

LUCAS XAVIER BONFIETTI

Estudo retrospectivo de dez anos de candidemia em hospital terciário de Campo Grande, MS

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. Marcia de Souza Carvalho Melhem

São Paulo

2011

### FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Bonfietti, Lucas Xavier

Estudo retrospectivo de dez anos de candidemia em hospital terciário de Campo Grande, MS / Lucas Xavier Bonfietti - São Paulo, 2011.

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 de Souza Carvalho Melhem

1. Candidemia
2. Testes de sensibilidade
3. Anfotericina B
4. Resistência microbiana a medicamentos
5. Candida/genética

SES/CCD/CD-243/11

LUCAS XAVIER BONFIETTI

Estudo retrospectivo de dez anos de candidemia em hospital terciário de Campo Grande, MS

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. Marcia de Souza Carvalho Melhem

São Paulo

2011

**DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Rosângela e Salvador, que sempre estiveram muito presentes em todas as etapas de minha vida. Obrigado pelo incentivo, carinho, amor e confiança depositados em mim. Vocês sempre serão meus maiores exemplos. Amo vocês!

Ao meu irmão João Antônio pelo carinho, amizade e união em todos estes anos.

Muito obrigado!

À minha orientadora Marcia pelo apoio, carinho e dedicação nestes anos de pesquisa. Ser seu orientado foi um grande privilégio. Agradeço por tudo que aprendi e aprendo não só como professora e orientadora, mas também como

amiga. Obrigado!

## **AGRADECIMENTOS**

Às pesquisadoras do Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz, Walderez, Sandra e Marilena, pelo amplo conhecimento compartilhado, tanto em micologia quanto de vida. Vocês ajudaram muito na minha formação e amadurecimento. Eu as considero minhas segundas mães. Obrigado pelo carinho e apoio!

Aos funcionários e amigos do Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz, Dulcilena, Leonor, Mirian, Lindete, Andres, Maria, Fumiko, Simone. Vocês foram maravilhosos, me receberam muito bem e direta ou indiretamente colaboraram na realização desse trabalho. Muito Obrigado!

Aos companheiros de pós-graduação e bolsistas Fundap, Hilda, Jeane, Aline, Tânia, Mariana, Sônia, Mara, Daiane, Fabiana, Mitra, Hussein, Fábio, Daise, Thiago, Lidiane e Daniela. Juntos compartilhamos momentos de alegria e tristeza. Obrigado pelo companheirismo!

A todos os funcionários, pós-graduandos e bolsistas Fundap do Núcleo de Enteroparasitoses e Parasitoses Sistêmicas do Instituto Adolfo Lutz pelo apoio. Obrigado!

À banca examinadora de qualificação e de defesa do mestrado, Dra Graziella Hanna Pereira, Cecília Luiza Simões dos Santos, Lucilaine Ferrazoli e Marilene Rodrigues Chang, pelas colocações pertinentes para a melhoria desse trabalho. Obrigado!

À equipe do Laboratório de Micologia do Hospital Universitário da UFMS, Marilene, Maína, Floriano, Elizabete, Débora e Débora, por todo suporte nos meus primeiros momentos na pesquisa. Muito obrigado!

Ao Programa de Pós-graduação da Coordenadoria de Controle de Doenças (PPG-CCD), Dra Maria de Fátima, Tirces e Carol, pelo apoio e paciência durante esta fase. Obrigado!

Aos meus familiares, avós, tios, primos, muito queridos, pelo apoio durante toda minha vida. Devo minhas conquistas a cada um em especial. Muito obrigado!

Aos meus amigos, Marcelo, Estevão, Caroline, Verônica e todos que mesmo de longe estiveram torcendo por mim. Obrigado!



**Este trabalho teve o apoio financeiro da Fundação de  
Amparo à Pesquisa de São Paulo – FAPESP  
(Processo 2008/51812-7)**

## RESUMO

Infecções fúngicas de corrente sanguínea (ICS) incluem as candidemias, denominadas também candidíases hematogênicas, desde que seus principais agentes são espécies do gênero *Candida*. Espécies desse gênero estão associadas a um dos principais quadros de infecção hospitalar, tendo sido relatado como quarto agente de infecções de corrente sanguínea nos Estados Unidos. A ocorrência da candidemia varia conforme a região geográfica, a categoria do hospital, tipo de paciente, unidade hospitalar e fatores de risco para a doença. Outro fato que interfere na taxa da doença é a qualidade do diagnóstico, pois a confirmação laboratorial da candidemia nem sempre é possível, desde que, muitas hemoculturas não permitem o isolamento do agente. Este estudo teve como objetivo determinar as espécies e sensibilidade de leveduras causadoras de infecção de corrente sanguínea no estado de Mato Grosso do Sul no período de 10 anos. A ocorrência de cepas de *C. dubliniensis*, analisada por PCR dentre 44 fenótipos de *C. albicans* não foi observada neste estudo. Espécies crípticas do complexo *C. parapsilosis* foram investigadas em 37 isolados por PCR-RFLP, demonstrando ocorrência de *C. orthopsilosis* (8%) mas não de *C. metapsilosis*. A sensibilidade a fluconazol, itraconazol, voriconazol determinada por microdiluição (AFST-EUCAST) foi alta para todas as espécies, sendo maior para *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* (100%) e menor para *C. parapsilosis* (92,6%). Resistência foi observada apenas para voriconazol em 1 isolado de *C. parapsilosis* e no único isolado de *C. krusei*. Caspofungina foi avaliada apenas contra *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis*, mostrando-se eficaz em todos os isolados. A eficácia de anfotericina B foi alta (100%) no método de microdiluição AFST-EUCAST, mas variável e espécie-dependente nos testes de curvas de morte. Nesse método o efeito fungicida (h) foi mais rápido para *Candida albicans* e mais lento para *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. Conclui-se que a distribuição de espécies de agentes de candidemia no hospital universitário de Campo Grande não diferiu daquela descrita na maior parte dos estudos brasileiros, porém foi inédito o achado de *C. orthopsilosis* no estado de MS. A alta sensibilidade dos isolados a fluconazol, itraconazol e voriconazol dá subsídios para uso terapêutico profilático e empírico com esses fármacos nesse hospital. Para anfotericina B foi demonstrado que, o

método de curvas de morte pode ser uma alternativa para a microdiluição, por apresentar melhor desempenho na busca por cepas resistentes *in vitro* ao polieno. Estudos de correlação clínico-laboratorial precisam ser implementados para confirmar essa afirmação.

## ABSTRACT

Fungal bloodstream infections (BSI), including candidemia, are also called hematogenous candidiasis, since its main agent are species of the genus *Candida*. These species are associated with one of the main frames of hospital infection. In United States, was reported as the fourth agent of bloodstream infections. The occurrence of candidemia varies by geographic region, type of hospital, type of patient, hospital and risk factors for disease. Another interfering factor with the rate of disease is the quality of diagnosis, laboratory confirmation of candidemia is not always possible, since many blood cultures do not allow the isolation of the agent. This study aimed to determine the species and sensitivity of yeasts causing bloodstream infection in the state of Mato Grosso do Sul in the period of 10 years. The occurrence of *C. dubliniensis* strains analyzed by PCR among 44 *C. albicans* phenotypes was not observed in this study. Cryptic species in *C. parapsilosis* complex were investigated in 37 isolates by PCR-RFLP, showing the occurrence of *C. orthopsilosis* (8%) and no *C. metapsilosis* isolates. The susceptibility profiles to fluconazole, itraconazole, voriconazole determined by microdilution (AFST-EUCAST) was high for all species especially for *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* (100%) and lower for *C. parapsilosis* (92.6%). Resistance to voriconazole was only seen in one isolate of *C. parapsilosis* and the isolate from *C. krusei*. Caspofungin was tested only against *C. parapsilosis* and *C. orthopsilosis* and showed to be effective in all isolates. The efficacy of amphotericin B was high (100%) in the microdilution method AFST-EUCAST, but variable and species-dependent when tested by time-kill curves methodology. In this method the fungicidal effect (h) was faster for *Candida albicans* and slower for *C. glabrata* and *C. parapsilosis*. It follows that the distribution of species of agents of candidemia in a tertiary care hospital of Campo Grande did not differ from that described in most Brazilian studies, but this finding was the first describing *C. orthopsilosis* in Mato Grosso do Sul . The high sensitivity of isolates to fluconazole, itraconazole and voriconazole provides subsidies for prophylactic and empirical therapeutic using these drugs in this hospital. Amphotericin B was shown that the time-kill

methodology may be an alternative to microdilution for perform better in the search for resistant strains *in vitro* to this polyene. Clinical and laboratory studies must be implemented to confirm this assertion.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - Graus centígrados

AFST-EUCAST - *Antifungal Susceptibility Testing - European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing*

AMB - Anfotericina B

ARTEMIS DISK - Programa Internacional de Vigilância Antimicrobiana

ATCC - American Type Culture Collection

*C. albicans - Candida albicans*

*C. glabrata - Candida glabrata*

*C. krusei - Candida krusei*

*C. parapsilosis - Candida parapsilosis*

*C. tropicalis - Candida tropicalis*

CLSI - *Clinical Laboratory Standards Institute*

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA - ácido desoxirribonucléico

DO – densidade ótica

*et al.* - e outros

FCZ - Fluconazol

HU-UFMS – Hospital Universitário – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

IAL - Instituto Adolfo Lutz

IC - *inhibition concentration*

ICS - Infecção de corrente sanguínea

Int. - intervalo

ITZ - Itraconazol

K<sup>+</sup> - íon potássio

L - litro

LAC - Laboratório de Análises Clínicas

MFC - mínima concentração fungicida

mg- miligramas

MIC - mínima concentração inibitória

MS - Mato Grosso do Sul

NCCLS - *National Committee for Clinical and Laboratory Standards*

PCR - reação da polimerase em cadeia

PFGE - e eletroforese em campo pulsátil

RAPD - amplificação aleatória de fragmentos polimórficos do DNA

RFLP - análise de fragmentos polimórficos após uso de enzimas de restrição

RNA - ácido ribonucléico

SDD - Sensível dependendo da dose

SENTRY - Programa Internacional de Vigilância Antimicrobiana

SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

T- tempo

t- temperatura

ufc - unidade formadora de colônia

UTI - Unidade de Tratamento Intensivo

UTI-neo - Unidade de tratamento intensivo neonatal

VCZ - Voriconazol

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Página

Tabela 1- Distribuição das espécies de 100 agentes de infecção de corrente sanguínea em Hospital Universitário de Campo Grande, MS.....	34
Tabela 2- Tabela 2. Valores de <i>breakpoints</i> para quatro antifúngicos segundo duas metodologias de referência.....	39
Tabela 3- Tabela 3. Concentração inibitória mínima (MIC, mg/L) de antifúngicos frente a quatro espécies agentes de candidemia em pacientes de hospital da cidade de Campo Grande, MS.....	44
Tabela 4. Suscetibilidade (MIC, mg/L) de 100 isolados de <i>Candida</i> spp., agentes de infecção de corrente sanguínea frente ao fluconazol.....	44
Tabela 5. Suscetibilidade (MIC, mg/L) de 100 isolados de <i>Candida</i> spp. agentes de infecção de corrente sanguínea frente ao itraconazol.....	45
Tabela 6. Suscetibilidade (MIC, mg/L) de 100 isolados de <i>Candida</i> spp. agentes de infecção de corrente sanguínea frente ao voriconazol.....	46
Tabela 7. Suscetibilidade (MIC, mg/L) de 100 isolados de <i>Candida</i> spp. agentes de infecção de corrente sanguínea frente ao anfotericina B.....	47
Tabela 8. Concentração inibitória mínima (MIC, mg/L) de antifúngicos frente a quatro espécies agentes de candidemia em pacientes de hospital da cidade de Campo Grande, MS.....	48
Tabela 9. Classificação de 94 isolados de <i>Candida</i> spp. frente a fármacos azólicos e anfotericina B.....	53



Figura 1- Estrutura química da molécula de anfotericina B.....	<b>25</b>
Figura 2- Estrutura química da molécula de fluconazol.....	<b>26</b>
Figura 3- Estrutura química da molécula de itraconazol.....	<b>27</b>
Figura 4- Estrutura química da molécula de voriconazol.....	<b>27</b>
Figura 5- Estrutura química da molécula de caspofungina.....	<b>28</b>
Figura 6- Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com os pares de primers CDU2/NL4CAL para <i>C. dubliniensis</i> e CAL5/NL4CAL para <i>C. albicans</i> , onde: I – marcador molecular com 100 pares de base e II - <i>C. dubliniensis</i> CBS 9768, III – <i>C. albicans</i> ATCC 90028, IV a VI – <i>C. albicans</i> .....	<b>41</b>
Figura 7- Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos de PCR, onde PM: marcador molecular com 100 pares de base, C.para, <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019, C.meta, <i>C. metapsilosis</i> ATCC 96144 e C.ortho, <i>C. orthopsilosis</i> . Gel A: PCR com amostras 1 a 5 de 716 pb característica do complexo <i>C. parapsilosis</i> . Gel B: PCR-RFLP com amostras 1 a 4 características de <i>C. parapsilosis</i> e amostra 5 de <i>C. orthopsilosis</i> .....	<b>42</b>
Figura 8. Frequência de espécies de 100 agentes de infecção de corrente sanguínea em Hospital Universitário de Campo Grande, MS, 1998-2007.....	<b>42</b>
Figura 9. Suscetibilidade de 100 isolados de <i>Candida</i> spp. frente a quatro fármacos.....	<b>44</b>
Figura 10. Suscetibilidade de 100 isolados de <i>Candida</i> spp., agentes de candidemia, frente ao fluconazol.....	<b>45</b>

Figura 11. Suscetibilidade (MIC, mg/L) de 100 isolados de <i>Candida</i> spp., agentes de infecção de corrente sanguínea, frente ao itraconazol.....	<b>45</b>
Figura 12. Suscetibilidade (MIC, mg/L) de 100 isolados de <i>Candida</i> spp. agentes de infecção de corrente sanguínea frente ao voriconazol.....	<b>46</b>
Figura 13. Suscetibilidade (MIC, mg/L) de 100 isolados de <i>Candida</i> spp. agentes de infecção de corrente sanguínea frente a anfotericina B.....	<b>47</b>
Figura 14. Curvas de morte de 44 isolados de <i>Candida albicans</i> frente a 1 mg/L de anfotericina B.....	<b>49</b>
Figura 15. Curvas de morte de 37 isolados do complexo <i>Candida parapsilosis</i> frente a 1 mg/L de anfotericina B.....	<b>50</b>
Figura 16. Curvas de morte de 13 isolados de <i>Candida tropicalis</i> frente a 1 mg/L de anfotericina B.....	<b>50</b>
Figura 17. Curvas de morte de 5 isolados de <i>Candida glabrata</i> frente a 1 mg/L de anfotericina B.....	<b>51</b>
Figura 18. Curvas de morte de um isolado de <i>Candida krusei</i> frente a 1 mg/L de anfotericina B.....	<b>51</b>
Figura 19. Curvas de morte representativas (média) de 5 espécies de <i>Candida</i> spp. frente a 1 mg/mL de anfotericina B.....	<b>52</b>
Figura 20. Atividade fungicida de anfotericina B em 100 isolados de <i>Candida</i> spp. em distintos períodos de exposição.....	<b>52</b>

Apêndice 1 – Espécies e suscetibilidade a antifúngicos de 100 isolados de *Candida* spp., agentes de infecção sanguínea, em Hospital Universitário de Grande Grande, MS, Brasil

Apêndice 2- Resultado da contagem de unidades formadoras de colônias (ufc/mL) de *Candida* spp. expostas a 1 mg/L de anfotericina B em distintos períodos.

Apêndice 3- Esquema de resultados obtidos nos testes de Curvas de Morte

## Índice

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
1.1 Etiologia da Candidemia.....	20
1.2 Tratamentos das Candidemias.....	25
1.3 Resistência dos agentes de candidemia aos antifúngicos.....	28
<b>2.OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
2.1 Geral.....	32
2.2 específicos.....	32
<b>3. MATERIAIS e MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
3.1 Origem das amostras.....	33
3.2 Metodologia molecular.....	35
3.2.1 Extração de DNA.....	35
3.2.2 Pesquisa de <i>C. dubliniensis</i> .....	36
3.2.3 Análise molecular do complexo <i>C. parapsilosis</i> .....	37
3.3 Testes de Sensibilidade a Antifúngicos.....	37
3.3.1 Microdiluição.....	37
3.3.2 Curvas de morte.....	39
<b>4. FORMA DE ANÁLISE DE RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>54</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>69</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>70</b>

## 1 Introdução

Infecções fúngicas de corrente sanguínea (ICS) incluem as candidemias, denominadas também candidíases hematogênicas, desde que seus principais agentes são espécies do gênero *Candida*. Espécies desse gênero estão associadas a um dos principais quadros de infecção hospitalar, tendo sido relatado como quarto agente de infecções de corrente sanguínea nos Estados Unidos (WEY *et al.* 1988; GUDLAUGSSON *et al.* 2003 Wisplinghoff *et al.* 2004). Pacientes internados em unidades de tratamento intensivo (UTI) têm maior possibilidade de desenvolver candidemia e estudos descrevem taxas em torno de 10% em distintos países (BLOOMBERG *et al.* 2001; OSTROSKY-ZEICHENER *et al.* 2003; PEREZ-BOTA *et al.* 2004; FALAGAS *et al.* 2006; DIMOPOULOS *et al.* 2008). No Brasil, a frequência é desconhecida nessas unidades e os raros dados oficiais ([www.cve.sp.gov.br](http://www.cve.sp.gov.br)) descrevem candidemia como quarta ou quinta infecção sistêmica no período de 2004 a 2008.

A ocorrência da candidemia varia conforme a região geográfica, a categoria do hospital, tipo de paciente, unidade hospitalar e fatores de risco para a doença. Outro fato que interfere na taxa da doença é a qualidade do diagnóstico, pois a confirmação laboratorial da candidemia nem sempre é possível, desde que, muitas hemoculturas não permitem o isolamento do agente (ODDS *et al.* 2007).

Há relatos sobre aumento da incidência da doença, no final da década de 80 e início dos anos 90 (BECK-SAGUÉ *et al.* 1993; PFALLER *et al.* 2007; PRESTERL *et al.* 2007); no entanto, trabalhos mais recentes, indicam que em algumas instituições da América do Norte e Europa a incidência manteve-se estável, ou foi até decrescente (MCNEIL *et al.* 2001; TRICK *et al.* 2002; PFALLER *et al.* 2004; MORGAN *et al.* 2005). Os poucos estudos populacionais indicam taxas variadas, de acordo com o continente. Nos Estados Unidos, as taxas são mais elevadas do que as européias. Em quatro estudos norte-americanos realizados nos estados de Yowa, Connecticut, Atlanta e São Francisco e Baltimore as taxas por 100.000 habitantes foram de 6, 7, 8 e 24 casos, respectivamente (DIEKEMA *et al.* 2002; HAJJEH *et al.* 2004; KAO *et al.* 1999; HAJJEH *et al.* 2004). Na Europa, as maiores taxas, incluindo as da Dinamarca (4,8 por 100.000

habitantes) e Escócia (11 por 100.000 habitantes) são menores que as norte-americanas (KAO *et al.* 1999; HAJJEH *et al.* 2004; ARENDRUP *et al.* 2005; ODDS *et al.* 2007). Outro grande estudo populacional foi realizado no Canadá, mostrando taxas entre 1,1 a 4,9/ 100.000 habitantes (LAUPLAND *et al.* 2005). As taxas encontradas em estudos brasileiros feitos por Colombo *et al.* (2006) e Pereira *et al.* (2010) foram de 1,66 e 2,4 / 100.000 habitantes, respectivamente.

Candidemia também é importante pelas altas taxas de mortalidade, em torno de 35% a 70% e índices de letalidade, entre 25% e 50%, chegando a 81% em alguns estudos (WEY *et al.* 1988; SHIN *et al.* 2001; GUDLAUGSSON *et al.* 2003; MORGAN *et al.* 2005; COLOMBO *et al.* 2006; Horn *et al.* 2009; LEROY *et al.* 2009). O melhor controle dessas infecções dá-se com diagnóstico rápido e introdução de terapia antifúngica específica. Entretanto, a ocorrência de resistência clínica e a demonstração de cepas resistentes *in vitro*, a uma ou vários antifúngicos, têm sido sistematicamente descritas (REX *et al.* 2001; PAPPAS *et al.* 2009).

Tendo em vista esses fatos, a vigilância ativa da ocorrência de espécies e cepas resistentes à terapia antifúngica para candidemia tem fundamental importância para adoção de medidas de controle dessas infecções.

## 1.1 Etiologia da candidemia

Os agentes de candidemia, em sua grande maioria (~90%), são representados por cinco espécies: *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. Outras espécies associadas a essa infecção são: *C. rugosa*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. lusitanae*, *C. dubliniensis*, *C. inconspicua*, *C. novergensis*, *C. lipolytica*, *C. zeylanoides*, *Pichia anomala* (*C. pelliculosa*), *C. rugosa*, *C. sake*, *C. lambica*, *C. pulcherrima*, *C. intermedia* e *C. haemulonii* (REX *et al.* 2002; PAPPAS *et al.* 2004; PFALLER e DIEKEMA 2004; SPELLBERG *et al.* 2006; PFALLER e DIECKEMA 2007; PFALLER *et al.* 2007).

As taxas relativas a cada espécie causadora de ICS na América do Norte, América Latina e Europa podem ser muito bem avaliadas no

Programa SENTRY (PAPPAS *et al.* 2009). A última publicação de Messer *et al.* (2009) mostra resultados de 1448 casos de candidemia, na qual *Candida albicans* foi responsável por metade dos casos (771; 53,2%). Outras espécies importantes foram: *C. parapsilosis* (238; 16,4%), *C. tropicalis* (157; 10,8%), *C. glabrata* (202; 13,9%) e *C. krusei* (29; 2%). Outras espécies menos frequentes, foram: *C. lusitaniae* (14; 1%), *C. guilliermondii* (9; 0,6%), *C. dubliniensis* (7; 0,5%), *C. famata* (6; 0,4%), *C. kefyr* (5; 0,3%) e *C. pelliculosa* (4; 0,3%). Um grande estudo canadense englobou cerca de 2019 casos, e descreveu *C. albicans* como o agente prevalente (45,6%), seguido de *C. glabrata* (26%) e *C. parapsilosis* (15,7%). *Candida tropicalis* (8,1%) e *C. krusei* (2,5%) foram também encontradas, porém, em menor frequência (HORN *et al.* 2009).

Dentro do gênero, *C. albicans* é a espécie causadora da maior gama de quadros clínicos, sendo a grande maioria de origem endógena (PRESTERL *et al.* 2007). *Candida albicans* é encontrada colonizando os mais diversos sítios, tanto na microbiota humana, como em vários ambientes e superfícies inanimadas, incluindo as hospitalares. A prevalência de *C. albicans* é notória no mundo todo e sua distribuição relativa a outras espécies varia conforme distintos fatores, incluindo região geográfica. O fator idade ( $\geq$  65 anos), prematuridade, cirurgia prévia, estado de imunodepressão, exposição prévia a antibióticos ou antifúngicos e utilização de procedimentos invasivos como cateteres intravasculares, são os principais fatores (YAMAMURA *et al.* 1999; LUNEL *et al.* 1999; VIGOROUX *et al.* 2006). *Candida albicans* está relacionada, principalmente, a infecções em centros onco-hematológicos e cirúrgicos (PRESTERL *et al.* 2007).

Apesar de ser a espécie prevalente, *C. albicans* não está relacionada às maiores taxas de óbito. No estudo de Horn *et al.* (2009) mortalidade maior foi observada entre os casos infectados por *C. krusei* (~53%) e menor naqueles com *C. parapsilosis* (~24%). Por outro lado, as taxas associadas a *C. albicans* e *C. glabrata* foram semelhantes, em torno de 36% a 38%. Esse estudo enfatiza que a espécie causadora do quadro de candidemia pode influenciar a evolução clínica do caso. Desse modo, a determinação laboratorial específica do agente etiológico é de grande relevância.

O surgimento de técnicas moleculares foi muito importante para a identificação acurada de espécies de leveduras e a caracterização do DNA

do gênero *Candida* foi, e continua sendo, de grande valor para o conhecimento epidemiológico das candidemias. A diferenciação de cepas dentro de uma mesma espécie é possível por diferentes técnicas moleculares, como por exemplo: reação da polimerase em cadeia (PCR), amplificação aleatória de fragmentos polimórficos do DNA (RAPD), análise de fragmentos polimórficos após uso de enzimas de restrição (RFLP) e eletroforese em campo pulsátil (PFGE).

Na década de 80, uma espécie fenotipicamente relacionada à *C. albicans*, denominada *C. dubliniensis* foi descrita (SULLIVAN *et al.* 1995). Em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) tratados para candidíase oral, essa espécie apresentava altas taxas de resistência ao fluconazol. Nos anos seguintes, *C. dubliniensis* foi associada à infecção de corrente sanguínea e, a partir de então, as cepas classificadas como *C. albicans* devem ser avaliadas, em estudos epidemiológicos, quanto à presença de *C. dubliniensis* (SANCAK *et al.* 2003).

Outra espécie que sempre esteve entre os principais patógenos causadores de candidemias é *C. parapsilosis*. Essa espécie, na década de 90, foi dividida em três grupos (I, II e III), com base no estudo de seu DNA. Estudos moleculares recentes mostraram que, de fato, não se trata de subgrupos, mas sim de três espécies distintas: *C. parapsilosis* (ex-grupo I), *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* substituindo os grupos II e III (LIN *et al.* 1995; ROY *et al.* 1998; TAVANTI *et al.* 2005; TAVANTI *et al.* 2007).

*Lodderomyces elongisporus* foi reconhecida como outra espécie relacionada a *C. parapsilosis*. Sua importância clínica como agente de candidemia foi verificada na Ásia e México (LOCKHART *et al.* 2008).

A importância da identificação correta das novas espécies recai, não somente pela reconhecida diferença no perfil de suscetibilidade a novos antifúngicos pertencentes à nova classe das equinocandinas (SILVA *et al.* 2009; DIMOPOULOS *et al.* 2009), mas ainda sobre questões epidemiológicas a serem esclarecidas. Por exemplo, *C. metapsilosis* não foi encontrada em pacientes adultos com candidemia, mas apenas em população pediátrica em um estudo recente (TAY *et al.* 2009); sua maior incidência foi verificada em amostras de mucosa, secreção de trato respiratório, líquido ascítico e articular e não em hemoculturas (LOKHART *et al.* 2008; SILVA *et al.* 2009). As características epidemiológicas de



*Candida orthopsilosis*, por sua vez, ainda estão por ser melhor definidas mas sua importância em maiores de 60 anos e como agente causal de surtos hospitalares merece atenção, vistos os relatos de literatura (TAVANTI *et al.* 2007; LOKHART *et al.* 2008). De modo geral, a incidência de *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* não ultrapassa a taxa de 10% em estudos globais, tal como o populacional realizado na Espanha (GOMEZ-LOPES *et al.* 2008) .

*Candida parapsilosis* é isolada, comumente, em UTIs neonatal (UTI-neo) e berçários. A relação deste microrganismo com cateteres venosos centrais, muito utilizados nessas unidades de tratamento está bem estabelecida (LEVIN *et al.* 1998; LEVY *et al.* 1998). *Candida parapsilosis* é um patógeno exógeno que pode ser encontrado tanto na pele, como em superfícies mucosas. Esse microrganismo é também conhecido pela habilidade alta em formar biofilmes, podendo assim fixar-se em cateteres e outros dispositivos hospitalares invasivos. Desse modo, *C. parapsilosis* é capaz de se disseminar no paciente e, além disso, dado seu alto grau de adesão persistir no ambiente hospitalar, através das mãos dos profissionais da saúde e artigos hospitalares. Pfaller *et al.* (2008) enfatizaram que as infecções de corrente sanguínea causadas por esta espécie possuem taxas de mortalidade, significativamente, menores do que outras espécies de *Candida*.

Por sua vez, *C. tropicalis* é membro da microbiota intestinal e, portanto, está relacionada a infecções endógenas pós-cirúrgicas e também a pacientes de neoplasias, principalmente, leucemia (DIEKEMA *et al.* 2002; HORN *et al.* 2009). Em países da América Latina, particularmente o Brasil, esta espécie é muito frequente, mesmo em pacientes não-portadores de câncer, constituindo-se na segunda, ou terceira, principal causa de candidemia (GODOY *et al.* 2003; GOLDANI *et al.* 2003). Em outros continentes, os dados são contrastantes, sendo baixa sua frequência (2,5 %) como agente de candidemia em hospitais da Escócia (ODDS *et al.* 2007). Na França, Leroy *et al.* (2009) descreveram em 107 casos, apenas 4,9% de *C. tropicalis* como agente etiológico de candidemia.

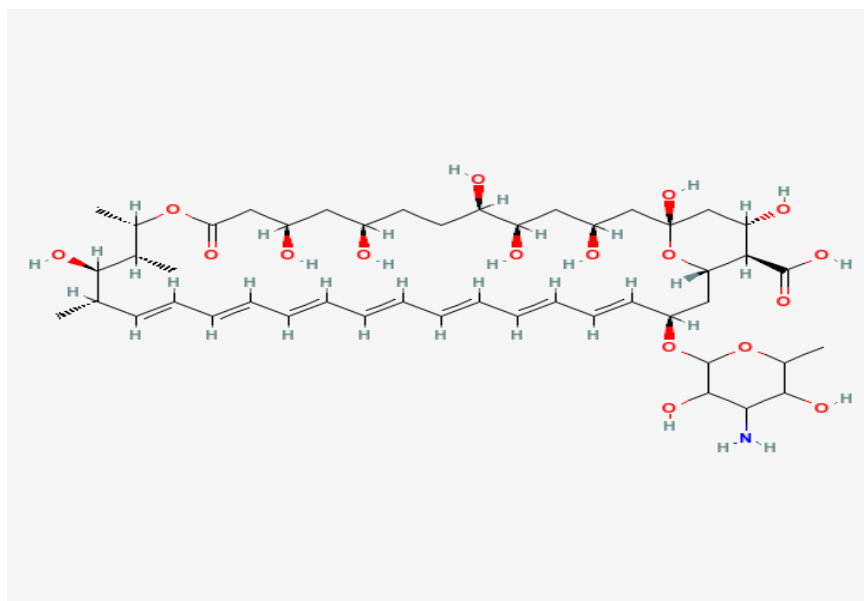
*Candida glabrata* é outra espécie de grande importância em candidemias, principalmente, na América do Norte. Em 1989, essa espécie era a quarta mais comumente relacionada à infecção de corrente sanguínea

(ICS) nos EUA; no entanto, Trick *et al.* (2002) mostraram que, de 1995-1999, *C. glabrata* passou a ser a segunda principal responsável por essas infecções. Descrita como sendo relacionada a pacientes idosos, *C. glabrata* em um grande estudo norte-americano foi responsável por 25% de todas as fungemias documentadas em pacientes maiores de 65 anos (DIEKEMA *et al.* 2002).

*Candida krusei* é uma espécie de grande importância dada sua resistência intrínseca à droga mais utilizada nos tratamentos de candidemia. *Candida krusei* é conhecido patógeno em pacientes com neoplasias hematológicas e receptores de transplantes (HORN *et al.* 2009), mas com diferenças na distribuição geográfica, com maior frequência de isolamento na República Checa (7,6%) e menor para a Indonésia, Coreia do Sul e da Tailândia (0-0,3%) (PFALLER *et al.* 2008).

## 1.2 Tratamento das candidemias

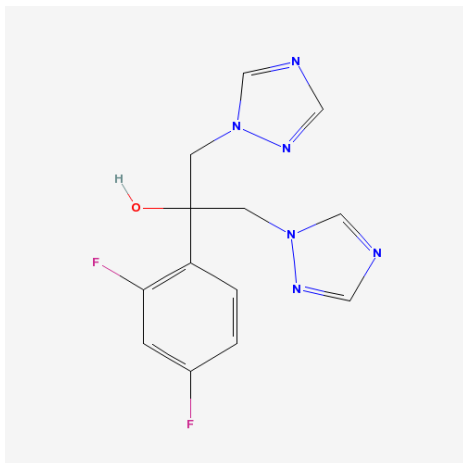
A terapia antifúngica nos casos de candidemia pode depender da existência, ou não da condição de neutropenia (PAPPAS *et al.* 2009). Anfotericina B (AMB) é um medicamento potente utilizado no tratamento das candidemias. Assim como a nistatina, a AMB é um polieno (Figura 1), cuja molécula é heterocíclica e anfipática que agem inserindo suas moléculas dentro da bicamada lipídica da membrana plasmática do fungo. Esses fármacos anelam-se ao ergosterol e formam poros que comprometem a integridade da membrana plasmática permitindo a perda e entrada de íons, como  $K^+$ , resultando em morte celular. Os polienos causam, também, importantes danos oxidativos às células fúngicas. No entanto, ainda que possua alta atividade fungicida e amplo espectro, a AMB possui é tóxica, em especial, nefrotóxica. Este efeito é devido à alta similaridade entre o ergosterol fúngico e o colesterol, permitindo que o fármaco ligue-se também às células humanas e, portanto, apesar da eficácia em eliminar o patógeno, o uso da AMB é restrito a quadros clínicos mais graves. No entanto, recentemente com as formulações lipossomais que diminuem esses efeitos tóxicos, AMB começa ganhar ainda mais espaço nos tratamentos das candidemias em todo o mundo (ESPINEL-INGROFF 2009; PAPPAS *et al.* 2009).



**Figura 1.** Estrutura química da molécula de anfotericina B

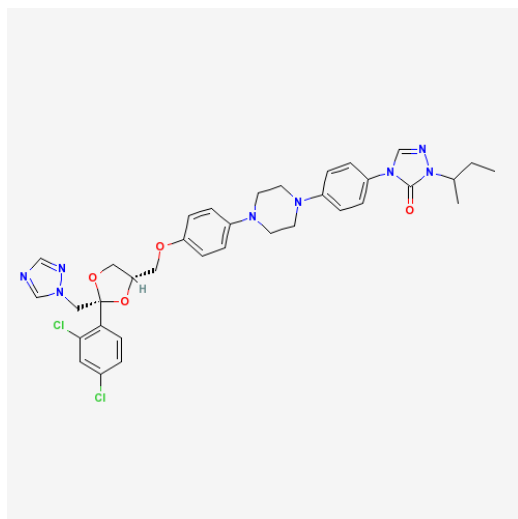
[http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5231054  
&loc=ec\\_rcs](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5231054&loc=ec_rcs)

A busca de fármacos menos tóxicos levou ao desenvolvimento da classe de antifúngicos, atualmente, mais utilizada para o tratamento de candidemias, a dos triazóis. Devido a segurança e eficácia desses antifúngicos frente a maioria das espécies de *Candida*, o fluconazol (FCZ)(Figura 2) e o voriconazol (VCZ)(Figura 3) são drogas amplamente utilizadas. Os triazóis agem inibindo a 14-alfa lanosterol demetilase, enzima do citocromo P450 que é codificada pelo gene ERG11. Essa ação implica em uma interferência na cadeia de produção do ergosterol, necessário a estruturação da membrana plasmática do fungo. A falta de ergosterol confere ação fungistática aos triazóis e o acúmulo de esteróis precursores do ergosterol leva a ação fungicida desses fármacos. O itraconazol (ITZ)(Figura 4) é outro triazol e, desse modo, age de forma semelhante, podendo não ser eficaz em células resistentes a outros azóis, devido a resistência cruzada. Itraconazol não e empregado em quadros sistêmicos (ESPINEL-INGROFF 2009).



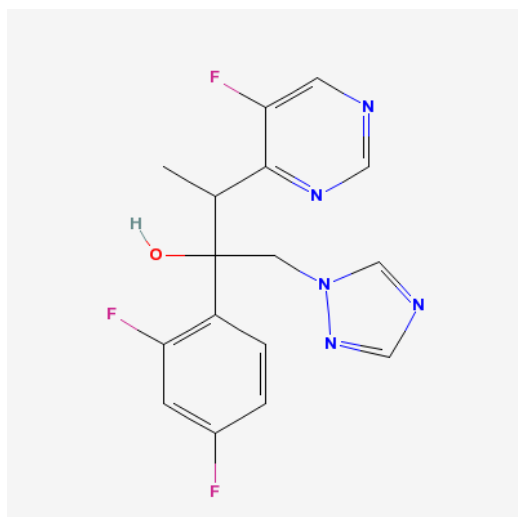
**Figura 2.** Estrutura química da molécula de fluconazol

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



**Figura 3.** Estrutura química da molécula de itraconazol

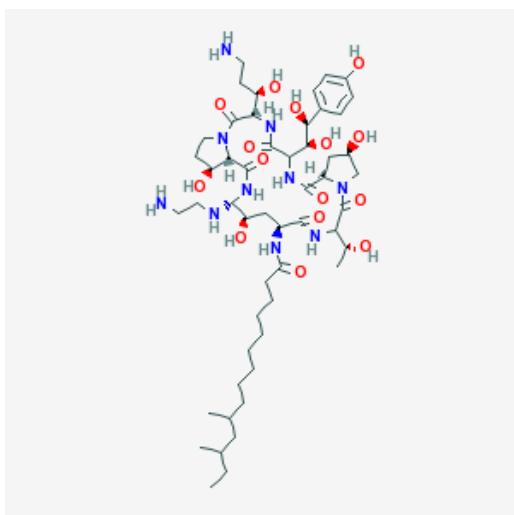
Fonte: [http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=55283&loc=ec\\_rcs](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=55283&loc=ec_rcs)



**Figura 4.** Estrutura química da molécula de voriconazol

[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)

A mais nova classe de antifúngicos, as equinocandinas, tem ação na parede celular, interferindo na formação da 1,3 beta-glucana importante para a estruturação da célula fúngica (CANNON *et al.* 2009; PFALLER e DIEKEMA 2007; PAPPAS *et al.* 2004). A primeira equinocandina indicada para uso clínico foi a caspofungina (Figura 5) que é indicada para candidemia em pacientes não neutropênicos ou até mesmo neutropênicos. O grande interesse nesse fármaco é para aqueles casos resistentes aos antifúngicos azólicos (PAPPAS *et al.* 2009).



**Figura 5.** Estrutura química da molécula de caspofungina

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=151068&loc=ec RCS>

### 1.3 Resistência dos agentes de candidemia aos antifúngicos

Ainda que, o arsenal terapêutico para candidemia esteja bem definido, casos de resistência clínica são conhecidos (PAPPAS *et al.* 2009). Diversos fatores estão implicados na evolução clínica; porém a ocorrência de cepas resistentes pode ser uma causa relevante nesse contexto. A resistência pode ser observada *in vitro* e divide-se em resistência natural e secundária. Resistência natural pode ocorrer em todos os membros de determinada espécie, como é o caso de *Candida krusei* frente ao fluconazol, ou apenas a certas cepas pertencentes a uma espécie, em regra, sensível a um antifúngico.

A conhecida resistência secundária, ou adquirida, ocorre quando cepas sensíveis de uma espécie desenvolvem resistência a determinado antifúngico após exposição ao fármaco, como é verificado em *C. glabrata* frente ao fluconazol (CANNON *et al.* 2009). De fato, para *C. glabrata* são observados índices de resistência altos, dependendo dos autores e *breakpoint* empregados para interpretar os valores de concentração mínima inibitória (MIC). Para essa espécie são descritas taxas de resistência de até 25,7 % para fluconazol e 9,9% para voriconazol (MESSER *et al.* 2009).

Para *Candida albicans*, de outro modo, taxas de resistência *in vitro* ao fluconazol são muitas baixas, com intervalos em torno de 0,12 mg/L

a 0,5 mg/L, assim como para voriconazol que os valores de MIC não ultrapassam 0,5 mg/L (REX *et al.* 1993; PAPPAS *et al.* 2004, RODRIGUEZ-TUDELA *et al.* 2007) e nacionais (FRANÇA *et al.* 2008; MATTA *et al.* 2006).

*Candida parapsilosis* é, também espécie, em regra sensível aos triazóis. Foi observado em um estudo de 9.371 isolados, altos níveis de sensibilidade tanto ao fluconazol (90,8-95,8%) quanto ao voriconazol (95,3-98,1%) em diversas regiões geográficas.

*Candida tropicalis* apresenta-se sensível ao FCZ (91% a 100%) em dez anos de monitoramento (1992 a 2001), independente da área de origem, em estudo de Pfaller *et al.* 2004. Para voriconazol frente a isolados de *C. tropicalis* um valor de MIC<sub>50</sub> de 0,06mg/L foi descrito nos estudos de Ostrosky-Zeichner *et al.*(2003), Zepelin *et al.*(2007), Odds *et al.*(2007) Matsumoto *et al.* (2007) e Messer *et al.*(2009)

*Candida glabrata* geralmente apresentam valores mais altos de MIC frente aos azóis. Resultados publicados por Messer *et al.* (2009) no programa internacional SENTRY, mostraram MICs muito altos de fluconazol frente a *C. glabrata* (MIC  $\geq$  16 mg/L) em 25,7%, assim como para itraconazol (69,8% de resistência e 26,7% de cepas S-DD) evidenciando a importância de buscar resistência cruzada entre os triazóis. A sensibilidade da espécie ao voriconazol foi de 90,1%, alertando para ocorrência de resistência para o novo fármaco (MESSER *et al.*, 2009).

*Candida krusei* é uma espécie reconhecidamente resistente ao fluconazol e, cerca de 7% são classificados como sensíveis dependendo da dose (SDD) para voriconazol e até 100% de cepas SDD ou resistentes ao itraconazol (MESSER *et al.* 2009).

Anfotericina B é um antifúngico altamente eficaz in vitro, contra agentes de candidemia, ainda que, há muitas críticas ao desempenho dos métodos de referência quanto à sensibilidade de detecção de resistência. De modo geral, resultados de altos valores de MIC ( $\geq$  2 mg/mL) são observados apenas para *C. krusei* (~4%) e *C. parapsilosis* (2%). O mesmo está sendo observado com a nova classe de antifúngicos: as equinocandinas, que possuem poucos relatos de cepas com MICs superiores a 2mg/L (CUENCA-ESTRELLA *et al.* 2001; MATTA *et al.* 2007; ESPINEL-INGROFF *et al.* 2007).

O monitoramento da frequência de cepas resistentes, dentre os agentes de candidemia, deve ser feito continuamente, através da investigação da eficácia *in vitro* dos antifúngicos frente as espécies (AQUINO *et al.* 2005; PAPPAS *et al.* 2009). O valor dessa avaliação contínua é que se pode constituir uma ampla base de dados, de modo a permitir observação de tendências, temporais e ou geográficas, nos índices de resistência. Ao lado desse objetivo, a vigilância de patógenos emergentes e seus perfis de suscetibilidade a antifúngicos pode prover informação útil no prognóstico e estratégias de tratamento para candidemias. Fármacos muito utilizados, como FCZ e VCZ, despertam grande interesse sobre o aparecimento de resistência em cepas de *Candida* spp. previamente expostas, ou não, em particular, em pacientes submetidos a terapias de longa duração. Em particular, para caspofungina é conhecida a distinta suscetibilidade das espécies do complexo *C. parapsilosis*; desse modo, é importante a determinação *in vitro* da ação desse fármaco nesses isolados.

Os métodos, atualmente referendados para investigação *in vitro* dos fenótipos resistentes foram fundamentados nos procedimentos desenvolvidos desde a década de 80 pelo *Clinical Laboratory Standards Institute*, CLSI (anteriormente, denominado National Committee for Clinical and Laboratory Standards, NCCLS. As metodologias de referência têm como base a reação de inibição de crescimento do agente etiológico em meio líquido contendo antifúngicos, denominada microdiluição. O documento norte-americano M27A-3 (CLSI, 2008) e o documento europeu E.Def. 7.1 do comitê *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing* (AFST-EUCAST) descrevem os procedimentos de referência. O método europeu foi criado a partir do norte-americano, no intuito de tornar objetiva e reproduzível a leitura da reação e diminuir o tempo para emissão de resultados. (CUENCA-ESTRELLA *et al.* 2002; RODRIGUEZ-TUDELA *et al.* 2007). O método AFST-EUCAST produz resultados equivalentes ao do CLSI é indicado apenas para análise de leveduras fermentadoras da glicose, como o gênero *Candida*; ao contrario do CLSI que se aplica também ao gênero *Cryptococcus* (ESPINEL-INGROFF *et al.* 2005). Ambos os métodos tem acurácia para avaliar fenótipos de resistência aos triazóis, anfotericina b e equinocandinas. A definição de pontos de corte *-breakpoints-* não foi ainda



definida para todos os antifúngicos. Para anfotericina B, ainda não existem e para os triazóis diferem entre os métodos.

Alem da ausência de alguns breakpoints, outra limitação observada e reconhecida na metodologia de microdiluição é sua baixa sensibilidade para detectar cepas resistentes a anfotericina B. Dada a importância da resistência clínica para anfotericina B, há grande interesse na busca de outros métodos que possam identificar fenótipos resistentes. O método de curvas de morte foi indicado como uma dessas ferramentas que oferece dados mais fidedignos para demonstrar fenótipos de resistência à anfotericina B. Esta metodologia foi empregada tanto para amostras de *Candida* spp., quanto para *Cryptococcus neoformans* (KLEPSEK *et al.* 1998; RODERO *et al.* 2000).

## 2. Objetivos

### 2.1. Geral

Contribuir para o conhecimento das espécies de leveduras causadoras de infecção de corrente sanguínea no estado de Mato Grosso do Sul no período de dez anos.

### 2.2 Específicos

1. Descrever a frequência das espécies dos agentes de candidemia isolados de pacientes de hospital terciário de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, no período de 1998 a 2007.
2. Verificar, por PCR, a ocorrência de cepas de *C. dubliniensis* dentre fenótipos de *C. albicans* isolados de corrente sanguínea de pacientes hospitalizados em hospital terciário de Campo Grande, MS, no período de 1998 a 2007;
3. Investigar a frequência das novas espécies, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* do complexo *C. parapsilosis*, por técnica de PCR-RFLP;
4. Determinar a suscetibilidade dos agentes de candidemia ao fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B e determinar a ocorrência de isolados multirresistentes ou com resistência cruzada a azóis por metodologia AFST-EUCAST;
5. Verificar a ação da caspofungina frente cepas do complexo *C. parapsilosis*;
6. Avaliar a ação fungicida da anfotericina B frente a todos os agentes encontrados por método de curvas de morte.

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1 Origem das amostras**

Em estudo anterior, Chang *et al.* (2008) estudaram os agentes de candidemia, fatores de risco associados e taxa de mortalidade no HU-UFMS no período de 1998 a 2006. Nesse trabalho a frequência de casos tinha valor médio de 16 ao ano e, este estudo que compreendeu as cepas até 2007, comprovou a mesma taxa nesse último ano avaliado. Do mesmo modo, a distribuição das espécies manteve-se similar à descrita no estudo de Chang *et al.*, (2008). A sensibilidade a diversos antifúngicos, efeito fungicida da anfotericina B identificação molecular das espécies crípticas do complexo *C. parapsilosis*, bem como, de *C. dubliniensis* nos fenótipos de *C. albicans* foram realizados com 100 cepas isoladas no período que ainda estavam viáveis e passíveis de análise. Os isolados, mantidos sob temperatura de  $-20^{\circ}$  C, antes de serem incorporados à coleção foram identificados, em gênero e espécie, por métodos tradicionais com base em suas características morfológicas e bioquímicas (KREGGER VAN RIJ, 1998). Os isolados, compreendidos neste estudo, foram descongelados e semeados em placas contendo meio cromogênico (CHROMagar *Candida*, BBL, USA). Após incubação de quatro dias, sob temperatura de  $35^{\circ}$ C, as colônias formadas foram observadas quanto à textura e cor. Todas as culturas obtidas no CHROMagar corresponderam à identificação prévia, conforme Tabela 1, possibilitando, portanto, o início da identificação molecular e dos testes de sensibilidade aos antifúngicos.

Tabela 1. Distribuição das espécies de 100 agentes de infecção de corrente sanguínea em Hospital Universitário de Campo Grande, MS.

Espécie (N)	Ano				
	1998-1999	2000-2001	2002-2003	2004-2005	2006-2007
<i>C. albicans</i> (44)	7	10	8	5	14
<i>C. parapsilosis</i> (37)	6	7	6	7	11
<i>C. tropicalis</i> (13)	2	5	2	1	3
<i>C. glabrata</i> (5)	1	0	2	0	3
<i>C. krusei</i> (1)	0	0	0	0	1
Total(100)	16	22	18	13	32

## **3.2 Metodologia Molecular**

### **3.2.1 Extração de DNA**

Para as análises moleculares, foram aplicadas as técnicas de PCR, PCR-RFLP. Inicialmente foi necessário extrair DNA genômico de todas as cepas envolvidas.

As extrações de DNA genômico foram realizadas em duas etapas:

1) Obtenção de protoplastos (BRANCHINI *et al.* 1994 e SHIN *et al.* 2001): Algumas colônias de leveduras de 24 a 48h de crescimento foram removidas, com a alça descartável, para um microtubo tipo Eppendorf contendo 1ml de EDTA 50mM. Os microtubos foram centrifugados em microcentrífuga a 10.000 rpm por 15'. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foi adicionado 1ml de EDTA 50 mM. Este processo de lavagem foi repetido até que o sobrenadante fique límpido. Na última lavagem foi deixado apenas o sedimento. O sedimento foi ressuspenso com 200µl de EDTA 50 mM e foi adicionado 40 µl da enzima Lyticase (100U/80µl). Esta suspensão foi incubada em banho Maria a 37°C por 2 a 3hs. Após incubação o microtubo foi centrifugado por 5' e posteriormente o sobrenadante foi desprezado.

2) Lise Celular (segundo SAMBROOK *et al.*1989): Ao protoplasto obtido acima foi adicionado 200 a 300 µl de tampão de lise. Após homogeneização utilizando vortex, o material foi incubado em banho Maria 50°C por 2hs, agitando em vortex a cada 30'. Posteriormente, o material foi centrifugado por 5' e o sobrenadante foi retirado para outro microtubo. Ao sobrenadante foram adicionados 200 - 400 µl de clorofórmio (24:1 clorofórmio/ isopropanol) para promover a precipitação das proteínas. Após centrifugação por 15', houve a formação de três fases. A fase aquosa (parte superior) foi retirada para outro microtubo. Para promover a precipitação do DNA, foi adicionado 300 µl de isopropanol. O material foi centrifugado por 10' 10.000 rpm e o sobrenadante desprezado. Ao sedimento foi adicionado 200 a 500 µL de etanol 70%. Após centrifugação por 10' a 10.000 rpm, o sobrenadante foi desprezado. Após secagem do sedimento (DNA), o DNA será ressuspenso com 50 µl de H<sub>2</sub>O com RNase e mantido freezer -20°C até sua utilização. Para verificar se houve extração, as amostras de DNA genômico foram

realizadas por eletroforese em gel de agarose (2%) e coradas com brometo de etídio. A presença de banda observada em transiluminador de comprimento de onda 302 nm, indicou que houve extração de DNA.

Para a quantificação de DNA genômico, as amostras foram diluídas (1:200) em H<sub>2</sub>O deionizada (Milli Q) estéril e medida a absorbância em espectrofotômetro (HACH DR 4000U), sob comprimento de onda de 260 e 280 nm (luz ultravioleta). O grau de pureza das extrações foi determinado pela razão entre as leituras de densidade ótica (DO) de 260/ DO 280 que tiveram que apresentar valores entre 1,8 e 2,0. Segundo Sambrook *et al.* (1989), absorbância igual a 1 equivale à concentração de 50 mg/L de DNA dupla fita.

### **3.2.2 Pesquisa de *C. dubliniensis***

A diferenciação entre isolados de *C. albicans* e *C. dubliniensis* foi feita através da técnica de PCR com um par de *primer* para *C. albicans* (senso: CAL5- 5'TGTTGCTCTCTCGGGGGCGGCCG-3'; anti-senso: NL4CAL- 5'AAGATCATTATGCCAACATCCTAGGTAAA3') e outro par de *primer* para *C. dubliniensis* (senso: CDU2- 5'AGTTACTCTTTCGGGGGTGGCCT-3'; anti-senso: NL4CAL- 5'AAGATCATTATGCCAACATCCTAGGTAAA3') nas seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial de 94°C por 2', 25 ciclos de 94°C por 1'; 52°C por 1'; 72°C por 1' e extensão final de 10' a 72°C como descrito por (MANNARELLI *et al.* 1998 e CHAVASCO *et al.* 2006).

Após amplificação, os produtos do PCR foram diluídos em tampão de amostra (30% glicerol; 0,25% xilenocianol FF; 0,25% azul de bromofenol) e aplicadas no gel de 2% agarose em TBE contendo 0,5 µg/ml brometo de etídio. As amostras foram submetidas à eletroforese em sistema horizontal contendo TBE durante 50 minutos a 100V e 400 mA. Os géis foram visualizados em transiluminador ultravioleta com longitude de onda de 302 nm (Syngene).

### **3.2.3 Análise Molecular do Complexo *C. parapsilosis***

Para diferenciação entre *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* foi utilizada técnicas de PCR-RFLP segundo TAVANTI *et al.*, 2005a. Para a PCR-RFLP foi amplificado o fragmento *SADH* utilizando par de primer S1F: 5' GTTGATGCTGTTGGATTGT-3'; S1R: 5'-CAATGCCAAATCTCCCAA-3' nas seguintes condições: desnaturação inicial de 94°C por 2', 30 ciclos de 94°C por 1'; 50°C por 1'; 72°C por 1' e extensão final de 10' a 72°C. Os produtos do PCR foram digeridos com enzima de restrição *BanI* em tampão específico da enzima por 90'.

Após amplificação, os produtos do PCR-RFLP foram diluídos em tampão de amostra (30% glicerol; 0,25% xilenocianol FF; 0,25% azul de bromofenol) e aplicadas no gel de 2% agarose em TBE contendo 0,5 mg/L brometo de etídio. As amostras foram submetidas à eletroforese em sistema horizontal contendo TBE durante 50 minutos a 100 V e 400 mA. Os géis foram visualizados em transiluminador ultravioleta com longitude de onda de 302 nm (Syngene).

## **3.3 Testes de Sensibilidade a Antifúngicos**

### **3.3.1 Microdiluição**

O perfil de sensibilidade de cada amostra foi avaliado, em duplicata, segundo o sub-comitê AFST-EUCAST (NCCLS, 2002). Os resultados dos testes foram expressos em concentração inibitória mínima (MIC).

O meio de cultura usado na prova foi RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, USA), sem bicarbonato de sódio e com L-glutamina. Os antifúngicos: anfotericina B (AMB, SIGMA, St.Louis, EEUU), itraconazol (Janssen-Cilag) voriconazol e fluconazol (*Pfizer Laboratories*) foram utilizados na forma p.a.

A solução-mãe de FCZ, na concentração de 5120 mg/L, foi preparada em água destilada e as de AMB e VCZ com 1600 mg/L em DMSO (dimetilsulfóxido). As soluções de uso, para serem colocadas nas placas de microtitulação onde foram feitos os testes, foram preparadas de modo que as concentrações finais dos antifúngicos, após a adição do inóculo de

levedura, foram de 64 mg/L a 0,125 mg/L para FCZ e de 16 mg/L a 0,03 mg/L para AMB, ITZ e VCZ. Cada antifúngico foi distribuído em alíquotas de 100 µL, em uma placa de microtitulação, desde a coluna 2 até a 11, correspondendo a cada coluna, uma concentração. As placas foram congeladas à temperatura de -70 °C até o momento do uso, por período máximo de 6 meses (RODRIGUEZ-TUDELA *et al.* 2002).

Em cada placa foi possível avaliar seis amostras e duas cepas-padrão. Duas cepas-padrões (*C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019) foram usadas em todos os testes para validar os resultados (BARRY *et al.* 2000).

Para essas avaliações, um inóculo de cada amostra foi preparado como suspensão salina em concentração de 1 a  $5 \times 10^5$  ufc/mL. Alíquotas de 100 µL, de cada inóculo foram colocadas nos poços das placas contendo antifúngicos e sua concentração final foi reduzida à metade (0,5 a  $2,5 \cdot 10^5$  UFC/mL). Em cada placa foram colocados inóculos de 6 leveduras, sendo as duas últimas fileiras (G e H) destinadas às cepas-padrão, para controle interno de qualidade do teste. O controle de esterilidade, preparado em toda a coluna 1, foi feito com o meio RPMI, sem antifúngico e sem inóculo o qual serviu também, na hora da leitura, como “branco” do espectrofotômetro o qual foi utilizado na leitura dos testes. O controle de crescimento, denominado de controle positivo, foi colocado na coluna 12, sendo preparado com 100 µL de RPMI e 100 µL de inóculo. As placas foram tampadas e incubadas a 35 °C, em estufa incubadora. A leitura de turbidez, resultante do crescimento das amostras, foi realizada às 24h. A absorbância dos orifícios foi lida em espectrofotômetro (TITERTEK MULTISCAN, FLOW, Suécia) sob filtro de 492 nm e os valores foram registrados em impressora, para posterior compilação e análise de resultados. O ponto de leitura ou “*endpoint*”, que indica a concentração inibitória mínima (MIC) de FCZ, ITZ e VCZ foi o que permitiu inibição de 50% do crescimento (“*inhibition concentration*” ou IC50) de cada amostra de leveduras, em relação ao seu controle positivo. Para AMB o ponto de leitura foi o que inibiu 90% (IC90) do crescimento de cada amostra

Resistência *in vitro* foi definida como segue: MICs de AMB  $\geq 2$  mg/L (NGUYEN *et al.*, 1998), MICs de ITZ  $\geq 1$ mg/L, MICs de FCZ  $\geq 8$  mg/L (CUESTA *et al.*, 2009) e MICs de VCZ  $\geq 0,5$ mg/L ([www.eucast.es](http://www.eucast.es)). Para



casposfungina valores de MIC  $\geq 2$  mg/L foram usados para classificar isolados não-sensíveis (CLSI, 2008). Os *breakpoints* constam na tabela 2.

Tabela 2. Valores de *breakpoints* para quatro antifúngicos segundo duas metodologias de referência

Antifúngico	Fonte	Sensível (mg/L)	S-DD/Intermediário (mg/L)	Resistente (mg/L)
	AFST-EUCAST*	$\leq 2$	4	$> 4$
Fluconazol	CLSI**	$\leq 8$	16-32	$\geq 64$
Itraconazol	CLSI	$\leq 0,125$	0,25-0,5	$\geq 1$
	AFST-EUCAST*	$\leq 0,125$	-	$>0,125$
Voriconazol	CLSI	$\leq 1$	2	$\geq 4$
Anfotericina B	Nolte <i>et al.</i> , 1997	-	-	$\geq 2$

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*

### 3.3.2 Curvas de morte

As culturas foram cultivadas duas vezes em placas de ágar dextrose batata, previamente, aos testes de curva de morte, segundo recomendado por Klepser *et al.* (1997). Três a cinco colônias, após crescimento de 24-48 h na placa, foram suspensas em 9 mL de água estéril. A suspensão foi ajustada, de acordo à mesma turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente  $1.10^6$  ufc/mL a  $5.10^6$  ufc/mL). Um mililitro da suspensão ajustada foi adicionada a 9 mL de RPMI 1640 tamponado com tampão MOPS. Isso resultou em diluição da suspensão fúngica em 1:10, tornando-a com  $1.10^5$  a  $5.10^5$  ufc/mL. O inóculo foi também transferido à solução de 1 mg/L de AMB (diluição 1:10). Alíquotas de 30  $\mu$ L dessa suspensão foram plaqueadas em ágar batata e incubadas a 35°C. Este procedimento

caracterizou o tempo zero (T<sub>0</sub>) de reação, ou seja, antes do início da incubação do inoculo com a droga. Em tempos pré-determinados, de 4h, 8h, 24h, 12h e 48h, alíquotas de 100- $\mu$ L foram removidas da suspensão contendo inoculo e AMB, diluídas em RPMI (1:10) e plaqueadas como descrito por Szabó *et. al.* 2004. Esses procedimentos constituíram, respectivamente, os tempos T<sub>4</sub>, T<sub>8</sub>, T<sub>12</sub>, T<sub>24</sub> e T<sub>48</sub>. Após 48h de incubação a 35°C, as colônias foram contadas para elaboração da curva de morte.

Contagem mínima de 1000 ufc/mL foi garantida no tempo inicial (T<sub>zero</sub>=T<sub>0</sub>) para validação do teste para cada inoculo. O tempo para alcançar  $\geq 99,9\%$  ( $3\log_{10}$ ) de redução do inóculo inicial foi determinado para cada isolado (Pearson *et al.* 1980). Atividade fungicida (*endpoint* da reação) foi considerada quando o número de unidades formadoras de colônias (ufc) por mililitro foi  $< 99,9\%$ , quando comparada ao tamanho do inóculo inicial sem a droga. Controle-positivo de crescimento do inóculo foi preparado em solução de RPMI sem adição de AMB e, do mesmo modo, foi preparado de T<sub>0</sub> a T<sub>48</sub>.

A contagem ( $\log_{10}$  do número de ufc/mL) versus tempo foi inserida em gráficos, para estudo de comparações da atividade antifúngica. Uma curva de morte *versus* tempo foi feita para cada isolado e comparado com o valor de MIC. Uma curva de morte com valores médios, contemplando todas as amostras, foi elaborada e comparada com a curva do controle-positivo. A técnica permitiu estimar, de forma dinâmica, a ação fungicida da AMB, ou seja, a diminuição no número de fungos viáveis ao longo do tempo.

#### **4 Forma de análise dos resultados**

Os resultados foram analisados segundo frequência das espécies, valores de MIC para cada antifúngico. Os resultados de MIC em termos de valores brutos e categorias de sensibilidade (sensível, sensibilidade dependente da dose/intermediária, resistente, não-sensível). Os parâmetros de valor médio, valor modal, MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub>, definidos, respectivamente, como a concentração do fármaco necessária para inibir 50% e 90% das amostras analisadas também serão calculados.

## 5 Resultados

Neste estudo foram avaliados 100 isolados, previamente, identificados em espécie por métodos fenotípicos, sendo distribuídos em: *C. albicans* (44); *C. parapsilosis* (complexo *C. parapsilosis*) (37), *C. tropicalis* (13), *C. glabrata* (5) e *C. krusei* (1). A identificação molecular foi realizada apenas nas amostras de *C. albicans* e *C. parapsilosis*.

Dentre os 44 isolados de infecção de corrente sanguínea, da coleção de cultura do HU-UFMS, identificados fenotipicamente como *C. albicans*, nenhum foi classificado, molecularmente, como *C. dubliniensis*. Um exemplo de três isolados clínicos identificados como *C. albicans*, consta da Figura 6, em que CDU 2/ NL4CAL é *primer* de *C. dubliniensis* e CAL5/ NL4CAL é *primer* de *C. albicans*.

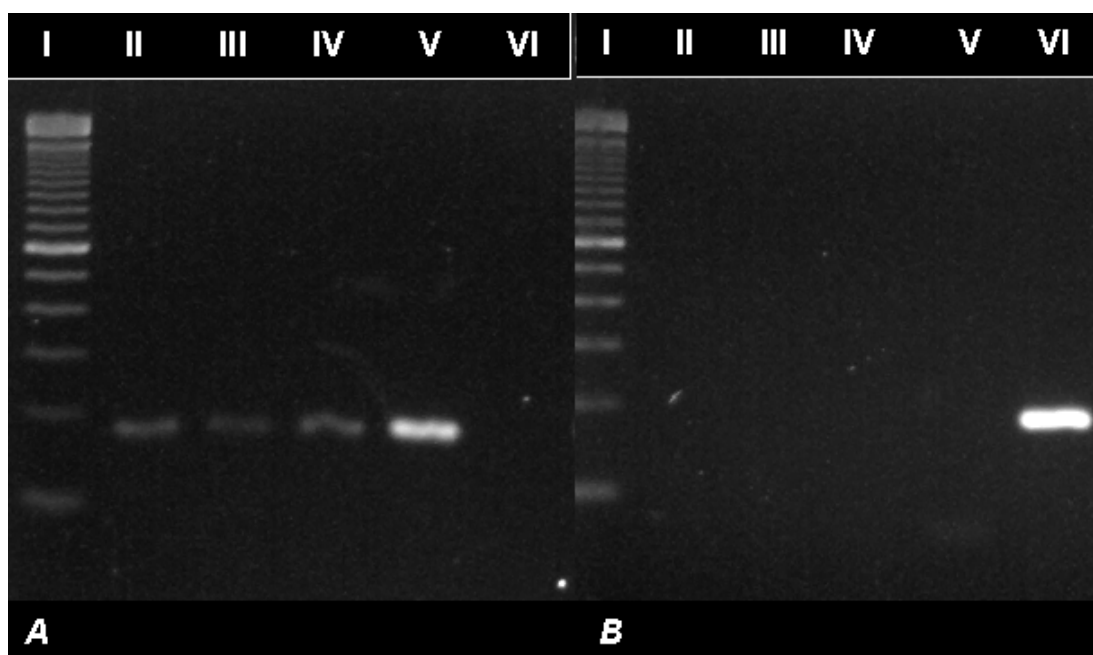


Figura 6. Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com: A- pares de *primers* CDU2/NL4CAL para *C. dubliniensis* e B- CAL5/NL4CAL para *C. albicans*, onde: I – marcador molecular com 100 pares de base e II a IV – *C. albicans*, V - *C. albicans* ATCC 90028, VI - *C. dubliniensis* CBS 9768

Os 37 isolados caracterizados, fenotipicamente, como *C. parapsilosis* foram confirmados por PCR. O teste de PCR-RFLP permitiu identificar 3 (8%) de cepas como *C. orthopsilosis* e ausência de *C. metapsilosis* nas 37 amostras (Figura 7). A frequência das espécies com a identificação molecular pode ser avaliada na Figura 8.

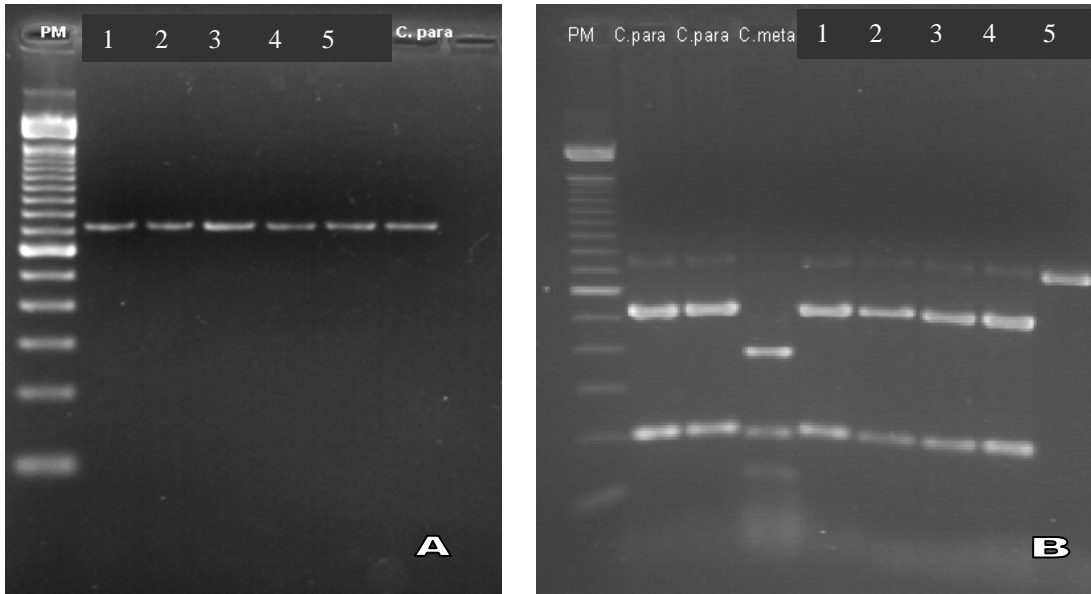
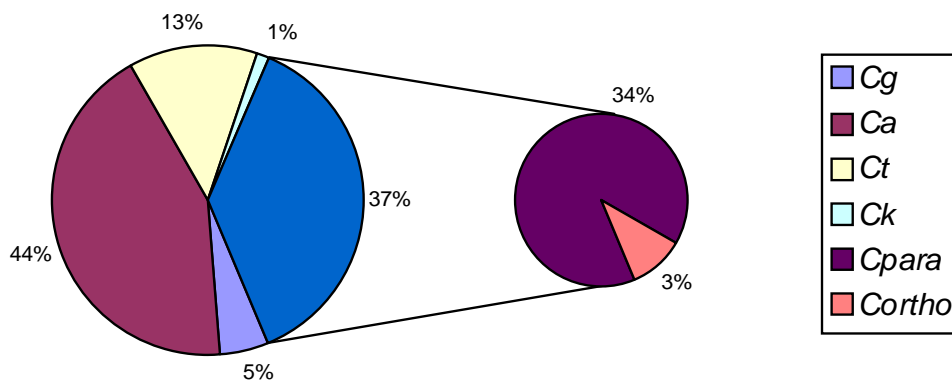


Figura 7. Análise eletroforética em gel de agarose dos produtos de PCR, onde PM: marcador molecular com 100 pares de base, C.para, *C. parapsilosis* ATCC 22019, C.meta, *C. metapsilosis* ATCC 96144 e C.ortho, *C. orthopsilosis*. Gel A: PCR com amostras 1 a 5 de 716 pb característica do complexo *C. parapsilosis*. Gel B: PCR-RFLP com amostras 1 a 4 características de *C. parapsilosis* e amostra 5 de *C. orthopsilosis*



**Cg**, *Candida glabrata*; **Ca**, *Candida albicans*; **Ct**, *Cândida tropicalis*; **Ck**, *Cândida krusei*; **Cpara**, *Cândida parapsilosis*; **Cortho**, *Candida orthopsilosis*

Figura 8. Frequência de espécies de 100 agentes de infecção de corrente sanguínea em Hospital Universitário de Campo Grande, MS, 1998-2007

O perfil de sensibilidade das 100 cepas foi analisado frente a quatro antifúngicos: fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B. Para caspofungina foram realizados ensaios, apenas, com *C. parapsilosis*. Desde que, as análises foram realizadas em duplicata, o total de testes de microdiluição executados foi de 874, além de 294 testes executados com as cepas-padrão. Os resultados de MIC constam do Apêndice 1 e a suscetibilidade das 100 amostras frente a fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B pode ser observada na Tabela 3 e Figura 9. A atividade de fluconazol contra as distintas espécies consta da Tabela 4 e Figura 10, assim como a de itraconazol está na Tabela 5 e Figura 11, a de voriconazol na Tabela 6 e Figura 12 e a de anfotericina B na Tabela 7 e Figura 13.

A suscetibilidade de todas as 100 amostras, frente a fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B foram analisados sob os parâmetros de intervalo, moda, MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> (Tabela 8). Os valores máximos (MIC, 4 mg/L) de fluconazol foram encontrados para *C. parapsilosis*, assim como foi observado o maior valor (MIC 0,5 mg/L) de voriconazol para *C. krusei*. Valores modais para fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B, foram respectivamente de: 0,25 mg/L, 0,015 mg/L, 0,015 mg/L e 0,12 mg/L para *C. albicans*, de 0,5 mg/L, 0,015 mg/L, 0,015 mg/L e 0,25 mg/L para *C. parapsilosis* e de 0,25 mg/L, 0,03 mg/L, 0,06 mg/L e 0,5 mg/L para *C. tropicalis*. Os valores de MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub>, respectivamente, para fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B foram: 0,25 mg/L/0,5 mg/L, 0,015 mg/L/0,03 mg/L, 0,015 mg/L /0,03 mg/L e 0,12 mg/L/ 0,5 mg/L frente a *C. albicans*, de 0,5 mg/L/1 mg/L, 0,03 mg/L/0,03 mg/L, 0,015 mg/L/0,03 mg/L e 0,25 mg/L/ 0,5 mg/L para *C. parapsilosis* e de 0,25 mg/L / 1 mg/L, 0,06 mg/L/ 0,12 mg/L, 0,03 mg/L/0,03 mg/L e 0,25 mg/L / 0,5 mg/L para *C. tropicalis*. Para o único isolado de *C. krusei* foram encontrados MICs de fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B, respectivamente, de 64 mg/L, 0,25 mg/L, 0,5 mg/L e 0,5 mg/L.

Dentre os isolados de *C. parapsilosis* foi encontrado um resistente a voriconazol e que foi menos sensível ao fluconazol (4 mg/L) e o único isolado de *C. krusei*, espécie intrinsecamente resistente ao fluconazol foi também resistente ao voriconazol (MIC 0,5 mg/L).

Os valores de MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> de caspofungina para os 34 isolados de *C. parapsilosis*, foram, respectivamente de: 0,5 mg/L e 1 mg/L, valor modal de 0,5 mg/L e média de 0,6 mg/L. O MIC de caspofungina para as 3 cepas de *C. orthopsilosis* variaram de 0,25mg/L a 0,5 mg/L.

Tabela 3. Suscetibilidade (MIC, mg/L) de 100 isolados de *Candida* spp. agentes de infecção de corrente sanguínea frente a fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B.

MIC (mg/L) antifúngico	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
Fluconazol	0	0	0	14	34	28	19	1	3	0	0	0	1
Itraconazol	57	24	7	11	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Voriconazol	70	22	6	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Anfotericina B	2	3	11	27	32	25	0	0	0	0	0	0	0

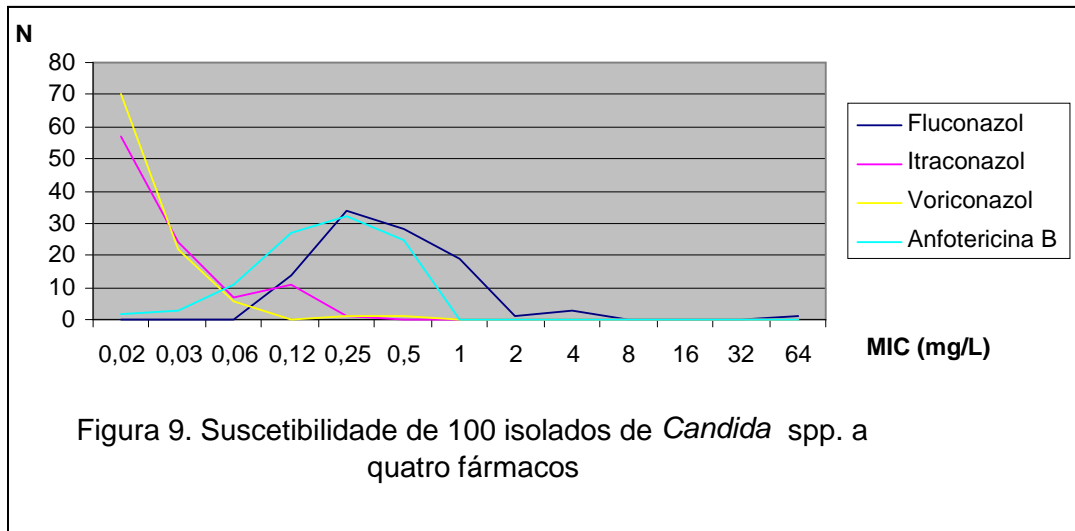


Tabela 4. Suscetibilidade (MIC, mg/L) de 100 isolados de *Candida* spp. agentes de infecção de corrente sanguínea frente ao fluconazol

espécie	MIC (MG/L)	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
<i>Candida albicans</i> (44)		14	23	4	3	0	0	0	0	0	0
<i>Candida parapsilosis</i> (37)		0	4	19	12	0	2	0	0	0	0
<i>Candida tropicalis</i> (13)		0	7	3	2	1	0	0	0	0	0
<i>Candida glabrata</i> (5)		0	0	2	2	0	1	0	0	0	0
<i>Candida krusei</i> (1)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Total		14	34	28	19	1	3	0	0	0	1

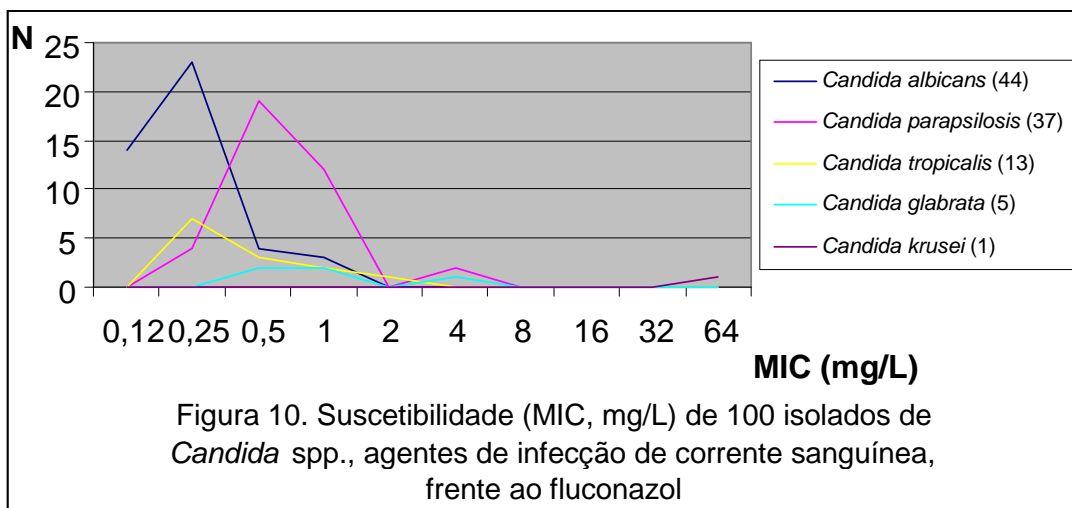
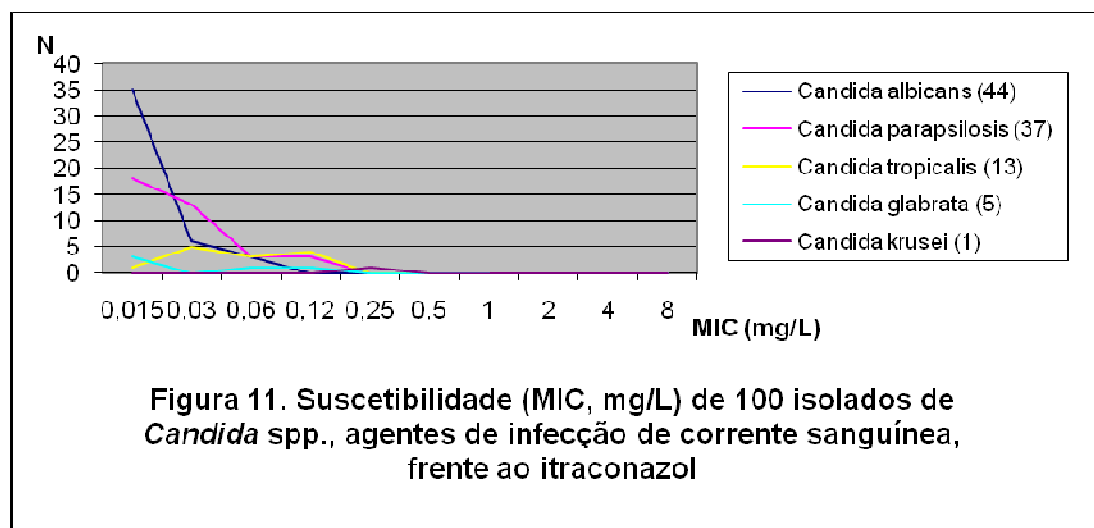


Tabela 5. Suscetibilidade (MIC, mg/L) de 100 isolados de *Candida* spp. agentes de infecção de corrente sanguínea frente ao itraconazol

MIC (mg/L)	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8
<i>Candida albicans</i> (44)	35	6	3	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida parapsilosis</i> (37)	18	13	3	3	0	0	0	0	0	0
<i>Candida tropicalis</i> (13)	1	5	3	4	0	0	0	0	0	0
<i>Candida glabrata</i> (5)	3	0	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Candida krusei</i> (1)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Total	58	24	10	7	1	0	0	0	0	0



**Tabela 6. Suscetibilidade (MIC, mg/L) de 100 isolados de *Candida* spp. agentes de infecção de corrente sanguínea frente ao voriconazol**

espécie	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8
<i>Candida albicans</i> (44)	38	6	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida parapsilosis</i> (37)	26	10	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Candida tropicalis</i> (13)	2	5	6	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida glabrata</i> (5)	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida krusei</i> (1)	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>70</b>	<b>22</b>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

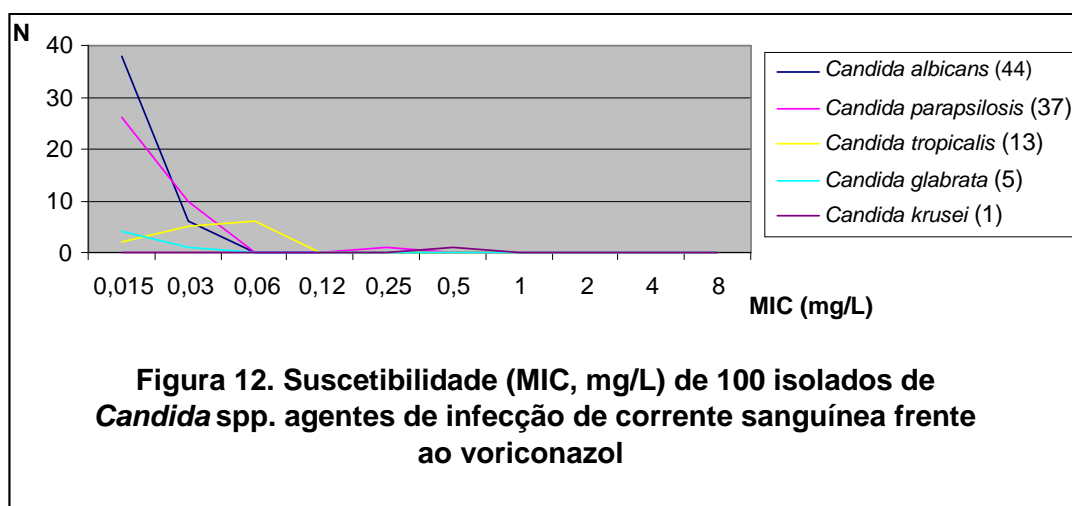




Tabela 7. Suscetibilidade (MIC, mg/L) de 100 isolados de *Candida* spp. agentes de infecção de corrente sanguínea frente ao anfotericina B.

MIC (mg/L) espécie	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8
<i>Candida albicans</i> (44)	0	0	7	19	9	9	0	0	0	0
<i>Candida parapsilosis</i> (37)	0	1	2	5	21	8	0	0	0	0
<i>Candida tropicalis</i> (13)	0	1	2	2	8	0	0	0	0	0
<i>Candida glabrata</i> (4)	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Candida krusei</i> (1)	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>12</b>	<b>27</b>	<b>38</b>	<b>18</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

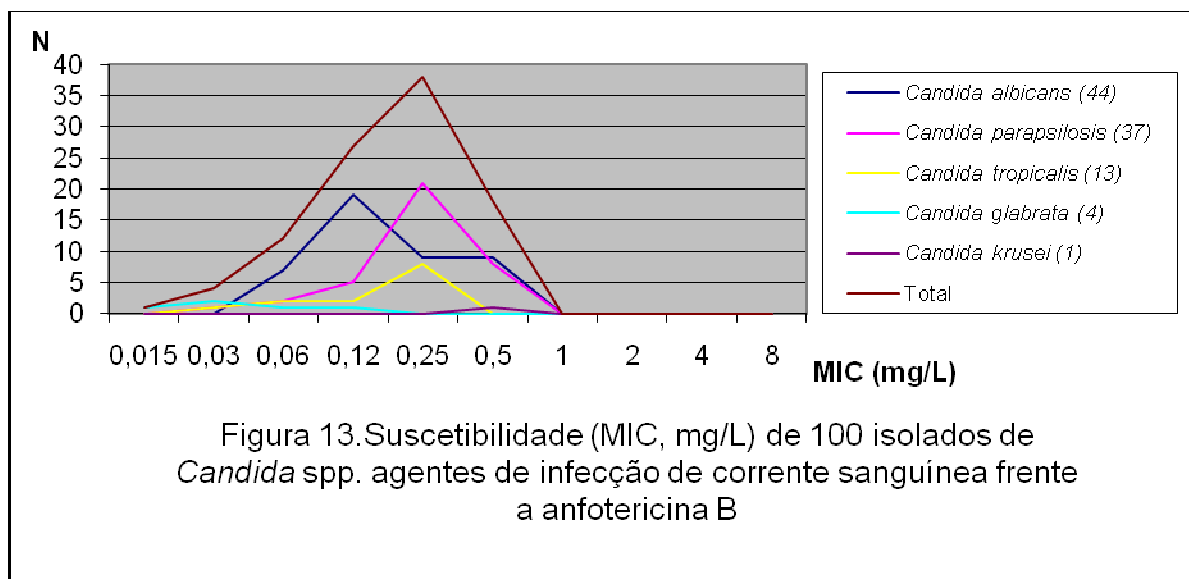
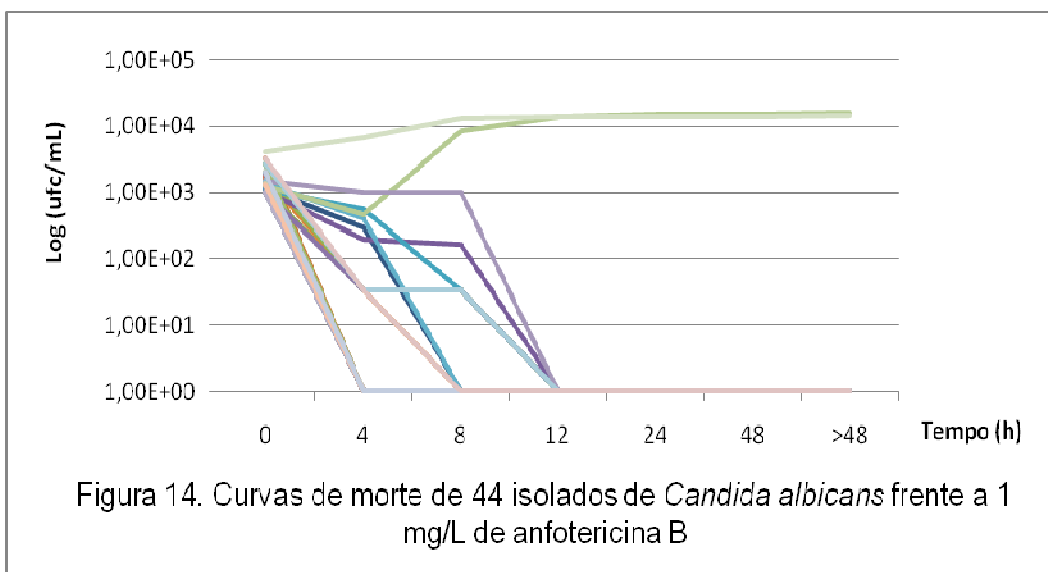


Tabela 8. Concentração inibitória mínima (MIC, mg/L) de antifúngicos frente a quatro espécies agentes de candidemia, HU, Campo Grande, MS.

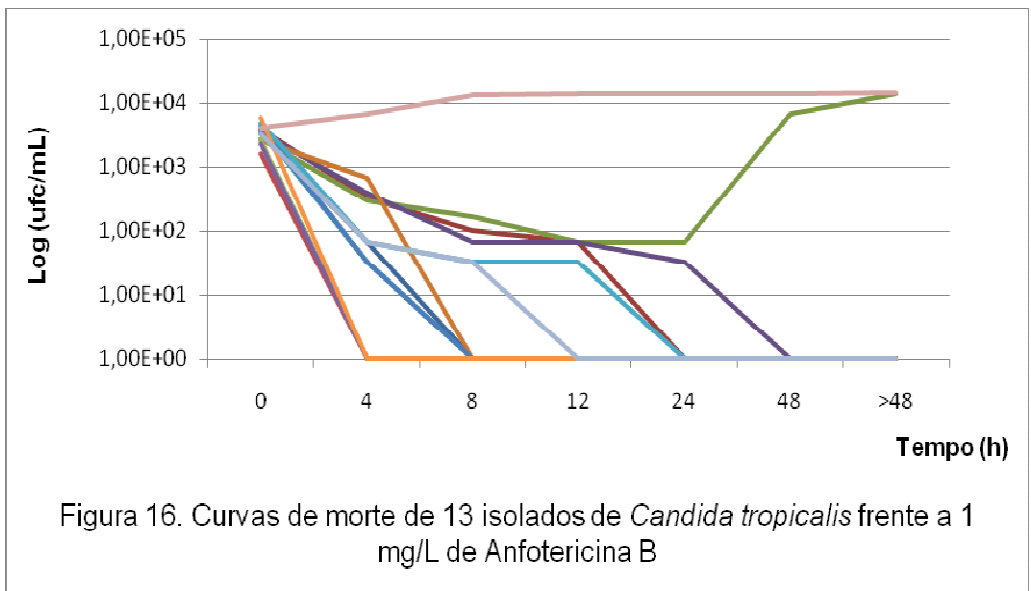
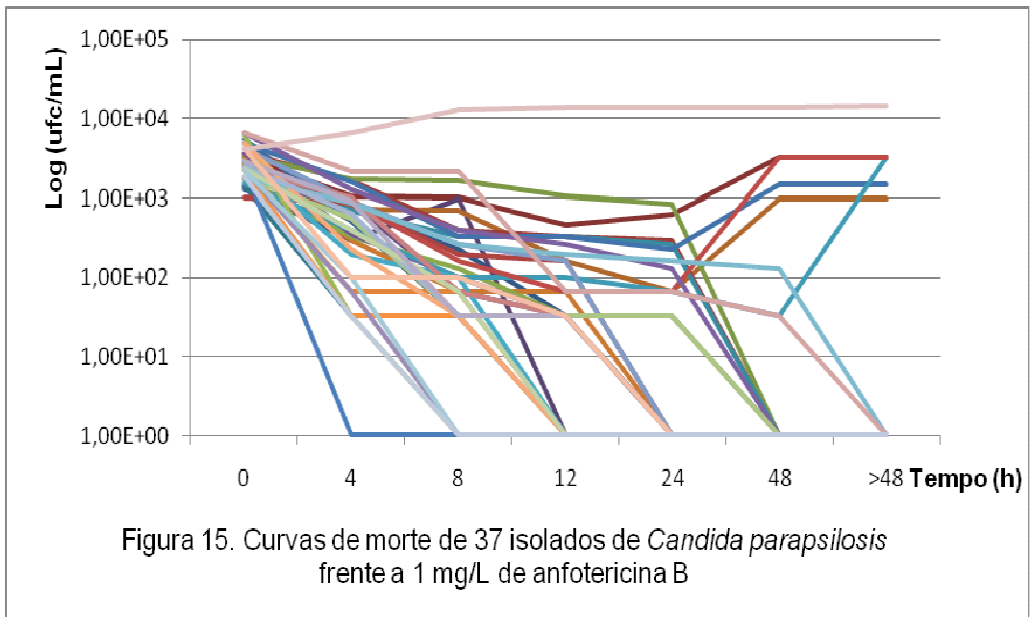
Antifúngico	Fluconazol				Itraconazol				Voriconazol				Anfotericina B			
	Int.	Moda	MIC 50	MIC 90	Int.	Moda	MIC 50	MIC 90	Int.	Moda	MIC 50	MIC 90	Int.	Moda	MIC 50	MIC 90
<i>C. albicans</i> (44)	0,12-1	0,25	0,25	0,5	0,015-0,12	0,015	0,015	0,03	0,015-0,03	0,015	0,015	0,03	0,06-0,25	0,12	0,12	0,5
<i>C. parapsilosis</i> (37)	0,25-4	0,5	0,5	1	0,015-0,12	0,015	0,03	0,03	0,015-0,25	0,015	0,015	0,03	0,03-0,5	0,25	0,25	0,5
<i>C. glabrata</i> (5)	0,5-4	0,5	--	--	0,015-0,06	0,015	--	--	0,015-0,015	0,015	--	--	0,015-0,06	0,03	--	--
<i>C. tropicalis</i> (13)	0,25-2	0,25	0,12	0,5	0,015-0,12	0,03	0,03	0,12	0,03-0,06	0,06	0,06	0,06	0,12-0,5	0,5	0,5	0,5
** <i>C. krusei</i> (1)	64	*	*	*	0,25	--	--	--	0,5	--	--	--	0,5	--	--	--

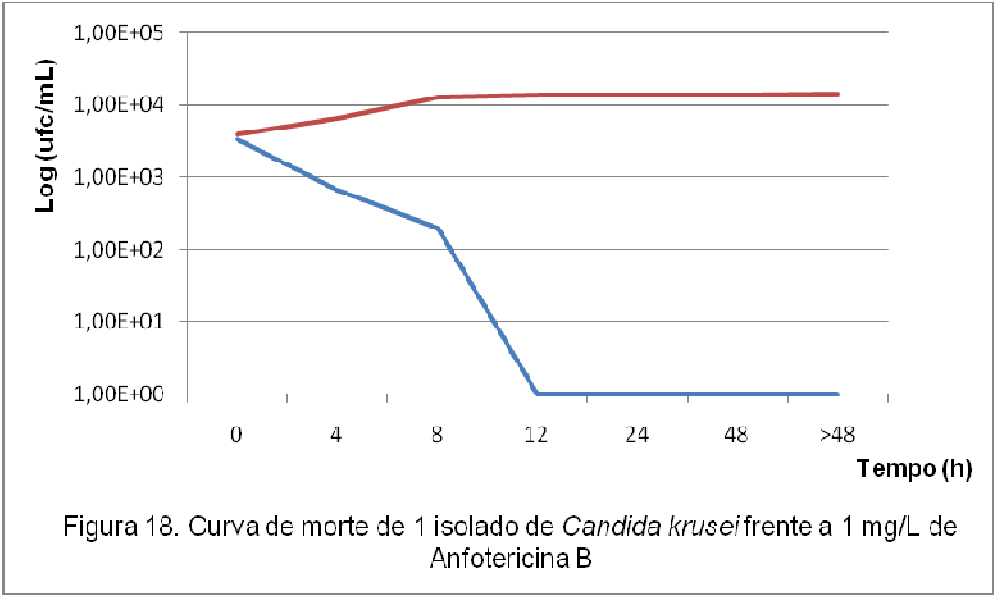
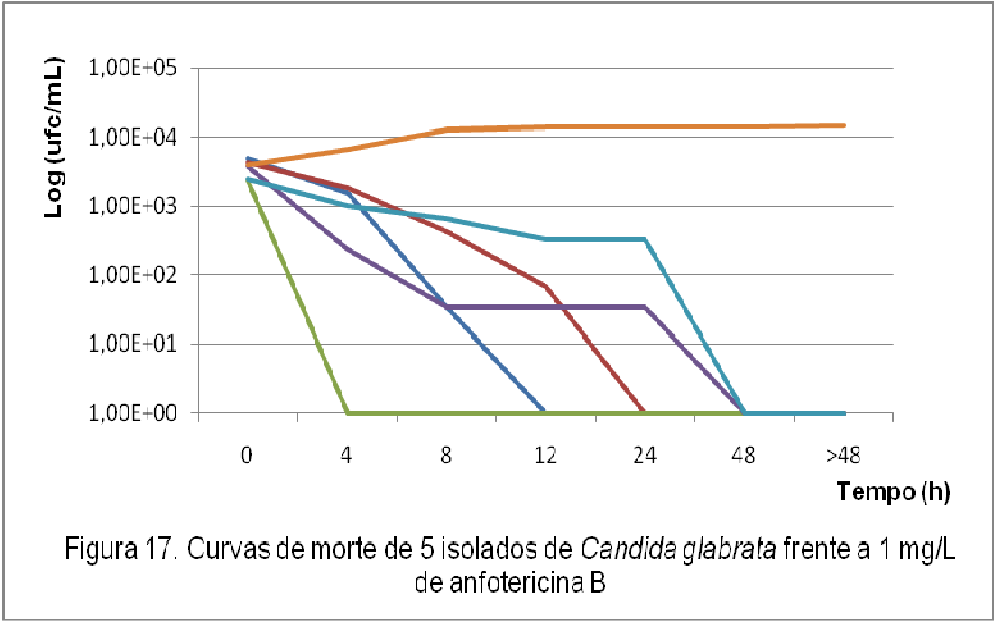
Int. intervalo.\* Breakpoints para *C. krusei* frente a fluconazol não são aplicáveis \*\* Valores únicos

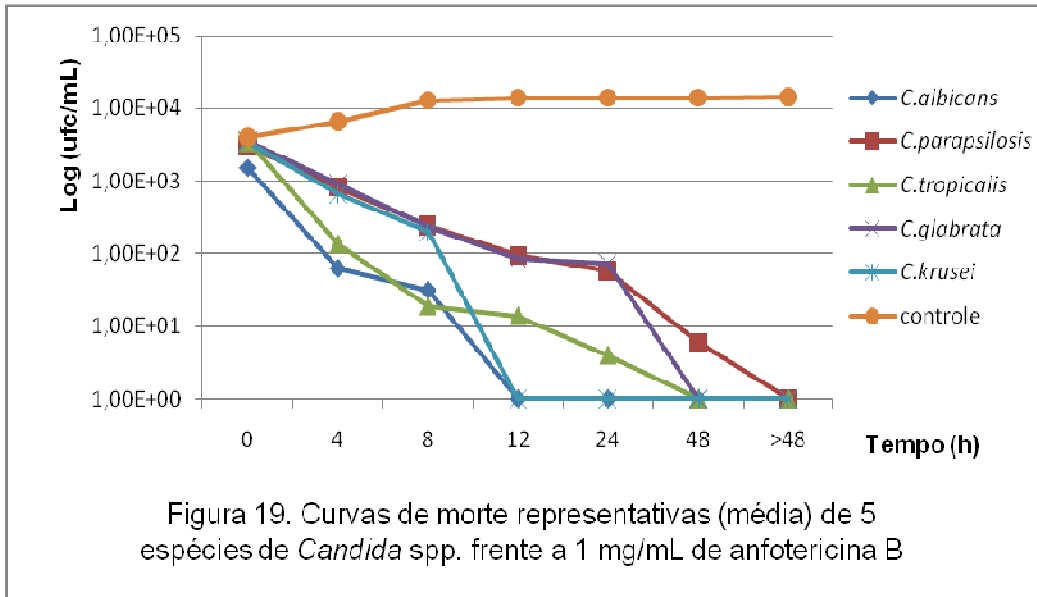
O efeito fungicida da anfotericina B à concentração de 1 mg/L sobre todos os 100 isolados foi avaliado em testes de Curvas de Morte. As contagens de ufc/mL, por tempo de exposição ao fármaco, podem ser verificadas no Apêndice 2. As ilustrações desses resultados, para cada espécie, constam na Figura 14 (*Candida albicans*), Figura 15 (*C. parapsilosis*), Figura 16 (*C. tropicalis*), Figura 17 (*C. glabrata*) e Figura 18 (*C. krusei*). Os experimentos de curvas de morte permitiram observar que 7 dos 100 isolados não sofreram ação fungicida, sendo 1 de *C. albicans* e 5 de *C. parapsilosis* e 1 *C. tropicalis*. Desse modo, em apenas 93 (93%) isolados foi possível determinar o *endpoint* fungicida. Nesse grupo foi verificado que 45 (45%) isolados retomaram crescimento, após 48 h, conforme esquema apresentado no Apêndice 3. Esse conjunto de isolados foi representado por *C. albicans* (22/44; 50%), *C. tropicalis* (9/13; 70%) e *C. parapsilosis* (4/24; 17%). A análise por espécie demonstrou que esse achado ocorreu em 70% (9/13) dos isolados de *C. tropicalis*, 50% (22/44) dos isolados de *C. albicans* e 17% (4/24) de *C. parapsilosis*.



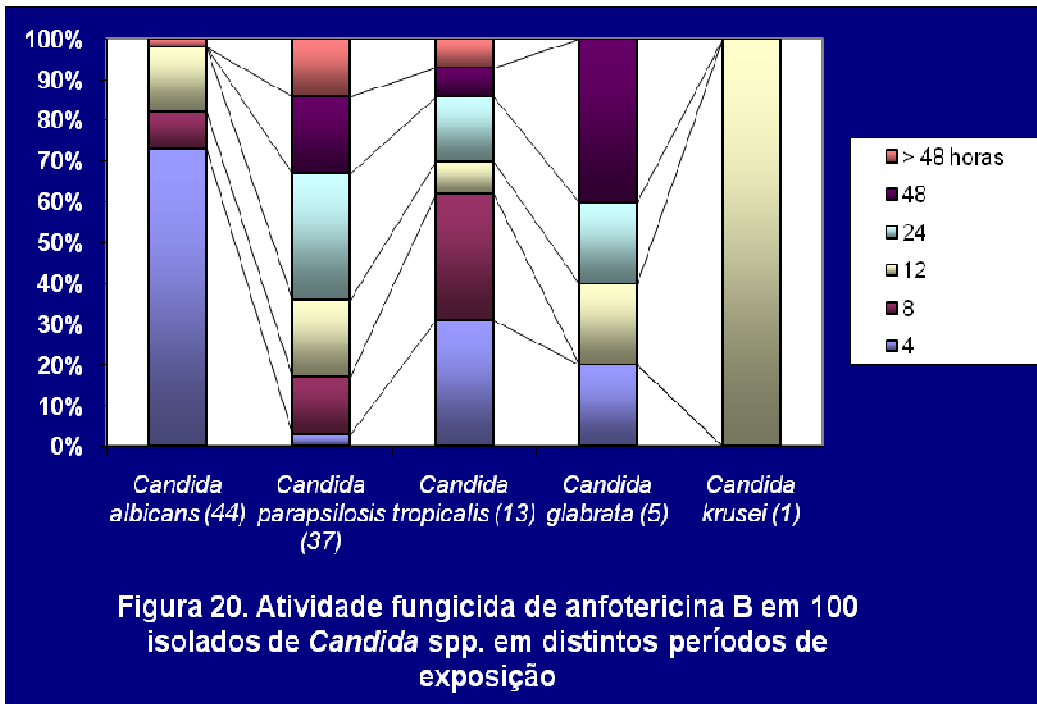
O efeito fungicida de 1 mg/L de anfotericina B sobre as 5 espécies de *Candida* spp. pode ser avaliado, comparativamente, na Figura 19. Nessa figura, uma curva representativa com valores médios foi feita para cada espécie. Na Figura 20 observa-se o tempo de exposição necessário para efeito fungicida (h) para cada espécie.







Com os resultados de suscetibilidade determinados por MIC os isolados foram classificados (Tabela 9) por valores de *breakpoints* do comitê EUCAST para as drogas azólicas e caspofungina. Para anfotericina B, visto a ausência de *breakpoints*, a classificação foi segundo recomendação de Nolte *et al.* 1997.



**Tabela 9. Classificação de 94 isolados de *Candida* spp. frente a fármacos azólicos e anfotericina B**

Antifúngico Espécies	<u>Fluconazol</u>				<u>Itraconazol</u>				<u>Voriconazol</u>				<u>Anfotericina B</u>			
	S	I	R		S	I	R		S	I	R		S	I	R	
<i>C. albicans</i> (44)	44	0	0		44	0	0		44	0	0		44	0	0	
<i>C. parapsilosis</i> (34)	32	2	0		34	0	0		33	0	1		34	0	0	
<i>C. orthopsilosis</i> (3)	3	0	0		3	0	0		3	0	0		3	0	0	
<i>C. tropicalis</i> (13)	13	0	0		13	0	0		13	0	0		13	0	0	

## 6 Discussão

Candidemia é um quadro grave, não somente pelas altas taxas de mortalidade, mas também, pelo aumento do tempo de hospitalização e incremento dos custos hospitalares (HORN *et al.* 2009). A escolha da terapia antifúngica mais adequada para tratar os casos de candidemia depende do conhecimento da epidemiologia local, incluindo os agentes etiológicos mais frequentes e seu perfil de sensibilidade. São descritas variações temporais dos agentes causadores de candidemia dentro da mesma instituição e, portanto, o monitoramento contínuo pode auxiliar na conduta clínica para tratamento empírico ou profilático (BASSETTI *et al.* 2006; DIMOPOULOS *et al.* 2009). Dada a sobriedade, cada vez maior, de população de neonatos de baixo peso, de pacientes imunocomprometidos e outros sob risco de candidemia, prevê-se aumento do número de infecções causadas por espécies de leveduras, anteriormente consideradas incomuns e/ou não-patogênicas (ODDS *et al.*, 2007, PFALLER *et al.* 2008). No mundo todo é grande a preocupação sobre o aparecimento ou incremento de espécies menos sensíveis aos antifúngicos (DIMOPOULOS *et al.* 2009). A intensificação dos esforços para identificar, adequadamente, as espécies invasivas de *Candida* spp. como um procedimento básico em distintas regiões do globo é a prova da importância desse tema.

Este estudo analisou os agentes de candidemia e perfis de sensibilidade antifúngica, no período de 1998 a 2007, em hospital terciário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, situado na cidade de Campo Grande, MS. Na coleção avaliada neste estudo, 44% dos agentes isolados de corrente sanguínea foi identificado, fenotipicamente, como *C. albicans* e este achado foi confirmado por métodos moleculares. Apenas as técnicas de biologia molecular, permitem a identificação precisa da cepa infectante e, nos dias de hoje, podem confirmar a ocorrência de *C. dubliniensis* em fenótipos de *C. albicans* por técnica de PCR, com uso de *primers* espécie-específicos e amplificação dos fragmentos resultantes.

*Candida dubliniensis* têm sua importância pelo potencial em desenvolver resistência ao fluconazol. A pesquisa desta espécie, por ferramenta molecular acurada, realizada neste estudo foi negativa. Dentre as 44 amostras,



fenotipicamente, identificadas como *C. albicans*, nenhuma foi re-classificada por restrição gene-específica como *C. dubliniensis*. Este dado conflita com os resultados de Dimopoulos *et al.* (2009) que em estudo de 10 anos na Grécia, isolaram 8,8% de *C. dubliniensis* em 135 amostras de hemocultura. Interessante ressaltar que o encontro dessa espécie ocorreu apenas nos primeiros 5 anos do estudo (1997-2001), sem explicação para tal achado.

A prevalência de *Candida dubliniensis* é frequentemente relacionada com infecções de mucosa oral, no entanto essa espécie tem sido, regularmente, encontrada causando candidemias desde 1999 por Meis *et al.* (TORTORANO *et al.* 2004; KIBBLER *et al.* 2005;). A grande maioria dos estudos em que *C. dubliniensis* foi identificada por metodologia validada, indica porcentagens baixas na frequência dessa espécie. No estudo de Odds *et al.* (2007), 7 casos (3%) tinham a espécie como agente causal, representando 5,7% dos isolados identificados como *C. albicans*. Horn *et al.* (2009) em 2019 cepas isoladas de hemoculturas de casos do Canadá, identificaram 0,35% de *C. dubliniensis*, taxa semelhante a descrita a diversos estudos (0,5%) realizados nos distintos continentes, conforme revisão de Messer *et al.* (2009). Estes relatos confirmam a raridade de *C. dubliniensis* como agente de candidemias.

Trabalhos realizados em distintas regiões da América do Sul confirmam a tendência internacional de *Candida albicans* ser a espécie mais prevalente (SANDVEN *et al.* 1998; GODOY *et al.* 2003; SILVA *et al.* 2004; RUIZ *et al.* 2005; REGONASHI 2006; COLOMBO 2006; MEDRANO *et al.* 2006; MATTA *et al.*, 2007). No Brasil, a prevalência de *C. albicans* varia muito, de 13% a 60%, devido a diversos fatores, incluindo até questões técnicas, como metodologia de isolamento e identificação (CHANG 2003; MELHEM 2004). A menor frequência de *C. albicans* foi descrita, recentemente, por Pereira *et al.* (2010) que estudaram 53 casos de candidemia, sendo que apenas 18% foi causado por *C. albicans*. *Candida parapsilosis* e *C. tropicalis* (26% cada espécie), foram as mais isoladas, seguidas de *C. guilliermondii* (6%), *C. krusei* e *C. glabrata* (4% cada), *C. zeylanoides* e *C. kefyr* (2% cada). Algumas publicações nacionais prévias também mostraram *C. albicans*, em frequência menor (≈40%) do que a

soma das outras espécies (COLOMBO *et al.* 2003; RUIZ *et al.* 2005; MATTA *et al.* 2007).

*Candida parapsilosis* é a espécie não-*C. albicans* mais comum isolada de hemoculturas na maioria do mundo com exceção da América do Norte. Estudos brasileiros mostram *C. parapsilosis* sendo segundo, ou terceiro, agente mais comum em candidemias, como o de Pereira *et al.* 2010 (26%), o de Matta *et al.* 2007 (23,8%) e de Colombo *et al.* 2006 (20,5%). Essa espécie representa 6.6% de 141.383 isolados de *Candida* compilados entre 2001 a 2005 pelo Programa ARTEMIS (ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program) e foi o mais comum na América do Norte (14,3%) e América Latina (9,9%) (PFALLER *et al.* 2008). Na França, um estudo recente mostrou menores taxas de *C. parapsilosis* (7,5%), que ocupou a 3ª posição entre os agentes de candidemia, após *C. albicans* e *C. glabrata* (LEROY *et al.* 2009).

A frequência de candidíase invasiva por *Candida parapsilosis* tem aumentado nos últimos anos, especialmente na Espanha e América Latina, em particular, no Brasil e, por isso, é grande o interesse em identificar acuradamente as espécies desse complexo nessas regiões (PFALLER *et al.* 2008; PEREIRA *et al.* 2009). Dentre os 37 fenótipos de *C. parapsilosis* submetidos à reação de PCR-RFLP, três (8%) foram classificadas como *C. orthopsilosis*. Essa taxa é inferior a descrita (15%) por Tavanti *et al.* 2007 em 13 casos de candidemia na Itália e é inferior a encontrada (~23%) na Malásia por Tay *et al.* 2009. Essa espécie foi relacionada a, pelo menos, dois surtos de infecção hospitalar; o primeiro deles ocorreu em San Antonio (EUA) e foi relatado por Lin *et al.* (1995) e, posteriormente, outro foi observado no Brasil e descrito por Zancopé-Oliveira *et al.* (2000). Na Malásia, Yong *et al.* (2008) isolaram 10 amostras de *C. orthopsilosis* em uma única unidade hospitalar no mesmo ano mas, devido à ausência de dados clínicos e moleculares das cepas não foi confirmada ocorrência de surto. Do mesmo modo, inúmeros outros episódios semelhantes, relacionados a *C. parapsilosis*, não foram investigados com ferramentas moleculares capazes de distinguir o agente dentro das três espécies e, portanto, muitos deles poderiam ter sido causados por *C. orthopsilosis* ou *C. metapsilosis* (SILVA *et al.* 2009).

Nenhum isolado correspondeu ao perfil molecular de *C. metapsilosis*. Poucos estudos descrevem a distribuição exata das novas espécies de *C. parapsilosis* como agentes de candidemia para maiores comparações (LOCKHART *et al.* 2008; TAY *et al.* 2009; ASADZADEH *et al.* 2009). Em todos eles a incidência de *C. parapsilosis* em hemoculturas é maior, em relação às demais espécies. Silva *et al.* (2009), em Portugal, e Odds *et al.* (2007) na Escócia encontraram apenas essa espécie, dentre isolados identificados fenotipicamente como *C. parapsilosis*. Raros estudos descreveram *Candida metapsilosis* de hemoculturas, sempre em taxas baixas (0,5% a 4,8%) (KOCSUBE´ *et al.* 2007; LOCKHART *et al.* 2008; GOMEZ-LOPES *et al.* 2008).

As 13 amostras identificadas como *C. tropicalis*, a terceira espécie mais freqüente neste estudo (13%) mostra sua grande importância como agente de candidemia no Brasil, fato mostrado em estudos prévios, como os de Pereira *et al.* 2010 (26%), Matta *et al.*, 2007 (24,3%), Colombo *et al.*, 2006 (20,9%), Ruiz *et al.*, 2005 e Goldani *et al.*, 2006.

Outras espécies como *C. glabrata* e *C. krusei* foram encontrados em menores taxas, como ocorre em outros estudos nacionais, diferentemente do que está descrito para Europa e países Norte Americanos com alta prevalência de *C. glabrata*. *Candida glabrata* na América do Norte e Europa, ocupa o segundo lugar, com taxas ao redor de 17% a 20% (Odds *et al.* 2007; Leroy *et al.* 2009). A taxa baixa de 5% de *C. glabrata* está de acordo com os dados apresentados no programa ARTEMIS DISK, em que PFALLER *et al.* (2010) analisaram a incidência desse agente, durante sete anos, concluindo que este foi o mais frequentemente isolado na América do Norte (21,1% dentre todas as espécies) e o menos freqüente na América Latina (7,4%). Interessante notar que, a freqüência encontrada nesse estudo diferiu, de forma significativa, em cada uma das cinco regiões estudadas e variou de 2,1% (Indonésia) a 34,7% (Austrália) na Ásia; 3,1% (Turquia) a 27,9% (Alemanha) na Europa; de 7,2% (África do Sul) a 14,0% (Arábia Saudita) na África e 3,4% (México) a 11,3% (Brasil) na América do Sul.

A freqüência de *Candida krusei* nesta dissertação (1%) está de acordo com o esperado, desde que esta espécie é pouco incidente (0 a 4,5%) em casuísticas de hemoculturas, tanto nacionais (FRANÇA *et al.* 2008;

HINRICHSEN *et al.* 2008), quanto internacionais (PFALLER *et al.* 2007; MESSER *et al.* 2009; SWINNE *et al.* 2009; JUNG *et al.* 2010).

Como *Candida albicans* foi o agente de maior frequência dentre os estudados nesta dissertação e, assim como enfatizado por outros estudos brasileiros, é justificada a preocupação de ser monitorada sua suscetibilidade aos antifúngicos (RUIZ *et al.* 2005; COLOMBO *et al.* 2006; GOLDANI *et al.* 2006; MATTA *et al.* 2007). A análise do perfil de sensibilidade de *C. albicans* a fluconazol, o fármaco recomendado para casos de candidemia e medicamentos análogos, como voriconazol e itraconazol, além do polieno anfotericina B, confirmou a ausência de resistência nessa espécie.

O intervalo de MIC de fluconazol (0,12 mg/L a 1 mg/L) para *Candida albicans*, caracteriza ausência de cepas resistentes e situando-se dentro dos valores comumente encontrado em distintos estudos internacionais (REX *et al.* 1993; PAPPAS *et al.* 2004, RODRIGUEZ-TUDELA *et al.* 2007) e nacionais (MATTA *et al.* 2006; FRANÇA *et al.* 2008). Chama a atenção o estudo de Dimopoulos *et al.* (2009) que mostra valores altos (32 mg/L), raramente, descritos para essa espécie.

A sensibilidade de *C. albicans* pode ser observada, ainda, sob os parâmetros de MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub>, moda e média geométrica de MIC. Comparando-se com os dados nacionais, nota-se que esses valores são concordantes com Matta *et al.* 2007 (MIC<sub>50</sub>/MIC<sub>90</sub>=0,25mg/L/0,5mg/L). Odds *et al.* 2007 também observaram valores semelhantes (MIC<sub>50</sub>/MIC<sub>90</sub>=0,25mg/L/0,5mg/L) e equivalentes a de outros trabalhos internacionais, como os de Torres *et al.* 2008 (MIC<sub>50</sub>/MIC<sub>90</sub> = 0,25mg/L/0,25mg/L), Seifert *et al.* 2007 (MIC<sub>50</sub>/MIC<sub>90</sub> = 0,5mg/L /1mg/L) e Jung *et al.*, 2010 (MIC<sub>50</sub> / MIC<sub>90</sub> = 0,125mg/L/0,5mg/L).

Se for observado o valor de MIC para fluconazol, assim como os demais antifúngicos, frente aos isolados de *C. albicans* no período de dez anos, nota-se a manutenção do perfil de sensibilidade dessa espécie. Interessante citar o estudo de tendência, publicado por (PFALLER *et al.* 2004), que não aponta diferença temporal no perfil de sensibilidade de *C. albicans* em várias regiões do globo, frente ao fluconazol, durante vinte anos. Esses achados contribuem para a discussão apresentada por Odds *et al.* (2007) focada no impacto do amplo uso de fluconazol no aparecimento de cepas resistentes ao fármaco, em

conseqüência da pressão seletiva. Os autores concluíram, por exemplo, que a profilaxia com fluconazol causou, na América do Norte, apenas o aumento de incidência de uma espécie menos sensíveis ao fármaco (i.e. *C. glabrata*) e não o incremento de resistência em espécies, reconhecidamente, sensíveis, após leitura dos estudos de Trick *et al.* (2002) e Pfaller *et al.* (2006).

Para voriconazol, as cepas de *C. albicans* mostram-se também altamente, sensíveis, confirmando observações anteriores (REX *et al.* 1998; PAPPAS *et al.* 2004; RUIZ *et al.* 2005; MATTA *et al.* 2007; MATSUMOTO *et al.* 2007; RODRIGUEZ-TUDELA *et al.* 2007; DIMOPOULOS *et al.* 2009). Para itraconazol, *Candida albicans* também se apresentou sensível, conforme esperado e de acordo com a literatura revisada. Poucos estudos descreveram resistência a esse fármaco em cepas de *C. albicans* (DIMOPOULOS *et al.*, 2009)

Sabendo-se que essa espécie é, em regra, sensível aos antifúngicos usados na prática a confirmação da sua alta freqüência, no período de 10 anos e nas condições avaliadas, permite a implementação de um banco de dados regional. O uso empírico, ou profilático, desses medicamentos será, então, possível no futuro, frente à existência de um banco consolidado.

A avaliação da sensibilidade aos antifúngicos, mostrou que apenas duas amostras de *C. parapsilosis* frente ao fluconazol resultaram em MICs um pouco mais elevados (MIC 4 mg/L) com valor considerado intermediário segundo *breakpoint* adotado para testes com metodologia AFST-EUCAST. Esse valor de MIC é muito inferior aos encontrados (MIC 16 mg/L a 64 mg/L em 5,6%) por Silva *et al.* (2009). Esses autores encontraram resistência cruzada a outros azóis, fato que foi observado neste estudo em uma amostra de *C. parapsilosis* e também na única *C. krusei*. Outro estudo com resultados não usuais é o de Dimopoulos *et al.* (2009) que descreveram alta resistência de *C. parapsilosis* ao fluconazol (MIC 32 mg/mL).

Na ausência de outros estudos para comparação de dados de suscetibilidade de *C. parapsilosis*, foram examinados aqueles de testes de sensibilidade pela metodologia de disco-difusão. Para descrever tendências geográficas e temporais no isolamento de espécimes clínicos de *Candida*

*parapsilosis*, o Programa Artemis compilou perfis de sensibilidade de 9.371 isolados ao fluconazol e voriconazol. Altos níveis de sensibilidade tanto ao fluconazol (90,8-95,8%) e voriconazol (95,3-98,1%) foram observados em todas as regiões geográficas, com exceção da África e região do Oriente Médio (79,3% e 85,8% sensíveis ao fluconazol e voriconazol, respectivamente). Notavelmente, isolados da UTI cirúrgica foram os menos suscetíveis ao fluconazol (86,3%). Vale ressaltar que não houve nenhuma evidência de aumento da resistência aos azólicos ao longo do tempo em *C. parapsilosis* isolados no período de 2001 a 2005.

A suscetibilidade dos isolados de *C. parapsilosis* à caspofungina neste estudo foi alta, sendo encontrado valor de MIC<sub>90</sub> baixo (1mg/L) e inferior ao descrito em outros estudos, como o de Dimopoulos *et al.* (2009) que observou 2mg/L. Vale ressaltar que este valor foi maior para *C. parapsilosis* em relação ao observado em outras espécies. O efeito paradoxal muito bem descrito por Ostrosky-Zeichner *et al.* (2003) e observado por outros autores (DIMOPOULOS *et al.* 2009), caracterizado por crescimento do isolado em concentrações de equinocandinas, acima do MIC, não foi verificado neste estudo.

Foi relatada também a sensibilidade *in vitro* de infecção da corrente sanguínea (ICS) isolados de *C. parapsilosis* às equinocandinas, anidulafungina, caspofungina e micafungina. Dos isolados ensaiados contra equinocandinas, 99% foram inibidos por concentrações inferiores a 2 mg/L de caspofungina (1.447 isolados), respectivamente. *Candida parapsilosis* é um patógeno ubíquo que permanece sensível aos azólicos e equinocandinas, no entanto, a frequência do isolamento e da resistência de *C. parapsilosis* ao fluconazol e voriconazol pode variar por região geográfica ou setor hospitalar.

*Candida tropicalis*, para todos os isolados realizados (13) mostrou alta suscetibilidade a todos os antifúngicos. De modo geral, as taxas de resistência a fluconazol, nessa espécie, são muito variáveis. *Candida tropicalis* apresentou-se sensível ao FCZ (91% a 100%) de 1992 a 2001, independente da área de origem, em estudo de Pfaller *et al.* 2004.

O valor de MIC<sub>50</sub> (0,25 mg/L) de fluconazol para as amostras de *C. tropicalis* deste estudo foi equivalente ao verificado por outros autores que empregaram método CLSI ( ARTHINGTON-SKAGGS *et al.* 2002; OSTROSKY-

ZEICHNER *et al.* 2003; ZEPELIN *et al.* 2007; YANG *et al.* 2004; ODDS *et al.* 2007; MATTA *et al.* 2007; COLOMBO *et al.* 2007 e MESSER *et al.* 2009). De modo contrário, esse valor foi inferior ao observado (2µg/mL) por Matsumoto *et al.* (2007).

Para voriconazol frente a isolados de *C. tropicalis* foi obtido neste estudo um valor de MIC<sub>50</sub> (0,06µg/mL) equivalente aos descritos nos estudos de Ostrosky-Zeichner *et al.* (2003), Zepelin *et al.* (2007), Odds *et al.* (2007) Matsumoto *et al.* (2007) e Messer *et al.*(2009). Os intervalos de valores verificados por Hajjeh *et al.* (2004) e Zepelin *et al.* (2007) foram muito superiores (0,12- 4 µg/mL e 0,15- 8 µg/mL) aos observados neste estudo. Valores um pouco maiores foram publicados por Colombo *et al.* (2006) e Messer *et al.*(2009), respectivamente, 0,03-0,5 e 0,06-0,5µg/mL. Raros estudos mostram resistência de *C. tropicalis* para esse fármaco, havendo estudos que indicam taxas altíssimas de 20% em isolados de sangue (DIMOPOULOS *et al.* 2009).

Há que se levar em conta, a grande problemática da ocorrência de *trailing*, fenômeno que leva a falsos resultados de resistência em *Candida tropicalis* em testes com fármacos azólicos. O fenômeno consiste em crescimento residual da levedura mesmo em concentrações inibitórias das drogas, induzindo à interpretação errônea de resistência. Isto ocorre em isolados sensíveis que passam a ser interpretados como resistentes a drogas fungistáticas (REVANKAR *et al.* 1998; MARR *et al.* 1999; FACIOLE *et al.* 2010).

Neste estudo número de amostras de *C. glabrata* foi muito limitado e, talvez isso explique a alta sensibilidade verificada aos triazóis, fato não concordante com estudos prévios. Os valores de MIC de fluconazol encontrados para *C. glabrata* foram de 0,5 mg/L, 1 mg/L e 4mg/L, apesar de estarem entre os mais altos deste estudo, diferem muito da da maioria dos estudos nacionais e internacionais, que mostram valores mais elevados. Inédito foi o resultado do estudo grego no qual isolados de *C. glabrata* resultaram em valores de MIC de fluconazol altos (8 mg/L e 64 mg/L) que classificou todas as cepas como resistentes ao fármaco (DIMOPOULOS *et al.* 2009).

Enquanto verifica-se muito pouca variação na sensibilidade ao fluconazol para isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* em diversas regiões do globo, entre 1992 e 2001, *C. glabrata* apresenta variação nas taxas de sensibilidade tanto em relação ao tempo, quanto as regiões estudadas. Resistência de *Candida glabrata* ao fluconazol foi maior nos EUA e variou de 0 a 23%, dependendo da região. Essas observações são encorajadoras em relação à manutenção da utilidade da fluconazol como um antifúngico sistêmico eficaz para o tratamento da candidemia (PFALLER *et al.* 2004).

Neste estudo, os MICs de itraconazol e voriconazol foram, também, baixos para *C. glabrata*. Na literatura, cepas dessa espécie resistentes ao fluconazol são também menos sensíveis a voriconazol e itraconazol. Os resultados mostrados por Messer *et al.* (2009), no programa internacional SENTRY, mostraram valores muito altos de MIC de fluconazol frente a *C. glabrata* (MIC  $\geq$  16 mg/L) em 25,7%, assim como para itraconazol (69,8% de resistência e 26,7% de cepas SDD) mostrando a importância de buscar resistência cruzada entre os triazóis. A sensibilidade da espécie ao voriconazol foi de 90,1%, alertando para ocorrência de resistência para o novo fármaco (MESSER *et al.* 2009).

A importância da determinação da ocorrência de reações cruzadas entre drogas de mesma natureza, pode ser observada no estudo grego de Dimopoulos *et al.* (2009). Os autores verificaram valores altos de MIC de itraconazol e posaconazol, um dos mais novos azóis recém comercializado no Brasil, em cepas não somente em *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis* resistentes a fluconazol e voriconazol

Ainda que, neste estudo, não tenha sido observado taxas altas de resistência cruzada nos 100 isolados, alguns achados merecem ser comentados. Isolados multirresistentes não foram encontrados, entretanto 1 isolado de *C. parapsilosis* resistente a voriconazol foi também menos sensível a fluconazol (4 mg/L) e o único isolado de *C. krusei* foi também resistente ao voriconazol (MIC 0,5 mg/L), confirmando a existência de resistência cruzada entre fármacos de mesma classe. *Candida krusei* é reconhecida como espécie com altas taxas desse fenômeno (PFALLER *et al.* 2008). Os mecanismos de



escape dessa levedura aos azóis, podem explicar a presença de resistência cruzada entre fármacos dessa classe. Interessante foi o achado de Dimopoulos *et al.* (2009) que dentre 19 cepas, verificou 42% de resistência em cepas de *C. krusei* associadas a altos valores de MIC, também para itraconazol. Messer *et al.* 2009 mostraram, além da conhecida resistência de *C. krusei* ao fluconazol, altas taxas de MIC para itraconazol (100% de cepas SDD ou cepas resistentes) e, ainda, 6,9% de cepas SDD para voriconazol. Dimopoulos *et al.* (2009) encontrou resistência a voriconazol em  $\approx$  50% dos isolados ( $n=19$ ) de *C. krusei*. A resistência a voriconazol em cepas de *C. krusei*, além de *C. tropicalis* foi relatada por Dimopoulos *et al.* (2009), sendo acompanhada por aumento de MIC de itraconazol para essas duas espécies.

Um grande estudo em que a suscetibilidade de *C. krusei* pode ser avaliada, é o que abrangeu 3.000 isolados provenientes de distintos continentes, referente ao Programa ARTEMIS analisados por método de difusão em disco. O informe sobre cepas de hemoculturas dessa espécie indicou 83% dos isolados como sensíveis ao voriconazol, variando de 74,8% na América Latina para 92,3% na América do Norte. *Candida krusei* foi mais comumente isolada e unidades hematológicas e serviços de oncologia serviços, onde apenas 76,7% dos isolados foram sensíveis ao voriconazol. Não havia nenhuma evidência de aumento da resistência de *C. krusei* ao voriconazol entre 2001 e 2005. Sensibilidade diminuída à anfotericina B (MIC<sub>90</sub>, 4 mg/L) foram observados, ao passo que 100% dos isolados foram inibidos por valor de MIC<sub>90</sub> de caspofungina de 0,25 mg/L.

Em relação à anfotericina B, poucos estudos conseguiram demonstrar correlação entre a metodologia do teste de sensibilidade a antifúngicos e a clínica. Em candidemias, *breakpoints* foram estabelecidos para poucas drogas, no entanto para anfotericina B, a metodologia apresenta grande homogeneidade nos resultados, na maioria das vezes, não condizente à clínica. Estudos realizados por todo o globo, com inúmeros espécimes clínicos agentes de candidemias demonstram MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> máximos de 1mg/L na absoluta maioria (98%-100%) das amostras (SEIFERT *et al.* 2007; ODDS *et al.* 2007; MESSER *et al.* 2009).

Como previsto, a suscetibilidade à anfotericina B por métodos de referência foi alta, não se encontrando cepas resistentes em nenhuma espécie. Esses resultados têm sido consistentemente descritos na literatura especializada e torna a metodologia AFST-EUCAST de referência, assim como a descrita pelo CLSI, questionável para detectar cepas resistentes ( $MIC \geq 2$  mg/L) à anfotericina B, mesmo em casos de falência clínica.

Na maioria dos estudos o intervalo de MIC para a maioria das espécies situa-se entre 0,25 mg/L e 0,5 mg/L (CUENCA-ESTRELLA *et al.* 2001; REX *et al.* 2005; MATTA *et al.* 2007; ESPINEL-INGROFF *et al.* 2007). O recente estudo grego de Dimopoulos *et al.* (2009) difere dos demais, citando altos valores de MIC (4 mg/L) para anfotericina B frente a *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. Para *C. krusei* os autores também encontraram MIC de 4 mg/L de cepas causadoras de surto de infecção hospitalar, dado incomum, mas que pode ser verificado em outros trabalhos como o de Pfaller *et al.* (2008). Esses autores encontraram para 304 amostras sanguíneas de *C. krusei*, valor de 4 mg/L para MIC 90 de anfotericina B. A resistência nessa espécie pode chegar a 4,4%, segundo revisão de Cuenca-Estrella e Rodriguez-Tudela (2010). Outra espécie que pode ser menos sensível à anfotericina B é *C. parapsilosis*, com taxa de 2% de resistência em alguns trabalhos (CUENCA-ESTRELLA e RODRIGUEZ-TUDELA (2010). Para *C. tropicalis*, os estudos indicam se tratar de espécie sensível (SEIFERT *et al.* 2007; SAINT GERMAIN *et al.* 2008) e são também raros os relatos de resistência à anfotericina B, com taxa de 1,1% descrita por Cuenca-Estrella e Rodriguez-Tudela (2010).

Quando métodos que utilizam ágar, como fitas E-test® são usados para determinar a susceptibilidade à anfotericina B, entre 40% a 60% de *C. glabrata* e *C. krusei* resultam em MIC de 1 mg/L- concentração considerada intermediária ou não-suscetível para alguns especialistas, valores ainda mais altos (FORREST *et al.* 2006). No entanto é consenso que não existem *breakpoints* validados para anfotericina B (COYLE *et al.* 2010)

O método empregado neste estudo, para demonstrar a ação fungicida da anfotericina B de modo dinâmico e mais acurado do que a determinação da concentração fungicida mínima (MFC) de modo estático, demonstrou a existência de cepas com suscetibilidade distintas, não

identificadas por MIC. Em estudo anterior, obtivemos resultados semelhantes com cepas de *Cryptococcus neoformans*, o que estimula a utilização deste método para determinação da suscetibilidade à anfotericina B (PAPPALARDO *et al.* 2009).

A ação fungicida da anfotericina B foi rápida, sendo evidenciada nas primeiras 4 horas de exposição e dentre os 93 isolados que sofreram ação fungicida foi observado que em 51% o *endpoint* ocorreu em até 8 h. Como sugeriram outros autores, a ação foi espécie-dependente (CANTÓN *et al.* 2004) . Os resultados de curvas de morte indicaram que *C. albicans* foi a espécie mais sensível à ação fungicida de anfotericina B, em concordância com estudos anteriores (KLEPSEK *et al.* 1998, CANTÓN *et al.* 2004; SOCZO *et al.* 2008; SZABÓ *et al.* 2008). De modo contrário, de 10 isolados que sofreram efeito letal apenas em 48 h de exposição à anfotericina B, a maioria (7; 70%) era *C. parapsilosis*, 2 (20%) eram *C. glabrata* e apenas 1(10%) *C. tropicalis*. Este dado, também, está conforme a estudos prévios que mostram a maior resistência dessas duas espécies frente ao polieno (CANTÓN *et al.* 2004; SOCZO *et al.* 2008; SZABÓ *et al.* 2008). No grupo com *endpoint* de 24 h de exposição, considerado longo, observa-se também que a espécie prevalente foi *C. parapsilosis* (12; 80%). Em relação à *C. glabrata* foi observado que nenhum dos 5 isolados morreu em menos de 12 h. De fato, Cantón *et al.*, 2004 relataram que a média de horas de exposição à anfotericina B , necessária para inibir 99,9% (*endpoint* fungicida) das colônias de *C. glabrata* (16 h) era superior à observada para *C. albicans* (2 h) mas inferior àquela de *C. parapsilosis* (>24h), demonstrando a menor sensibilidade dessa espécie.

Como descrito, anteriormente, por Vasquez *et al.* (1998) e Cantón *et al.* (2004), foi comprovada neste estudo a presença de células viáveis mesmo após atividade fungicida. Isto ocorreu em porcentagem significativa (36,4%) dos isolados. A interpretação para esse fato ainda não é conhecida. Um das hipóteses é que o isolado retomou o crescimento pela presença de 0,1% de células viáveis, desde que, a metodologia de curvas de morte tem *endpoint* em 99,9% de redução de ufc/mL. Outra possibilidade é a inativação de anfotericina B após determinado tempo, no caso 48 h, especialmente pela reconhecida

fotosensibilidade desse polieno. Uma última explicação é a desproporção entre fármaco e células de leveduras decorrente do contínuo crescimento microbiano. Essas interpretações, se corretas, imputariam ao método um erro inerente, que teria que ser mensurado e eliminado. De outro modo, esses isolados poderiam ser tolerantes, ou resistentes, à anfotericina B, significando que o método tem alta sensibilidade para detecção de resistência ao fármaco. Todas essas suposições não de ser esclarecidas no futuro, com novos estudos.

As curvas de morte com todos os isolados avaliou, de forma dinâmica, o efeito letal de 1 mg/L de anfotericina B. Este valor foi escolhido desde que representa a dose sérica máxima, aproximada, do polieno no organismo humano, após dose convencional.

Um dos aspectos observados por muitos pesquisadores é a relação entre atividade fungicida da anfotericina B, por curvas de morte e atividade inibitória por MIC. Enfatizam, esses autores, a proporção entre a dose fungicida e o MIC. Alguns deles descreveram cepas que necessitam alta dose fungicida de, até 16 vezes o valor de MIC (SOCZO *et al.* 2008; SZABÓ *et al.* 2008) ou mesmo não conseguiram determinar o efeito fungicida em certas cepas (CANTÓN *et al.* 2004; SZABÓ *et al.* 2008). por maior que seja a dose de anfotericina B utilizada, Ou seja, o *endpoint* não foi encontrado para essas cepas.

Nessa linha de raciocínio, quando foram analisadas 5 cepas de *C. parapsilosis* e 1 de *C. albicans* e 1 de *C. tropicalis*, nesta dissertação, o efeito fungicida também não foi observado com 1 mg/L de anfotericina B. Vale ressaltar que foi utilizada apenas uma concentração do polieno para os referidos testes. No entanto, a importância do fato dessas cepas serem resistentes, ou tolerantes, ao efeito fungicida desse fármaco de alta potência pode ser grande sob ponto de vista clínico. Além desse relevante aspecto, é fato que os valores de MIC de anfotericina B para essas 7 cepas, determinados por microdiluição foram baixos (MIC 0,06 mg/L, 0,25 mg/L, 0,25 mg/L, 0,5 mg/L, 0,25 mg/L, 0,12 mg/L, 0,25 mg/L) indicando, portanto, a baixa sensibilidade do método de microdiluição na busca de cepas resistentes à anfotericina B. Por esses valores, verifica-se que o efeito fungicida para essas

4 cepas seria obtido apenas com doses 16 vezes maiores do que a utilizada. Além disso, não foi observada relação entre MIC e tempo fungicida, sendo encontrados tempos máximos de 48 h para isolados de MIC baixos e vice-versa.

A maioria dos autores afirma que, para anfotericina B, os testes *in vitro* ainda não são adequados e novas metodologias devem ser desenvolvidas, ou mesmo método comercial como E-test<sup>®</sup> merece maior atenção para definição de um método melhor para determinar cepas resistentes ao fármaco.

### **Considerações Finais**

Este estudo soma-se a outros que valorizam o teste de suscetibilidade aos antifúngicos aplicados a isolados, agentes de infecções invasivas, identificados com metodologia atualizada e acurada. De modo ideal tal teste deveria ser realizado de forma rápida dentro do hospital, de modo a dar apoio à orientação terapêutica. Enquanto isso não é possível, visto a escassez de testes rápidos com tal finalidade e seu custo, relativamente alto, a tomada de decisão do médico atendente do caso de suspeita de fungemia pode ter como base um banco de dados para tratamento empírico ou mesmo profilático. Em geral, clínicos consideram resultados de testes de sensibilidade de grande valor e, freqüentemente, baseiam-se nesses dados para a rotina de atendimento (COLLINS *et al.* 2007).

O conhecimento das espécies causadoras de candidemia em um hospital universitário de Mato Grosso do Sul, além da descrição do perfil de suscetibilidade a antifúngicos desses agentes, poderá contribuir de modo significativo para a composição de um banco de dados para análise temporal e geográfica, desses microrganismos, em nosso país. Além disso, os dados inéditos sobre ocorrência de espécies crípticas, como *C. orthopsilosis* se constitui em novos conhecimentos sobre a epidemiologia, em particular, sobre a topografia e população-alvo de infecções desses agentes.

A descrição do valor absoluto do MIC em mg/L, como realizado nesta dissertação é muito importante pois as publicações tendem a divulgar apenas a

classificação final dos isolados, nas categorias de sensível, intermediário/S-DD e resistente, de acordo com os *breakpoints* vigentes. No entanto, a exemplo da bacteriologia esses critérios interpretativos são dinâmicos e se alteram periodicamente. Portanto, uma cepa classificada como sensível pode ser classificada como resistente em uma interpretação posterior e vice-versa. Desse modo, o CLSI publicou, em 2011, artigo sugerindo mudança dos *breakpoints* de fluconazol, voriconazol e todas as equinocandinas (Pfaller *et al.* 2011). Isto posto, as taxas de resistência publicadas em estudos anteriores serão todas alteradas, desde que, serão interpretadas com outros valores. Interessante notar que há tendência de novos *breakpoints* serem elaborados especificamente, para cada espécie dentro do gênero *Candida* spp. e outros. Assim, as espécies crípticas, como avaliadas neste estudo poderão ser incluídas em *breakpoints* distintos no futuro e, portanto, dados brutos como apresentados neste estudo serão de grande utilidade.

Este estudo mostrou que fenótipos de resistência aos principais antifúngicos, fluconazol, anfotericina B, itraconazol e o fármaco azólico mais recentemente comercializado no Brasil, voriconazol, tiveram ocorrência rara neste estudo o que implica na possibilidade de terapia empírica e profilática com esses fármacos.

## 7 Conclusões

Dentre os agentes de candidemia, *C. albicans* e *C. parapsilosis* espécies prevalentes. A ocorrência de cepas de *C. dubliniensis* investigadas em 35 fenótipos de *C. albicans* isolados de corrente sanguínea não foi observada neste estudo, comprovando a raridade dessa espécie em hemoculturas.

Dentre os isolados identificados como *C. parapsilosis*, apenas poucas cepas de *C. orthopsilosis* (8%) foram agentes de candidemia, confirmando dados de literatura.

Este estudo mostrou que as drogas, tradicionalmente utilizadas para o tratamento da candidemia, fluconazol e anfotericina B, apresentaram baixos valores de MIC indicando forte atividade *in vitro* contra espécies de *Candida* isoladas de hemocultura, em concordância com trabalhos anteriores. Porém, quando avaliada a atividade fungicida de anfotericina B, a mesma foi espécie-dependente, sendo *C. albicans* a mais sensível e *C. parapsilosis* a mais resistente.

Os isolados resistentes a voriconazol, o mais novo azol utilizado em hospitais do Brasil, apresentaram-se menos sensíveis ao fluconazol. Embora essa ocorrência tenha sido rara, considera-se importante o monitoramento da ação *in vitro* de voriconazol sobre isolados clínicos, em particular, de *C. parapsilosis* e *C. krusei*.

Caspofungina foi eficaz contra *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis*, podendo ser uma alternativa para tratamento de casos resistentes a fármacos azólicos.

Os testes de curvas de morte mostraram que *Candida albicans* foi a espécie mais sensível, *Candida parapsilosis* e *C. glabrata* foram as menos sensíveis, concordante com estudos anteriores.

Foi possível detectar através da metodologia de curvas de morte 7 isolados tolerantes (1 *C. albicans*, 1 *C. tropicalis* e 5 *C. parapsilosis*) onde a AMB foi inativa nos tempos avaliados.

## 8 Referências Bibliográficas

AQUINO VR, LUNARDI LW, GOLDANI LZ, BARTH AL. Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in southern Brazil. *Braz J Infect Dis* 2005. 9 (5): 411-8.

ARENDRUP MC. Epidemiology of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care* 2010. 16(5):445-52.

ASADZADEH M, AHMAD S, AL-SWEIH N and KHAN ZU. Rapid molecular differentiation and genotypic heterogeneity among *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* strains isolated from clinical specimens in Kuwait. *J Med Microbiol* 2009. 58 745-752.

ARTHINGTON-SKAGGS BA, W, CIBLAK MA, FRADE JP, BRANDT ME, HAJJEH RA, et al. Comparison of visual and spectrophotometric methods of broth microdilution MIC end point determination and evaluation of a sterol quantitation method for In vitro susceptibility testing of fluconazole and itraconazole against trailing and nontrailing *Candida* isolates. *Antimicrobial and Chemotherapy*. 2002; 46(8): 2477–2481.

BARRY AL, PFALLER MA, BROWN SD, ESPINEL-INGROFF A, GHANNOUM MA, KNAPP C, RENNIE RP, REX JH, & RINALDI MG. Quality control limits for broth microdilution susceptibility tests of ten antifungal agents. *J Clin Microbiol* 2000: 38:3457-3459.

BASSETTI M, RIGHI E, COSTA A, FASCE R, MOLINARI MP, ROSSO R, PALLAVICINI FB and VISCOLI C. Epidemiological trends in candidemia in intensive care. *BMC Infect Dis* 2006. 6: 21.

BECK-SAGUE C, JARVIS WR *et al.* Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. *J Infect Dis* 1993. 167: 1247-1251.

BLOOMBERG HM, JARVIS WR, SOUCIE JM, *et al.* Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. The National Epidemiology of Mycosis Survey. *Clin Infect Dis* 2001. 33:177–86.



BRANCHINI ML, PFALLER MA, RHINE-CHARBERG J, FREMPONG T, ISENBERG HD. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol 1994. 32: 452–456.

CANNON RD, LAMPING E, HOLMES AR, NIIMI K, BARET PV *et al.* Efflux-Mediated Antifungal Drug Resistance. Clinical Microbiology Reviews 2009. 22 (2) 291-321

CHANG MR, CORREIA FP, COSTA LC *et al.* *Candida* bloodstream infection: data from a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo 2008. 50: 265-268.

CHEN S, SLAVIN M, NGUYEN Q, MARRIOTT D, PLAYFORD EG, ELLIS D, SORRELL T. Active Surveillance for Candidemia, Australia Emerg Infect Dis 2006. 12(10): 1-4.

COLLINS CD, ESCHENAUER GA, SALO SL, NEWTON DW. To Test or Not To Test: a Cost Minimization Analysis of Susceptibility Testing for Patients with Documented *Candida glabrata* Fungemias. J Clin Microbiol 2007; 45: 1884-1888.

COLOMBO AL, NUCCI M, PARK BJ, NOUÉR SA, ARTHINGTON-SKAGGS B, MATTA DA, *et al.* Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers for the brazilian network candidemia study. J Clin Microbiol. 2006; 44(8): 2816–2823.

COYLE E.A. Invasive candidiasis and the utility of the antifungal susceptibility testing in the ICU. J. Pharm. Practice 2010; 23 (1): 33-37

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. 2002; 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. 2002a Jun; 49(6): 981 - 7.

CUENCA-ESTRELLA M. Antifungal agents in the treatment of systemic infections: Relevance of mechanism of action, activity profile and resistances. *Rev Esp Quimioter*. 2010. 23 (4):169-176.

CUESTA I, BIELZA C, CUENCA-ESTRELLA M, LARRAÑAGA P AND RODRÍGUEZ-TUDELA JL. Evaluation by Data Mining Techniques of Fluconazole Breakpoints Established by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and Comparison with Those of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). *Antimicrob Agents Chemother* 2010. 54(4): 1541–1546.

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* 2002. 40(4): 1298-302.

DIMOPOULOS G, VELEGRAKI A, FALAGAS ME. A 10-Year Survey of Antifungal Susceptibility of Candidemia Isolates from Intensive Care Unit Patients in Greece. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009. 53(3): 1242-1244.

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

ESPINEL-INGROFF A, BARCHIESI F, CUENCA-ESTRELLA M, FOTHERGILL A, PFALLER MA, RINALDI M, RODRIGUEZ-TUDELA JL, VERWEIJ PE. Comparison of Visual 24-Hour and Spectrophotometric 48-Hour MICs to CLSI Reference Microdilution MICs of Fluconazole, Itraconazole, Posaconazole, and Voriconazole for *Candida* spp.: a Collaborative Study. *J Clin Microbiol* 2005. 43: 4535-4540.

ESPINEL-INGROFF A. Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: a review of the literature (2005-2009). *Rev Iberoam Micol* 2009. 26(1):15-22.

FALAGAS ME, APOSTOLOU KE AND PAPPAS VD. Attributable mortality of candidemia: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* 2006. 25: 419-425.

FORREST G. Role of antifungal susceptibility testing in patients management. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2006. 19: 538-543.

FRANÇA JCB, RIBEIRO CEL, QUEIROZ-TELLES F. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: incidence, frequency of different species, risk factors and antifungal susceptibility. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2008; 41(1): 23-28.

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(3): 401 – 5.

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

GOMEZ-LOPEZ A, ALASTRUEY-IZQUIERDO A, RODRIGUEZ D, ALMIRANTE B, PAHISSA A, RODRIGUEZ-TUDELA JL, CUENCA-ESTRELLA M, and the Barcelona Candidemia Project Study Group. Prevalence and susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*. Results from populationbased surveillance of candidemia in Spain. *Antimicrob. Agents. Chemother* 2008. 52:1506–1509

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(9): 1172 – 7.

HAJJEH RA, SOFAIR AN, HARRISON LH, *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. 42:1519–27.

HORN DL, NEOFYTOS D, ANAISSIE EJ, FISHMAN JA, STEINBACH WJ, OLYAEI AJ, MARR KA, PFALLER MA, CHANG CH, WEBSTER KM. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis* 2009; 48(12):1695-703.

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. *Med Mycol* 2010. 48(4) : 669-74.

KAO AS, BRANDT ME, PRUITT WR, CONN LA, PERKINS BA, STEPHENS DS, BAUGHMAN WS, REINGOLD AL, ROTHROCK GA, PFALLER MA, PINNER RW AND HAJJEH RA. The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. *Clin. Infect. Dis* 1999. 29:1164-1170.

KLEPSEK ME, ERNST EJ, LEWIS RE, ERNST ME, PFALLER MA. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: Proposal for Standardized Methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1998. 1207-1212.

KOCSUBÉ SM, TÓTH C, VÁGVÖLGYI I, DOCSI M, PESTI I, PÓCSI J, SZABÓ and VARGA J.. Occurrence and genetic variability of *Candida parapsilosis* sensu lato in Hungary. *J. Med. Microbiol* 2007. 56:190–195

LEVIN AS, COSTA SF, MUSSI NS, BASSO M, SINTO SI, MACHADO C, GEIGER DC, VILLARES MC, SCHREIBER AZ, BARONE AA, BRANCHINI ML. *Candida parapsilosis* fungemia associated with implantable and semi-implantable central venous catheters and the hands of health care workers. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 1998. 30: 243-249, 98.

LEVY I. Emergence of *Candida parapsilosis* as the predominant species causing candidemia in children. *Clin Infect Dis* 1998. 26: 1086-1088.

LIN D, WU LC, RINALDI MG, LEHMANN PF. Three Distinct Genotypes within *Candida parapsilosis* from Clinical Sources. *J Clin Microbiol* 1995; 33:1815-1821.

LEROY O, GANGNEUX JP, MONTRAVERS P, MIRA JP, GOUIN F, SOLLET JP, CARLET J, *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; 37(5): 1612-1618.

LOCKHART SR, MESSER SA, PFALLER MA, DIEKEMA DJ. *Lodderomyces elongisporus* masquerading as *Candida parapsilosis* as a cause of blood stream infections. J. Clin. Microbiol 2008a. 46:374–376.

LOCKHART SR, MESSER SA, PFALLER MA, DIEKEMA DJ. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*, in comparison to the closely-related species *Candida parapsilosis*. J. Clin. Microbiol 2008b. 46:2659–2664.

LUNEL FV, KOELEMEN JGM, SPANJAARD L, ANDENBROUCKE-GRAULS C, SCHULTZ C, VERBRUGH HA *et al.* Trends in fungaemia and antifungal susceptibility. The Journal of Medicine 2006. 64 (7):236-242

MANNARELLI BM, KURTZMAN CP. Rapid identification of *Candida albicans* and other human pathogenic yeasts by using short oligonucleotides in a PCR. J Clin Microbiol 1998;36:1634–41.

MARR KA, RUSTAD TR, REX JH, WHITE TC. The trailing end point phenotype in antifungal susceptibility testing is pH dependent. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43(6): 1383-1386.

MATTA DA, MACHADO AM, AZEVEDO AC, KUSANO EJ, TRAVASSOS NF, SALOMÃO R, COLOMBO AL. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in Sao Paulo, Brazil, 1995-2003. Diagnostic Microbiol Infect Dis 2007. 57 (4): 399-404.

MATSUMOTO FE, GANDRA RF, RUIZ LS, AULER ME, MARQUES SA, PIRES MF *et al.* Yeast isolated from blood and catheter in children from a public hospital of São Paulo, Brazil. Mycopathologia 2001. 154(2): 63– 69.

MATSUMOTO FE, DIAS AL, MELHEM MS, SZESZS 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. Canadian Journal of Microbiology. 2007; 53(12): 1300-1306.

MEDRANO DJ, BRILHANTE RS, CORDEIRO RA, ROCHA MF, RABENHORST SH, SIDRIM JJ. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2006. 48(1): 17-20.

MCNEIL MM, NASH SL, HAJJEH RA, PHELAN MA, CONN LA, PLIKAYTIS BD & WARNOCK DW. Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. Clin Infect Dis 2001. 33: 641–647.

MELHEM MSC. Resistência de *Candida* e outras leveduras a anfotericina B e fluconazol. In: Microbiologia aplicada ao controle de infecção hospitalar. LEVY CE (coord.). 2ª Ed. São Paulo: ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE ESTUDOS E CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR. 2004. p.135-158.

MESSER AS, MOET GJ, KIRBY JT, JONES RN. ACTIVITY of Contemporary Antifungal Agents, including the novel Echinocandin Anidulafungin, Tested Against *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. And *Aspergillus* spp.: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-2007). Journal of Clinical Microbiology. [published online] 2009. [Access 2009 May 8]. Available from: [jcm.asm.org](http://jcm.asm.org).

MIRHENDI H, BRUUN B, SCHONHEYDER HC, CHRISTENSEN JJ, FUURSTED K, GAHRN-HANSEN B, JOHANSEN HK, NIELSEN L, KNUDSEN JD, ARENDRUP MC. Molecular screening for *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* among Danish *Candida parapsilosis* group blood culture isolates: proposal of a new RFLP profile for differentiation. J Med Microbiol. 2010; 59(4): 414-420

MORGAN J. Global trends in candidemia: review of reports from 1995–2005. Curr Infect Dis Rep 2005. 7: 429–439.

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 – Second edition. Document M 27-A2, 2002

NCCLS-NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS(NCCLS) – Clinical and Laboratory Standards Intitute (CLSI). Quality Control Minimal Inhibitory Concentration (MIC) Limits for Broth

Microdilution and MIC Interpretive Breakpoints; Informational Supplement - Second Edition. Document M 27-S2, 2006.

NGUYEN MH, PEACOCK JR. JE, MORRIS AJ, TANNER DC, NGUYEN ML, SNYDMAN DR, WAGENER MM, RINALDI MG AND YU VL. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am. J. Med* 1998. 100:617-623.

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 Med Microbiol* 2007. 56(8):1066-75.

OSTROSKY-ZEICHNER L, REX JH, PAPPAS PG, HAMILL RJ, LARSEN RA, HOROWITZ HW *et al.* Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003; 47(10): 3149-3154.

PAPPALARDO MC, SZESZS MW, MARTINS MA, BACETI LB, BONFIETTI LX, PURISCO SU *et al.* Susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B using time-kill methodology. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009. 64(2):146-51.

PAPPAS PG, REX JH, SOBEL JD, FILLER SG, DISMUKES WE, WALSH TJ, EDWARDS JE. Guidelines for Treatment of Candidiasis 2004. 161-189.

PAPPAS PG, KAUFFMAN CA, ANDES D, BENJAMIN DK JR, CALANDRA TF, EDWARDS JE JR, FILLER SG *et al.* Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009. 48(5):503-35.

PEREIRA GH, MULLER PR, SZESZS MW, LEVIN AS, MELHEM MS. Five-year evaluation of bloodstream yeast infections in a tertiary hospital: the predominance of non-*C. albicans Candida* species. *Med Mycol* 2010. 48(6): 839-42.

PERES-BOTA D, RODRIGUEZ-VILLALOBOS H, DIMOPOULOS G, MELOT C, VINCENT JL. Potential risk factors for infection with *Candida* spp. in critically ill patients. *Clin Microbiol Infect* 2004. 10(6): 550-5.

PFALLER MA, DIEKEMA DJ; International Fungal Surveillance Participant Group. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. Clin Microbiol Infect. 2004; 10(1):11-23.

PFALLER MA, DIEKEMA DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev 2007. 20(1):133-63.

PFALLER MA, DIEKEMA DJ, GIBBS DL, NEWELL VA, NAGY E, DOBIASOVA S, RINALDI M, BARTON R, VESELOV A. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005.; Global Antifungal Surveillance Group. Clin Microbiol. 2008a; 46(2): 515-21.

PFALLER MA, DIEKEMA DJ, GIBBS DL, NEWELL VA, NG KP, COLOMBO A, FINQUELIEVICH J, BARNES R, WADULA J, the Global Antifungal Surveillance Group. Geographic and Temporal Trends in Isolation and Antifungal Susceptibility of *Candida parapsilosis*: a Global Assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. J Clin Microbiol. 2008b; 46(3): 842– 849

PFALLER M A, BOYKEN LB, HOLLIS RJ, KROEGER J, MESSER SA, TENDOLKAR S, DIEKEMA DJ. Validation of 24-Hour Fluconazole MIC Readings versus the CLSI 48-Hour Broth Microdilution Reference Method: Results from a Global *Candida* Antifungal Surveillance Program. Journal of Clinical Microbiology. 2008c; 46(11): 3585-3590.

PFALLER MA, DIEKEMA DJ, GIBBS DL, NEWELL VA, BARTON R, BIJIE H, *et al.* Geographic variation in the frequency of isolation and fluconazole and voriconazole susceptibilities of *Candida glabrata*: an assessment from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Program. Diagn Microbiol Infect Dis 2010. 67(2) : 162-71.

PFALLER MA, MOET GJ, MESSER SA, JONES RN, CASTANHEIRA M. Geographic variations in species distribution and echinocandin and azole antifungal resistance rates among *Candida* bloodstream infection isolates:



report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009). J Clin Microbiol 2011. 49(1) : 396-9.

REGONASCHI MT. Caracterização de leveduras isoladas de pacientes hospitalizados. 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 do Título de Mestre em Ciências. São Paulo, 2006.

REVANKAR SG, KIRKPATRICK WR, MCATEE RK, FOTHERGILL AW, REDDING SW, RINALDI MG *et al.* Interpretation of trailing endpoints in antifungal susceptibility testing by the national committee for clinical laboratory standards. Method J Clin Microbiol. 1998; 36(1): 153-156.

REX JH, PFALLER MA, RINALDI MG, POLAK A, GALGIANI JN. Antifungal susceptibility testing. Clin Microbiol Rev. 1993; 6(4): 367-81

REX JH, NELSON PW, PAETZNICK VL, LOZANO-CHIU M, ESPINEL-INGROFF A, ANAISSIE EJ. Optimizing the correlation between results of testing in vitro and therapeutic outcome in vivo for fluconazole by testing critical isolates in a murine model of invasive candidiasis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1998; 42(1): 129-134.

REX JH, PFALLER MA, WALSH TJ, CHATURVEDI V, ESPINEL-INGROFF A, GHANNOUM MA, *et al.* Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. Clin Microbiol Rev 2001. 14(4):643-58.

REX JH, PFALLER MA. Has antifungal susceptibility testing come of age? Clin Infect Dis 2002. 35(8) : 982-9.

RODERO L, CÓRDOBA S, CAHN P, HOCHENFELLNER F, DAVEL G, CANTEROS C, KAUFMAN S, GUELFAND L. In vitro susceptibility studies of *Cryptococcus neoformans* isolated from patients with no clinical response to amphotericin B therapy. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2000, 45, 239-242.

RODRÍGUEZ-TUDELA J L, ALMIRANTE B, RODRÍGUEZ-PARDO D , LAGUNA F, DONNELLY P J, MOUTON J W, PAHISSA A, CUENCA ESTRELLA M. 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.

ROY B, MEYER SA. Confirmation of the Distinct Genotype Groups within the Form Species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 1998. 36: 216-218.

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 Medicae* 2005. 15: 13-21.

SAMBROOK J, MANIATS T, FRITSCH EF. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory, v.2, 1989.

SAINT-GERMAIN G, LAVERDIÈRE M, PELLETIER R, RENÉ P, BOURGAULT AM, LEMIEUX C, LIBMAN M. Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream *Candida* isolates in Quebec: Report on 453 cases between 2003 and 2005. *J Infect Dis Med Microbiol.* 2008; 19(1): 55-62.

SANDVEN P. Epidemiology of Candidemia. *Rev Iberoam Micol* 2000. 17(3): 73-81.

SANCAK B, REX JH, PAETZNICK V, CHEN E RODRIGUEZ J. Evaluation of a Method for Identification of *Candida dubliniensis* Bloodstream Isolates. *J Clin Microbiol* 2003. 49 (1): 489-491.

SEIFERT H, AURBACH U, STEFANIK D, CORNELLY O. In vitro activities of isavuconazole and other antifungal agents against *Candida* bloodstream isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2007. 51(5):1818-21

SHIN JH, SHIN DH, SONG JW, KEE SJ, SUH SP, RYANG DW. Electrophoretic Karyotype Analysis of Sequential *Candida parapsilosis* Isolates from Patients with Persistent or Recurrent Fungemia. *J Clin Microbiol* 2001. 39: 1258–1263.

SILVA AP, MIRANDA IM, LISBOA C, PINA-VAZ C, RODRIGUES AG. Prevalence, Distribution, and Antifungal Susceptibility Profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a Tertiary Care Hospital. *Journal of Clinical Microbiology* 2009. 47(8): 2392-2397.

SILVA V, ALVARADO D, DIAZ MC. Antifungal susceptibility of 50 *Candida* isolates from invasive mycoses in Chile. *Med Mycol* 2004. 42(3): 283-285.

SOBEL JD. The Emergence of Non-albicans *Candida* Species as Causes of Invasive Candidiasis and Candidemia. *Curr Infect Dis* 2006. 8(6):427-433.

SÓCZÓ G, KARDOS G, MCNICHOLAS PM, BALOGH E, GERGELY L, VARGA I, KELENTEY B, MAJOROS L. Correlation of posaconazole minimum fungicidal concentration and time kill test against nine *Candida* species. *J Antimicrob Chemother* 2007. 60(5):1004-9.

SULLIVAN DJ, WESTERNENG TJ, HAYNES KA, BENNETT DE, COLEMAN DC. *Candida Dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiol* 1995. 141: 1507-1521.

SPELLBERG BJ, FILLER SG, EDWARDS JR. JE, Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clin Infect Dis* 2006. 42(2) : 244-51.

SWINNE D, NOLARD N, P VANR, DETANDT M. Bloodstream yeast infections: a 15-month survey. *Epidemiol Infect* 2009. 137(7) : 1037-40.

SZABÓ Z, SÓCZÓ G, MISZTI C, HERMANN P, ROZGONYI F. In vitro activity of fluconazole and amphotericin B against *Candida inconspicua* clinical isolates as determined by the time-kill method. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2008. 55(1) : 53-61.

TAVANTI A, DAVIDSON AD, GOW NAR, MAIDEN MCJ & ODDS FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol* 2005. 43: 284-292.

TAVANTI A, HENSGENS LAM, GHELARDI E, CAMPA M, SENESI S. Genotyping of *Candida orthopsilosis* Clinical Isolates by Amplification Fragment Length Polymorphism Reveals Genetic Diversity among Independent Isolates and Strain Maintenance within Patients. *J Clin Microbiol* 2007. 45: 1455-1462.

TAY ST, NA SL, CHONG J. Molecular differentiation and antifungal susceptibilities of *Candida parapsilosis* isolated from patients with bloodstream infections. J Med Microbiol 2009. 58(2) : 185-91.

TORTORANO AM, PEMAN J, BERNHARDT H, KLINGSPOR L, KIBBLER CC, FAURE O, *et al.* Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004. 23(4) : 317-22.

TRICK WE, FRIDKIN SK, EDWARDS JR, HAJJEH RA & GAYNES RP. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989–1999. Clin Infect Dis 2002. 35: 627–630.

VIGOUROUX S, MORIN O, MOREAU P, HAROUSSEAU JL, MILPIED N. Candidemia in patients with hematologic malignancies: analysis of 7 years' experience in a single center. Haematologica 2006. 91(5) : 717-8.

WEY SB, MORI M, PFALLER MA, WOOLSON RF, WENZEL RP. Hospital-acquired candidemia: the attributable mortality and excess length of stay. Arch Intern Med 1988.148: 2642-5.

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(3) : 309-17.

YAMAMURA DL, ROTSTEIN C, NICOLLE LE and IOANNOU S. Candidemia at selected Canadian sites: results from the Fungal Disease Registry, 1992-1994. Fungal Disease Registry of the Canadian Infectious Disease Society 1999. Can. Med. Assoc. J. 160: 493-499.

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; 25: 60-64.

YONG PV, CHONG PP, LAU LY, YEOH RS, JAMAL F. Molecular identification of *C. orthopsilosis* isolated from blood culture. *Mycopathologia* 2008.165:81–87.

ZANCOPE-OLIVEIRA RM, JAMES MJ, DEROSI AP, SAMPAIO JL, MUNIZ M, Li RK, NASCIMENTO AS, PERALTA JM e REISS E.. Strain characterization of *Candida parapsilosis* fungemia by molecular typing methods. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* 2000. 19:514–520.

ZEPELIN MB, KUNZ L, RU" Chel R, REICHARD U, WEIG M and GROß 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. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007; 60: 424-428.

**Apêndice 1 – Espécies e suscetibilidade a antifúngicos de 100 isolados de *Candida* spp., agentes de infecção sanguínea, em Hospital Universitário de Grande Grande, MS, Brasil**

Cepas	identificação		MIC				
	fen.	gen.	FCZ	ITZ	VCZ	AMB	CAS
264H-98	Cp	Cp	0,25	0,03	0,015	0,25	0,5
44H-98	Ca	Ca	1	0,03	0,015	0,25	NR
147 H11-98	Ca	Ca	0,12	0,015	0,015	0,12	NR
118 H3-98	Cp	Cp	1	0,06	0,015	0,25	0,5
133 H3-98	Ca	Ca	0,12	0,015	0,015	0,06	NR
62 H8-98	Ct	NR	0,25	0,06	0,06	0,5	NR
196 H5-98	Cgla	NR	0,5	0,015	0,015	0,015	NR
69 H12-98	Ca	Ca	0,25	0,015	0,03	0,12	NR
434 H2-99	Cp	Cp	0,5	0,015	0,03	0,25	0,5
515H2-99	Ca	Ca	0,12	0,015	0,015	0,12	NR
530H2-99	Ca	Ca	0,12	0,015	0,015	0,12	NR
698 H3-99	Cp	Cp	0,5	0,015	0,015	0,25	1
56 H5-99	Ca	Ca	0,12	0,015	0,015	0,25	NR
36 H7-99	Ct	NR	0,25	0,06	0,03	0,5	NR
154H-99	Cp	Cp	1	0,015	0,015	0,12	1
66H-99	Cp	Cp	0,5	0,12	0,015	0,12	0,25
173H-00	Ct	NR	2	0,06	0,03	0,25	NR
1023H-00	Ct	NR	0,5	0,03	0,06	0,5	NR
1222 H3-00	Ct	NR	0,25	0,03	0,03	0,5	NR
25 H3-00	Cp	Cp	4	0,06	0,25	0,25	1
639H8-00	Cp	Cp	0,5	0,03	0,015	0,25	0,5
988H10-00	Cp	Cp	0,25	0,015	0,015	0,5	0,5
05 H10-00	Cp	Cp	1	0,03	0,015	0,5	0,5
10H10-00	Ca	Ca	0,25	0,015	0,015	0,12	NR
932H10-00	Cp	Cp	0,25	0,015	0,015	0,5	0,5
262H12-00	Cp	Cp	0,5	0,03	0,015	0,25	0,5
379H2-01	Ct	NR	0,25	0,12	0,03	0,12	NR
716H4-01	Ca	Ca	0,25	0,015	0,015	0,12	NR
34H6-01	Ca	Ca	0,12	0,015	0,015	0,06	NR
78H7-01	Ca	Ca	0,25	0,015	0,015	0,12	NR
530H11	Cp	Cp	0,5	0,03	0,03	0,25	0,25
591H11-01	Ca	Ca	0,25	0,015	0,015	0,06	NR
713H-01	Ca	Ca	0,12	0,015	0,015	0,06	NR
333H-01	Ca	Ca	1	0,12	0,03	0,5	NR
332H-01	Ca	Ca	0,5	0,12	0,03	0,5	NR
227H-01	Ca	Ca	0,5	0,03	0,015	0,25	NR
226H-01	Ct	NR	1	0,12	0,015	0,25	NR
245H-01	Ca	Ca	0,25	0,03	0,015	0,25	NR
851H-02	Cp	Cp	1	0,12	0,015	0,25	0,25
229H-02	Cp	Cp	0,5	0,03	0,015	0,25	0,25
852H2-02	Ca	Ca	0,25	0,015	0,015	0,25	NR
155H2-02	Ca	Ca	0,25	0,015	0,015	0,25	NR
891H-02	Cp	Cp	0,5	0,015	0,015	0,25	0,5
559H06-02	Ca	Ca	0,12	0,015	0,015	0,12	NR
64H10-02	Cgla	NR	1	0,015	0,015	0,03	NR
101H10-02	Cp	Cp	1	0,03	0,03	0,5	0,5
007H-03	Ca	Ca	0,12	0,03	0,015	0,25	NR
304H-03	Ca	Ca	1	0,12	0,03	0,5	NR
500H-03	Cgla	NR	4	0,12	0,03	0,12	NR

Continuação Apêndice 1.

Cepas	identificação		MIC				
	fen	gen	FCZ	ITZ	VCZ	AMB	CAS
703H-03	Cp	Cp	1	0,12	0,03	0,5	0,25
486H2-03	Ca	Ca	0,12	0,015	0,015	0,12	NR
727H4-03	Ca	Ca	0,25	0,015	0,015	0,12	NR
736H4-03	Cp	Cp	0,5	0,03	0,015	0,03	0,25
992H5-03	Ca	Ca	0,25	0,015	0,015	0,06	NR
106H6-03	Ct	NR	0,5	0,03	0,06	0,25	NR
401H9-03	Ct	NR	0,5	0,03	0,06	0,25	NR
735H10-03	Ca	Ca	0,25	0,03	0,03	0,5	NR
194H-04	Cp	Cp	1	0,06	0,015	0,25	0,5
1000H1-04	Cp	Cortho	0,5	0,03	0,015	0,25	0,25
60H1-04	Cp	Cp	4	0,015	0,015	0,12	1
284H3-04	Ca	Ca	0,12	0,015	0,015	0,12	NR
790H6-04	Cp	Cp	0,5	0,015	0,03	0,5	0,5
82H8-04	Ca	Ca	0,25	0,015	0,015	0,12	NR
85 H8-04	Ca	Ca	0,5	0,015	0,015	0,12	NR
788H4-05	Ca	Ca	0,5	0,015	0,015	0,5	NR
989H5-05	Cp	Cp	1	0,015	0,015	0,12	1
120H6-05	Cp	Cp	0,5	0,015	0,015	0,25	0,5
422H8-05	Ca	Ca	0,25	0,015	0,015	0,12	NR
614H11-05	Cp	Cp	0,5	0,015	0,03	0,25	0,5
660H11-05	Ct	NR	0,25	0,03	0,06	0,12	NR
828H1-06	Cp	Cp	1	0,015	0,015	0,25	0,5
814H1-06	Ca	Ca	0,25	0,015	0,015	0,12	NR
910H22-06	Cp	Cp	0,5	0,015	0,015	0,015	0,25
003H3-06	Ca	Ca	0,12	0,015	0,015	0,5	NR
253H4-06	Ca	Ca	0,25	0,015	0,015	0,12	NR
340H5-06	Ca	Ca	0,12	0,015	0,015	0,5	NR
314H5	Ca	Ca	0,12	0,015	0,015	0,12	NR
428H6-06	Cgla	NR	0,5	0,06	0,015	0,03	NR
560H7-06	Cgla	NR	1	0,015	0,015	0,06	NR
709H8-06	Cp	Cp	0,5	0,015	0,03	0,12	0,5
887H9-06	Cp	Cortho	1	0,03	0,03	0,5	0,5
985H10-06	Ca	Ca	0,25	0,015	0,015	0,12	NR
62H10-06	Cp	Cortho	1	0,03	0,03	0,25	0,25
288H12-06	Cp	Cp	0,25	0,015	0,015	0,06	0,25
780H4-07	Cp	Cp	0,5	0,03	0,015	0,25	1
827H-07	Ca	Ca	0,25	0,015	0,015	0,06	NR
005H-07	Cp	Cp	0,5	0,015	0,015	0,06	0,5
33H-07	Cp	Cp	0,5	0,015	0,015	0,25	0,5
151H-07	Ct	NR	0,25	0,12	0,06	0,5	NR
257H-07	Ca	Ca	0,25	0,015	0,015	0,06	NR
326H-07	Cp	Cp	0,5	0,015	0,015	0,06	1
426H-07	Ca	Ca	0,25	0,015	0,015	0,5	NR
799H-07	Ck	NR	64	0,25	0,5	0,5	NR
817H-07	Ca	Ca	0,25	0,03	0,03	0,25	NR
01H-07	Cp	Cp	1	0,03	0,03	0,5	0,5
564H-07	Ct	NR	1	0,12	0,03	0,5	NR
436H-07	Ca	Ca	0,25	0,015	0,015	0,5	NR
845H-07	Ca	Ca	0,25	0,015	0,015	0,5	NR
152H-07	Ca	Ca	0,25	0,015	0,015	0,25	NR
994H12-07	Ct	NR	0,25	0,015	0,015	0,12	NR

**Apêndice 2- Resultado da contagem de unidades formadoras de colônias (ufc/mL) de *Candida* spp. expostas a 1 mg/L de anfotericina B em distintos períodos.**

cepa	identificação		tempo (h)						endpoin t
	fen.	gen.	0	4	8	12	24	48	
264H-98	Cp	Cp	1287	792	231	33	0	0	24
44H-98	Ca	Ca	1122	297	0	0	0	0	8
147 H11-98	Ca	Ca	1089	0	0	0	0	0	4
118 H3-98	Cp	Cp	3201	1056	1023	462	627	3300	NE
133 H3-98	Ca	Ca	1155	0	0	0	0	0	4
196 H5-98	Cgla	NR	4950	1551	33	0	0	0	12
62 H8-98	Ct	NR	3300	66	0	0	0	0	8
69 H12-98	Ca	Ca	1089	0	0	0	0	0	4
434 H2-99	Cp	Cp	3234	528	33	33	33	0	48
515H2-99	Ca	Ca	1155	0	0	0	0	0	4
530H2-99	Ca	Ca	1221	0	0	0	0	0	4
698 H3-99	Cp	Cp	1386	297	990	0	0	0	12
56 H5-99	Ca	Ca	1989	0	0	0	0	0	4
36 H7-99	Ct	NR	3960	330	99	66	0	0	24
154H-99	Cp	Cp	1419	33	33	0	0	0	12
66H-99	Cp	Cp	2640	726	693	165	66	990	NE
173H-00	Ct	NR	2739	297	165	66	66	6699	NE
1023H-00	Ct	NR	3432	396	66	66	33	0	48
1222 H3-00	Ct	NR	3960	33	0	0	0	0	8
25 H3-00	Cp	Cp	5511	528	33	33	0	0	24
639H8-00	Cp	Cp	3630	1650	396	330	297	0	48
988H10-00	Cp	Cp	3333	1749	1650	1056	660	0	48
05 H10-01	Cp	Cp	2343	891	66	33	0	0	24
10H10-00	Ca	Ca	1023	0	0	0	0	0	4
932H10-00	Cp	Cp	2838	693	330	330	264	0	48
262H12-00	Cp	Cp	3201	297	66	66	0	0	24
333H-01	Ca	Ca	1221	0	0	0	0	0	4
332H-01	Ca	Ca	1386	0	0	0	0	0	4
227H-01	Ca	Ca	2673	0	0	0	0	0	4
226H-01	Ct	NR	2640	660	0	0	0	0	8
245H-01	Ca	Ca	3300	0	0	0	0	0	4
379H2-01	Ct	NR	4455	33	0	0	0	0	8
716H4-01	Ca	Ca	1023	0	0	0	0	0	4
34H6-01	Ca	Ca	1386	0	0	0	0	0	4
530H11-01	Cp	Cp	4950	1584	330	330	231	1500	NE
591H11-01	Ca	Ca	1089	33	33	0	0	0	12
713H-01	Ca	Ca	1419	0	0	0	0	0	4
851H-02	Cp	Cp	1023	864	198	165	0	0	24
229H-02	Cp	Cp	1749	330	132	33	0	0	24



cont. Apêndice 2.

Cepa	identificação		Tempo (h)						endpoin
	fen.	gen.	0	4	8	12	24	48	<i>t</i>
155H2-02	Ca	Ca	1023	0	0	0	0	0	4
891H-02	Cp	Cp	3630	363	99	33	0	0	24
559H06-02	Ca	Ca	1749	33	0	0	0	0	8
64H10-02	Cgla	NR	4400	1815	429	66	0	0	24
101H10-02	Cp	Cp	1518	396	99	99	66	33	NE
007H-03	Ca	Ca	1155	0	0	0	0	0	4
304H-03	Ca	Ca	1683	0	0	0	0	0	4
500H-03	Cgla	NR	1122	0	0	0	0	0	4
703H-03	Cp	Cp	2574	66	66	0	0	0	12
486H2-03	Ca	Ca	2112	33	33	0	0	0	12
727H4-03	Ca	Ca	1056	198	165	0	0	0	12
736H4-03	Cp	Cp	2409	0	0	0	0	0	4
992H5-03	Ca	Ca	1089	561	33	0	0	0	12
106H6-03	Ct	NR	1551	0	0	0	0	0	4
401H9-03	Ct	NR	2640	0	0	0	0	0	4
735H10-03	Ca	Ca	1749	0	0	0	0	0	4
194H-04	Cp	Cp	1815	924	165	66	66	3300	NE
1000H1-04	Cp	Cortho	6039	33	0	0	0	0	8
60H1-04	Cp	Cp	6600	1254	396	264	132	0	48
284H3-04	Ca	Ca	1221	0	0	0	0	0	4
790H6-04	Cp	Cp	2871	198	99	0	0	0	12
82H8-04	Ca	Ca	1815	0	0	0	0	0	4
85 H8-04	Ca	Ca	2739	0	0	0	0	0	4
788H4-05	Ca	Ca	1023	33	33	0	0	0	12
989H5-05	Cp	Cp	2211	33	33	0	0	0	12
120H6-05	Cp	Cp	4191	924	264	165	0	0	24
422H8-05	Ca	Ca	1386	396	0	0	0	0	8
614H11-05	Cp	Cp	2211	1023	66	33	0	0	24
660H11-05	Ct	NR	2310	0	0	0	0	0	4
828H1-06	Cp	Cp	1848	561	33	33	33	0	8
814H1-06	Ca	Ca	1386	0	0	0	0	0	4
003H3-06	Ca	Ca	1989	0	0	0	0	0	4
314H5-06	Ca	Ca	1023	0	0	0	0	0	4
428H6-06	Cgla	NR	3760	231	33	33	33	0	48
560H7-06	Cgla	NR	2475	990	660	330	330	0	48
709H8-06	Cp	Cp	2310	66	0	0	0	0	8
887H9-06	Cp	Cortho	1782	891	264	198	165	1500	48
62H10-06	Cp	Cortho	4851	231	33	0	0	0	12
780H4-07	Cp	Cp	2475	660	33	33	0	0	24
005H-07	Cp	Cp	6600	2145	2145	1881	1749	4400	48
151H-07	Ct	NR	4950	66	33	33	0	0	24
257H-07	Ca	Ca	1254	462	8250	18150	29700	35000	NE
426H-07	Ca	Ca	1485	990	990	0	0	0	12

cont. Apêndice 2.

Cepa	identificação		Tempo (h)						endpoin
	fen.	gen.	0	4	8	12	24	48	t
799H-07	Ck	NR	3399	660	198	0	0	0	12
817H-07	Ca	Ca	1518	0	0	0	0	0	4
564H-07	Ct	NR	5940	0	0	0	0	0	4
436H-07	Ca	Ca	1353	0	0	0	0	0	4
845H-07	Ca	Ca	1023	0	0	0	0	0	4
152H-07	Ca	Ca	1353	0	0	0	0	0	4
160H-07	Ca	Ca	1353	0	0	0	0	0	4
78H7-01	Ca	Ca	1023	0	0	0	0	0	4
910H22-06	Cp	Cp	2310	396	66	0	0	0	12
253H4-06	Ca	Ca	2739	33	33	0	0	0	12
340H5-06	Ca	Ca	1287	0	0	0	0	0	4
985H10-06	Ca	Ca	2112	0	0	0	0	0	4
288H12-06	Cp	Cp	2871	924	33	33	0	0	24
827H-07	Ca	Ca	3234	33	0	0	0	0	8
33H-07	Cp	Cp	2211	99	0	0	0	0	8
326H-07	Cp	Cp	4191	99	99	33	0	0	24
01H-07	Cp	Cp	1848	33	0	0	0	0	8
994H12-07	Ct	NR	3201	66	33	0	0	0	12

fen., fenotípica; gen., genotípica; Ca, *C. albicans*;

Cp, *C. parapsilosis*; Ct, *C. tropicalis*; Cgla, *C. glabrata*; Ck, *C. krusei*;

Cortho, *C. orthopsilosis*; NR, não realizado; NE, não encontrado

**Apêndice 3- Esquema de resultados obtidos nos testes de Curvas de Morte com 1 mg/L de anfotericina B frente a 100 isolados de *Candida* spp.**

