha MF, Rabenhorst SHB, Sidrim JJC. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2006 48(1):17-20.

Melhem, MSC. Resistência de *Candida* e outras leveduras a anfotericina B e fluconazol. In: Manual de Controle das Infecções Hospitalares. Coord. Levy CE. São Paulo: APECIH, 2004.

Mellado E, Cuenca-Estrella M, Tudela, LR. Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. Enf.Infect.Microbiol.Clin, 2002; 20 (10): 523-30.

Mendes-Giannini MJS, Melhem MSC. Infecções Fúngicas In: DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS PRINCIPAIS DOENÇAS INFECCIOSAS E AUTO-IMUNES. FERREIRA AE & ÁVILA SLM. 2^A Ed. Rio de Janeiro: GUANABARA-KOOGAN. 2001. p.333-403.

Messer SA, Moet GJ, Kirby JT, Jones RN. Activity of Contemporary Agents, Including the Novel Echinocandin Anidulafungin, Tested against *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Aspergillus* spp.: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006 to 2007). Journal of Clinical Microbiology. 2009: 1942 – 1946.

Mokaddas EM, Sweih NAA, Khan ZU. Species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* bloodstream isolates in Kuwait: a 10-year study. J. Med Microbiol. 2007; 56:255-259.

Nakamura T, Takahashi H. Epidemiological study of *Candida* infections in blood: susceptibilities of *Candida* spp. To antifungal agents, and clinical features associated with the candidemia. J Infect Chemother 2006; 12:132-8.

NCCLS-NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS(NCCLS) – Clinical and Laboratory Standards Intitute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts : approved standard – Secons edition. Document M 27-A2. 2002; 22(15).

Nolte FS, Parkinson T, Falconer DJ, Dix S, Williams J, Gilmore C, et al. Isolation and characterization of fluconazole – and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. Antimicrob Agents Chemother 1997; 44:196-9.

Odds FC, Hanson MF, Davidson AD, Jacobsen MD, Wright P, Whyte JA et al. One year prospective survey of *Candida* bloodstream infections in Scotland. J of Med. Microbiol. 2007; 56:1066-1075.

Ostrosky-Zeichner L. New approaches to the risk of *Candida* in the intensive care unit. Curr Opin Infect Dis. 2003;16:533-7.

Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W et al. Mycoses Study Group. A prospective observational study of candidemia: epidemiology therapy, and influences on mortality in hospitalized adults and pediatric patients. Clin Infect Dis. 2003; 37: 634 – 43.

Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr., Calandra TF, Edwards Jr., et al. Guías de práctica clínica para el manejo de la candidiasis: actualización del 2009, de la Infectious Diseases Society of America. In: Guías de tratamiento de la candidiasis. Clin Infect Dis. 2009:48.

Pasqualoto AC, Nedel WL, Machado TS, Severo LC. A 9-year study comparison risk factors and the outcome of paediatric and adults with nosocomial candidaemia. Mycopathologia 2005; 160(2): 111-6.

Passos XS, Costa CR, Araújo CR, Nascimento ES, Souza LKH, Fernandes OFL et al. Epidemiology of candidemia and antifungal susceptibility patterns of *Candida* spp in a Brazilian tertiary care hospital. 2010. *In press*.

Patel M, Kunz DF, Tivedi MV, Jones MG, Moser SA, Baddley JW. Initial management of candidemia at an academic medical center: evaluation of the IDSA guidelines. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2005; 52:29-34.

Paula CR, Krebs VLJ, Auler AE, Ruiz LS, Matsumoto FE, Silva EH, et al. Nosocomial infection in newborns by *Pichia anomala* in a Brazilian intensive care unit. *Med.Mycol*. 2006; 44: 479-84.

Perea S, Patterson T. Antifungal resistance in pathogenic fungi. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 1073-80.

Pereira GH, Müller PR, Szeszs MW, Levin AS, Melhem MSC. Five-year evaluation of bloodstream yeast infection in a tertiary hospital: The predominance of non-*C. albicans Candida* species. *Medical Mycol*. 2010.

Perniola R, Faneschi ML, Manso E, Pizzolante M, Rizzo A, Sticchi Damiani A, et al. *Rhodotorula mucilaginosa* outbreak in neonatal intensive care unit: microbiological features, clinical presentation, and analysis of related variables. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2006;(3):193-6.

Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ. Strain delineation and antifungal susceptibilities of epidemiologically related and unrelated isolates of *Candida lusitanae*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1994 Nov;20(3):127-33.

Pfaller MA. Nosocomial candidiasis:emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clin Infect Dis*. 1996; 22:89-94.

Pfaller MA, Jones RN, Doren GV, Sader HS, Messer SA, Houston A, et al. Bloodstream infection due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial

surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000;44: 747 – 751.

Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Sader HS, Fluit AC, Hollis RJ *et al.* International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(9): 3254 – 9.

Pfaller MA, and Diekema DJ. Role of sentinel surveillance of candidemia: trends in species distribution and antifungal susceptibility. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40:3551–3557.

Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ. Geographic variation in the susceptibilities of invasive isolates of *Candida glabrata* to seven systemically active antifungal agents: a global assessment from the ARTEMIS Antifungal Surveillance Program Conducted in 2001 and 2002. *J. Clin Microbiol* 2004; 42: 3142-6.

Pfaller MA. Antifungal susceptibility testing methods. 2005 *Curr. Drug Targets* 6:929–943.

Pfaller MA, Diekema DJ, Mendez M, Kibbler C, Erzsebet P, Chang SC *et al.* *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44:3551–3556

Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Meis JF, Gould IM, *et al.* RESULTS FROM THE ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2005: an 8,5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* Species

and other yeast Species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. J.Clin.Microbiol., 2007a; 45: 1735-45.

Pfaller MA, Diekema JD. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. Clinical Microbiology Reviews, 2007b; 133 – 163.

Poikonen E, Lyytikäinen O, Anttila VJ, Ruutu P. Candidemia in Finland, 1995-1999. Emerg Infect Dis. 2003. 9:985-990.

Regonaschi TM. Caracterização de leveduras isoladas de pacientes hospitalizados. Dissertação de Mestrado. São Paulo:Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2006.

Rodriguez-Tudela JL, Almirante B, Rodrigues-Pardo D , Laguna F, Donnelly PJ, Mouton JW, et al. Correlation of the MIC and Dose/MIC ratio of fluconazole to the therapeutic response of patients with mucosal candidiasis and candidaemia. Agents Antimicrobiol. Chemother, 2007.

Rodriguez-Tudela JL, Alcazar-Fuoli L, Cuesta I, Alastruey-Izquierdo A, Monzon A, Mellado E, et al. Clinical relevance of resistance to antifungals. Int. J. Antimicrob. Agents. 2008 nov; 32 Suppl2:S111-3.

Ruan SY, Lee LN, Jerng JS, Yu CJ, Hsueh PR. *Candida glabrata* fungaemia in intensive care units. Clin Microbiol Infect 2008; 14:136-40.

Ruiz LS, Sugizaki MF, Montelli AC, Matsumoto FE, Pires MFC, Silva BCM et al. Fungemia by yeasts in Brazil: I and phenotypic study of strains isolated at the public Hospital, Botucatu, São Paulo. J Micol Medicales 2005; 15:13-21.

Sandven P. Epidemiology of Candidemia. Rev Iberoam Micol 2000 Sep; 17(3): 73 – 81.

Sidrim JJC, Moreira JLB. Fundamentos clínicos e laboratoriais da Micologia Médica. Rio de Janeiro:Editora Guanabara Koogan SA; 1999.

Silva V, Diaz MC, Febre N. Invasive fungal infections in Chile: a multicenter study of fungal prevalence and susceptibility during a 1-year period. *Med Mycol*. 2004a Aug, 42(4): 333-9.

Silva V, Alvarado D, Diaz MC. Antifungal susceptibility of 50 *Candida* isolates from invasive mycoses in Chile. *Med Mycol*. 2004b Jun; 42(3): 283-5.

Sobel JD. The Emergence of Non-albicans *Candida* Species as Causes of Invasive Candidiasis and Candidemia. *Curr Infect Dis*. 2006; 8:427-33.

Takakura S, Fujihara N, Saito T, Kudo T, Inuma Y, Ichiyama S and the Japan Invasive Mycosis Surveillance Study Group. National surveillance of species distribution in blood isolates of *Candida* species in Japan and their susceptibility to six antifungal agents including voriconazole e micafungin. *J of Antimicrob Chemotherapy*. 2004; 53: 283-289.

Tan TY, Tan AL, Tee NWS, Ng LSY. A retrospective analysis susceptibilities of *Candida* bloodstream isolates from Singapore hospitals. *Ann Acad Med Singapore*. 2008. 37:835-40.

Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(1):284-92.

Tietz HJ, Czaika V, Sterry W. Case report. Osteomyelitis caused by high resistant *Candida guilliermondii*. *Mycoses*. 1999;42(9-10):577-80

Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Kibbler CC, Faure O, et al. Epidemiology of candidemia in Europe: results of 28-month European

Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004;23:317-22.

Trabulsi LR, Alterthum, F. *Microbiologia*. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

Vazquez JA, Lundstrom T, Dembry L, Chandrasekar P, Boikov D, Parri MB, Zervos MJ. Invasive *Candida guilliermondii* infection: in vitro susceptibility studies and molecular analysis. *Bone Marrow Transplant*. 1995;16(6):849-53.

Voss A, Kluytmans JAJW, Koeleman JGM, Spanjaard L, Vandenbroucke-Grasuls CMJE, Verbrugh HA et al. Occurrence of yeast bloodstream infections between 1987 and 1995 in Five Dutch university hospitals. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 1996 December; 15:909-912.

Wingard JR. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin Infect Dis*. 1995 Jan;20(1):115-25.

Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24, 179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*. 2004. 39:309-317.

Yagupsky P, Dagan R, Chipman M, Goldschmied-Reouven A, Zmora E, Karplus M. Pseudooutbreak of *Candida guilliermondii* fungemia in a neonatal intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J*. 1991 Dec;10(12):928-32.

Yang YL, Ho YA, Cheng HH, Ho M, Lo HJ. Susceptibilities of *Candida* species to amphotericin B and fluconazole: the emergence of fluconazole resistance in *Candida tropicalis*. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2004 Jan; 5 (1): 60 – 4.

Zaotis TE, Argon J, Chu J, Berlin JA, Walsh TJ, Feudtner C.. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. Clin Infect Dis 2005;41:1232-1239.

Zepelin MBV, Kunz L, Rüchel R, Reichard U, Weig M, Grob U. Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. to six antifungal agents: results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August 2005. J of Antimicrob Chemotherapy. 2007; 60:424-428.



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
CTC / IAL



APROVAÇÃO DE PROJETO DE PESQUISA

Projeto: CCD-BM nº 27/2007

Prevalência e sensibilidade a antifúngicos de espécies de *Candida* pouco frequentes como agente de candidemia

Coordenação: Márcia de Souza Carvalho Melhem

Senhora Coordenadora,

Comunicamos que o projeto supra citado foi **cadastrado** no Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz, após aprovação quanto o mérito científico pela CCD-BM. Porém, este cadastro é *PROVISÓRIO* até que este Comitê receba a aprovação quanto a avaliação dos aspectos éticos pela Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL.


ADRIANA BUGNO
Presidente do CTC/IAL

São Paulo, 06 de março de 2008

Carapicuíba, 16 de julho de 2007
CEP N° 011/07

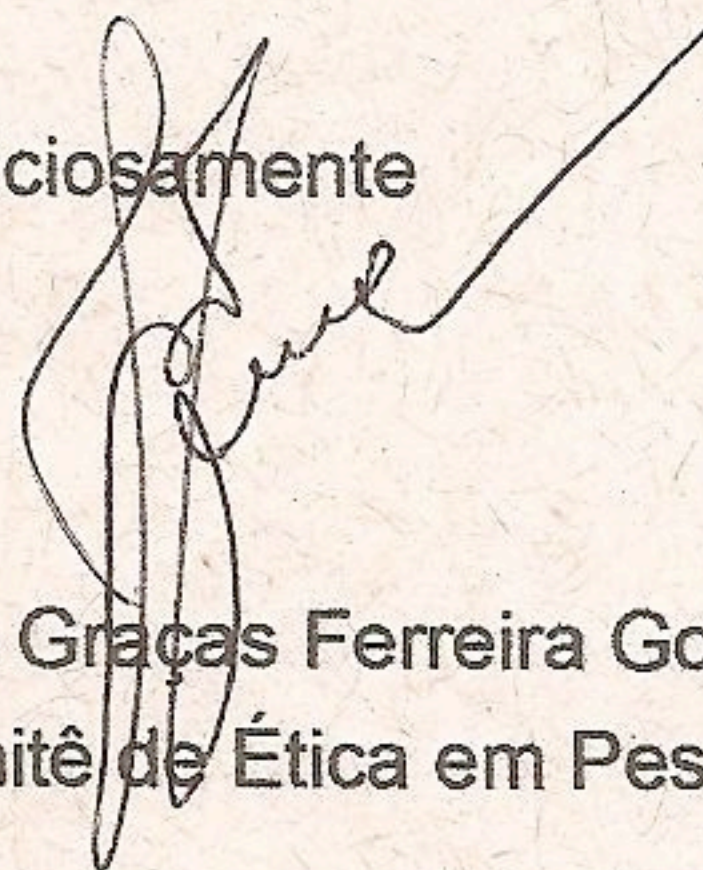
Ilma. Sra.

Pesquisadora: Marcia de Souza Carvalho Melhem
Disciplina/Departamento: Farmacêutica/Bioquímica

Ref.: Prevalência e sensibilidade a antifúngicos de espécies de *Candida* pouco frequentes como agente de candidemia.

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Sanatorinhos Carapicuíba, **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto acima, conforme Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Atenciosamente



Dra. Maria das Graças Ferreira Gonçalves
Vice-Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

APÊNDICE 1		EUCAST	CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST	CLSI
Número	Identificação	Fcz ug/mL	Fcz ug/mL	Itz ug/mL	Itz ug/mL	Vcz ug/mL	Vcz ug/mL	AmB ug/mL	AmB ug/mL
398 SP3/06	<i>C. famata</i>	0,5	0,5	0,12	0,06	0,015	0,015	0,5	0,5
1214 SP3/07	<i>C. glabrata</i>	4	4	0,5	0,5	0,25	0,06	0,5	0,5
1221 SP3/07	<i>C. glabrata</i>	2	2	0,25	0,25	0,5	0,06	0,5	0,5
1234 SP3/07	<i>C. glabrata</i>	2	4	0,12	0,25	0,5	0,12	0,5	1
01 SP3/06	<i>C. glabrata</i>	1	0,12	0,06	0,03	0,25	0,06	0,5	0,5
1120 SP3/07	<i>C. glabrata</i>	0,5	0,12	0,06	0,03	0,06	0,06	0,5	1
1133 SP3/07	<i>C. glabrata</i>	4	4	0,25	0,5	0,015	0,06	0,5	0,5
1161 SP3/07	<i>C. glabrata</i>	1	1	0,06	0,03	0,12	0,06	0,5	0,5
1167 SP3/07	<i>C. glabrata</i>	4	1	0,25	0,5	0,12	0,06	0,25	0,5
1177 SP3/07	<i>C. glabrata</i>	0,12	0,12	0,12	0,12	0,5	0,06	0,5	0,5
1191 SP3/07	<i>C. glabrata</i>	2	2	0,12	0,12	0,12	0,03	0,5	0,5
1192 SP3/07	<i>C. glabrata</i>	16	0,12	0,25	0,25	0,06	0,015	0,5	0,5
1245 SP3/07	<i>C. glabrata</i>	0,12	2	0,5	0,25	0,12	0,06	1	1
1454 SP3/07	<i>C. glabrata</i>	2	1	0,12	0,25	0,06	0,03	0,5	0,5
1460 SP3/07	<i>C. glabrata</i>	2	2	0,12	0,12	0,12	0,06	0,5	0,5
1465 SP3/07	<i>C. glabrata</i>	4	2	0,06	0,12	0,12	0,06	1	1
1467 SP3/07	<i>C. glabrata</i>	0,5	2	0,03	0,03	0,25	0,06	0,5	0,5
1473 SP3/07	<i>C. glabrata</i>	8	4	0,25	0,12	0,12	0,06	0,5	0,5
174 H/06	<i>C. glabrata</i>	16	4	0,5	0,5	0,12	0,12	0,5	0,25
435 H/06	<i>C. glabrata</i>	0,25	1	0,12	0,03	0,12	0,03	0,25	1
55 SP3/06	<i>C. glabrata</i>	2	1	0,12	0,015	0,06	0,06	0,5	1
80 SP3/06	<i>C. glabrata</i>	1	2	0,06	0,12	0,25	0,06	0,5	1
836 SP3/07	<i>C. glabrata</i>	8	1	0,5	0,12	0,5	0,015	0,5	1
1167 02-08	<i>C. glabrata</i>	4	0,25	0,25	0,03	0,06	0,015	0,25	1
1288 SP3/07	<i>C. glabrata</i>	1	0,5	0,03	0,03	0,015	0,03	0,5	0,5
825 SP3/07	<i>C. glabrata</i>	1	1	0,06	0,06	0,12	0,12	1	0,5
85415 1/8	<i>C. glabrata</i>	1	4	0,03	0,06	0,12	0,06	0,5	0,5
53526 1/8	<i>C. glabrata</i>	1	4	0,03	0,03	0,12	0,06	0,5	0,5
60694 1/8	<i>C. glabrata</i>	0,5	0,25	0,25	0,25	0,12	0,03	0,5	0,5
61019 1/8	<i>C. glabrata</i>	0,12	0,25	0,06	0,06	0,12	0,03	0,03	1
65167 1/8	<i>C. glabrata</i>	1	1	0,03	0,06	0,12	0,015	1	1
53525 1/8	<i>C. glabrata</i>	0,5	1	0,03	0,03	0,12	0,12	1	1

60694 02-08	<i>C. glabrata</i>	2	2	0,25	0,25	0,12	0,06	0,25	0,5
1394 SP3/07	<i>C. glabrata</i>	64	64	8	2	2	4	0,5	0,25
72267 1/8	<i>C. glabrata</i>	64	64	8	4	1	0,5	0,25	1
1372 SP3/07	<i>C. glabrata</i>	2	1	0,06	0,06	0,06	0,03	0,25	0,25
1388 SP3/07	<i>C. glabrata</i>	1	0,5	0,03	0,06	0,015	0,015	0,25	0,5
81 SP3/06	<i>C. glabrata</i>	0,25	2	0,12	0,12	0,12	0,06	1	1
1471 SP3/07	<i>C. glabrata</i>	16	32	0,25	0,25	0,12	0,12	1	1
1121 SP3/07	<i>C. guilliermondii</i>	4	4	0,25	0,25	0,12	0,12	0,25	0,5
78419 1/8	<i>C. kefyr</i>	1	0,5	0,06	0,06	0,015	0,015	1	1
1196-SP3/07	<i>C. krusei</i>			0,12	0,12	0,25	0,12	1	0,5
1213 SP3/07	<i>C. krusei</i>			0,12	0,12	0,25	0,25	1	0,5
1229 SP3/07	<i>C. krusei</i>			0,25	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5
1442 SP3/07	<i>C. krusei</i>			0,25	0,25	0,12	0,06	0,25	0,25
1477 SP3/07	<i>C. krusei</i>			0,06	0,25	0,12	0,06	1	0,5
1480 SP3/07	<i>C. krusei</i>			0,06	0,12	0,25	0,12	0,5	0,5
183 H/06	<i>C. krusei</i>			0,12	0,5	0,12	0,25	0,5	0,5
497/08	<i>C. lusitaniae</i>	0,5	0,25	0,03	0,06	0,015	0,015	0,25	0,5
1198 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,25	0,06	0,03	0,015	0,015	0,5	0,5
1212 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,5	0,03	0,03	0,015	0,015	0,5	1
1216 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	1	1	0,06	0,06	0,015	0,015	0,25	0,5
1220 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	1	2	0,03	0,06	0,25	0,06	0,5	0,5
1222 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	0,5	0,015	0,015	0,015	0,015	0,5	0,5
1012 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,12	0,015	0,015	0,015	0,015	1	1
1066 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,03	0,03	0,015	0,015	1	1
1098 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,5	0,06	0,015	0,015	0,015	0,5	1
1104 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,5	0,06	0,03	0,015	0,015	0,5	1
1109 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	0,12	0,25	0,03	0,03	0,015	0,015	1	1
1135 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,5	0,015	0,03	0,015	0,015	0,25	0,5
1138 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	0,5	0,12	0,12	0,06	0,12	0,5	0,5
1148 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,015	0,015	0,03	0,015	0,5	0,5
1151 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,12	0,015	0,015	0,015	0,015	0,5	0,5
116 SP3/06	<i>C. parapsilosis</i>	1	2	0,03	0,06	0,015	0,12	0,5	1
1173 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	0,25	0,015	0,015	0,015	0,015	0,5	0,5
1179 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,015	0,015	0,015	0,015	0,5	0,5

1180 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	1	0,03	0,06	0,03	0,015	0,25	0,5
1182 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,12	0,015	0,015	0,015	0,015	0,5	0,5
1183 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	1	1	0,015	0,03	0,03	0,015	0,5	0,5
1185 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,12	0,015	0,015	0,03	0,015	0,5	0,5
1190 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,12	0,015	0,015	0,015	0,015	0,25	0,5
1254 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	0,12	0,015	0,015	0,015	0,015	0,25	1
1252 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	2	0,5	0,06	0,06	0,03	0,015	0,06	1
1257 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,12	0,015	0,015	0,03	0,015	0,25	0,5
1289 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,5	0,06	0,03	0,015	0,015	0,12	1
1299 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,5	0,03	0,015	0,06	0,015	0,25	0,5
145 SP3/06	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,5	0,06	0,03	0,015	0,03	0,5	1
1464 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,015	0,25	0,015	0,015	1	1
1495 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,25	0,015	0,015	0,015	0,015	0,5	0,5
167 H/06	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,5	0,06	0,06	0,015	0,015	0,5	0,06
178 H/06	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,12	0,06	0,06	0,015	0,03	0,5	0,25
185 H/06	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,06	0,06	0,015	0,03	0,5	1
196 SP3/06 2	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,25	0,03	0,03	0,015	0,03	0,5	1
197 SP3/06 1	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,03	0,03	0,015	0,03	0,5	1
198 SP3/06 1	<i>C. parapsilosis</i>	2	1	0,06	0,06	0,015	0,06	0,5	1
199 SP3/06 2	<i>C. parapsilosis</i>	2	1	0,06	0,06	0,03	0,06	0,25	1
200 SP3/06 3	<i>C. parapsilosis</i>	1	1	0,06	0,12	0,015	0,015	0,5	1
260 SP3/06	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,06	0,03	0,015	0,015	0,25	1
261 H/05	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,5	0,03	0,06	0,015	0,015	0,12	0,25
262 SP3/06	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,5	0,03	0,03	0,015	0,015	0,5	1
268 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,25	0,06	0,03	0,015	0,015	1	0,25
296 SP3/06	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,06	0,015	0,015	0,015	0,5	1
297 SP3/06	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	1	0,06	0,06	0,015	0,03	0,5	1
301 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,5	0,06	0,06	0,015	0,015	0,5	0,25
321 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,03	0,03	0,015	0,015	0,5	0,25
408 H/06	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,12	0,06	0,03	0,015	0,015	0,5	1
424 H/06	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,25	0,03	0,03	0,015	0,015	0,5	1
428 H/06	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,03	0,03	0,015	0,015	0,5	1
535 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,5	0,03	0,03	0,015	0,015	0,5	0,25
538 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,12	0,06	0,015	0,015	0,015	0,5	0,25

539 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,5	0,12	0,03	0,03	0,015	0,5	0,5
70 SP3/06	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,25	0,03	0,03	0,015	0,015	0,25	1
76 SP3/06	<i>C. parapsilosis</i>	2	2	0,03	0,12	0,03	0,06	0,5	1
795 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	1	2	0,12	0,06	0,12	0,03	1	1
799 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,06	0,03	0,015	0,015	0,5	0,5
816 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	1	2	0,03	0,06	0,06	0,015	0,5	1
828 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,06	0,03	0,015	0,015	0,5	0,5
AFG 23/05	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,5	0,06	0,06	0,015	0,015	0,12	0,25
12012 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,03	0,015	0,015	0,015	0,12	1
11427 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,015	0,015	0,015	0,015	0,25	0,5
8871 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	2	1	0,06	0,03	0,12	0,015	0,25	0,5
7879 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	1	1	0,03	0,015	0,03	0,015	0,5	1
14760 02-08	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,25	0,015	0,015	0,015	0,015	0,25	0,5
12194 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,015	0,015	0,015	0,015	0,25	0,5
14759 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,5	0,015	0,015	0,015	0,015	0,25	1
9312 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	2	2	0,06	0,015	0,12	0,03	0,25	1
9311 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,06	0,015	0,015	0,015	0,25	0,5
11426 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,06	0,015	0,015	0,015	0,25	1
1213 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,015	0,03	0,015	0,015	0,25	0,5
3414 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	2	2	0,015	0,03	0,06	0,03	0,5	0,5
7167 I 01/08	<i>C. parapsilosis</i>	2	2	0,06	0,06	0,12	0,03	0,5	1
45663 3/8	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,06	0,03	0,015	0,015	0,5	1
20682 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,5	0,03	0,03	0,015	0,015	0,5	1
45583 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	2	2	0,06	0,06	0,06	0,03	0,5	1
20681 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	1	1	0,015	0,03	0,015	0,015	0,5	1
49504 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,015	0,03	0,015	0,015	0,5	1
45663 02-08	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,25	0,015	0,03	0,015	0,015	1	1
45663 01/08	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,12	0,03	0,03	0,015	0,015	0,5	1
14760 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,5	0,03	0,03	0,03	0,015	0,5	1
20685 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	1	0,015	0,06	0,015	0,015	0,5	1
9592 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	2	2	0,06	0,06	0,12	0,12	0,5	0,5
49504 02-08	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,5	0,015	0,06	0,015	0,015	0,5	1
49504 3/8	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,5	0,015	0,06	0,015	0,015	0,5	1
46094 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,25	0,03	0,12	0,015	0,015	0,5	1

22315 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	4	1	0,12	0,12	0,015	0,06	0,5	0,5
1436 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,06	0,06	0,015	0,015	0,25	0,5
82028 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,5	0,03	0,06	0,015	0,015	0,12	0,25
82029 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,5	0,03	0,06	0,015	0,015	0,12	0,25
78905 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,12	0,015	0,03	0,06	0,015	0,5	1
275 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	0,12	0,12	0,03	0,06	0,06	0,015	0,25	1
85417 02-08	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,5	0,03	0,06	0,015	0,015	0,25	0,5
87163 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,015	0,06	0,015	0,015	1	1
83438 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,25	0,03	0,03	0,015	0,015	0,5	1
83438 2-08	<i>C. parapsilosis</i>	1	1	0,03	0,03	0,015	0,06	0,5	0,5
85417 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	1	1	0,12	0,12	0,12	0,03	0,12	0,25
83441 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,5	0,03	0,03	0,015	0,015	1	1
83442 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	1	0,015	0,015	0,015	0,015	1	1
69275 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	0,12	0,25	0,06	0,06	0,12	0,03	0,06	0,06
53643 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,015	0,015	0,015	0,015	0,5	0,5
53536 02-08	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,5	0,015	0,015	0,015	0,015	0,5	0,5
71426 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,015	0,015	0,015	0,015	0,5	1
78910 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	0,5	0,03	0,03	0,015	0,015	1	1
83438 3/8	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,25	0,06	0,06	0,015	0,015	0,25	1
83436 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,03	0,06	0,015	0,015	0,25	0,5
53536 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,015	0,015	0,015	0,015	0,25	0,5
62866 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	2	2	0,06	0,06	0,06	0,03	1	1
64707 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	2	2	0,06	0,06	0,06	0,06	0,5	0,5
1468 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	16	32	0,12	0,25	0,25	0,25	0,5	1
1423 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,5	0,03	0,03	0,015	0,015	0,5	0,5
87163 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	0,12	0,06	0,03	0,015	0,015	0,5	0,5
1275 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	0,25	0,015	0,015	0,015	0,015	0,5	0,5
1389 SP3/07	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,12	0,03	0,03	0,015	0,015	0,5	0,5
77680 1/8	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,5	0,03	0,06	0,015	0,015	0,25	0,5
69275 02-08	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,03	0,03	0,015	0,015	0,5	0,5
69275 03-08	<i>C. parapsilosis</i>	1	0,25	0,03	0,06	0,015	0,015	0,25	0,5
412 H/06	<i>C. pelliculosa</i>	4	2	0,25	0,03	0,12	0,015	0,25	0,5