

Fabiana Cortez Pimentel

Caracterização e avaliação do perfil de suscetibilidade a antifúngicos dos agentes de candidemia em hospital público de referência da Baixada Santista, Brasil

Defesa de dissertação apresentado 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 de em Ciências.

Área de Concentração:

Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientadora:

Profa. Dra. Márcia de Souza Carvalho Melhem

SÃO PAULO

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Pimentel, Fabiana Cortez

Caracterização e avaliação do perfil de suscetibilidade a antifúngicos dos agentes de candidemia em hospital público de referência da Baixada Santista, Brasil / Fabiana Cortez Pimentel - São Paulo, 2012.

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. Candida
2. Candidemia/etiologia
3. Recém-nascido
4. Antimicóticos
5. Testes de sensibilidade microbiana

SES/CCD/CD-249/12

DEDICATÓRIA

A minha querida avó Olímpia Lino Cortez (sempre presente); Aos meus pais (Roseli Lino Cortez e José Dias Pimentel) pelo amor e confiança na concretização de um sonho. Ao meu marido, Rodrigo Pupo Larguesa, pelo amor e carinho. Ao Buddy e Izzie pelos momentos felizes de descontração. E a todos os amigos do Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz – São Paulo, em especial a minha querida orientadora, Márcia de Souza Carvalho Melhem pelo carinho e dedicação durante a pesquisa.

Muito Obrigada !

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Adolfo Lutz pela oportunidade no desenvolvimento deste projeto no Núcleo de Micologia, IAL-SP.

À Profa. Dra Márcia de Souza Carvalho Melhem pela orientação. Pela oportunidade em ser sua orientanda, por compartilhar de seu conhecimento e experiência, contribuindo para minha formação, meu sincero agradecimento e admiração

Aos funcionários e amigos do Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz – São Paulo, Walderez, Marilena, Sandra, Dulcilena, Leonor, Fumiko, Andres, Maria, Mirian, Lindete. Aprendi muito com vocês, e sei que formamos uma linda família de micologistas. Muito obrigada pelo incentivo e carinho.

A Maria Cecília Bianchi Soares, funcionária do IAL – Santos, que me encantou com sua paixão pela micologia enquanto fazia FUNDAP e por participar de nosso estudo enviando as amostras do Hospital para análise e avaliação no Núcleo de Micologia – IAL (SP).

Ao pesquisador Mário Tavares (IAL- Santos) pelo incentivo e carinho.

Aos amigos bolsista FUNDAP e de pós-graduação: Thiago, Daise, Aline, Cirlene, Marina, Lidiane, Lucas, Daniela, Mariana, Juliana, Sônia, especialmente a minha querida e eterna amiga Dayane. Obrigada pelo companheirismo e amizade !

A todos os funcionários, pós-graduandos e bolsistas FUNDAP do Instituto Adolfo Lutz – São Paulo do andar de Parasitologia pela contribuição de forma direta ou indireta que auxiliaram na concretização deste projeto.

À banca examinadora de qualificação e defesa do mestrado, Dra Júlia Maria Martins de Souza Filippe, Dra. Luciana da Silva Ruiz, Dra. Tânia Sueli de Andrade, Dra Graziella Hanna Pereira, pelas valiosas sugestões em nosso trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação da Coordenadoria de Controle de Doenças (PPGCCD), Dra Maria de Fátima, Tirces e Carol, pelo apoio e paciência durante todo o programa de pós.

Aos meus familiares por me apoiarem em todos os momentos de minha vida em especial na concretização deste projeto, um sonho realizado, que tenho o imenso prazer e felicidade em dividir mais esta conquista. O apoio de vocês foi fundamental. Minha eterna gratidão !

A todos meus amigos que mesmo distante sempre torcem por mim, especialmente minha querida amiga-irmã de coração, Perla. Obrigada !

Ao meu amor Rodrigo Pupo Larguesa, por sua paciência, compreensão, apoio, sempre me confortando com palavras de incentivo e carinho, enfim por todo seu amor, você é e sempre será especial em minha vida !

E a todos que contribuíram direto ou indiretamente, na execução deste trabalho. Muito Obrigada !

RESUMO

A distribuição das espécies causadoras de candidemia varia conforme o tipo de hospital, região geográfica, fator de risco e idade dos pacientes, além da política de uso de antifúngicos da unidade hospitalar. Na região da Baixada Santista, estado de São Paulo, há carência desses dados, com vistas à vigilância epidemiológica. Os objetivos deste estudo foram: i) identificar, fenotipicamente, agentes etiológicos de candidemia quanto ao gênero e espécie; ii) diferenciar, por técnicas moleculares, isolados de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, bem como, as novas espécies do complexo *C. parapsilosis*, (*C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*); iii) investigar espécies emergentes de leveduras como agentes de candidemia; iv) verificar a ocorrência de fenótipos de resistência a fluconazol, itraconazol e caspofungina por método de microdiluição. O estudo envolveu 97 isolados provenientes de hemoculturas obtidos de pacientes com quadro clínico indicativo de fungemia, atendidos no período de Jan/2008 a Dez/2010 em um hospital público. O perfil de suscetibilidade a antifúngicos (fluconazol, itraconazol e caspofungina) foi avaliado por microdiluição, segundo metodologia europeia (AFST- EUCAST). A diferenciação das espécies do complexo *C. parapsilosis* foi feita por PCR-RFLP. Para identificação genotípica de *C. albicans* e *C. dubliniensis* foi realizado PCR, com dois primers (CAL5/NL4CAL e CDU2/NL4CAL), indicando ausência de *C. dubliniensis*. Entre os agentes de candidemia encontramos: *C. parapsilosis* (45; 46,4%), *C. albicans* (34; 35,1%), *C. tropicalis* (15; 15,5%), *C. guilliermondii* (2; 2,1%) e *C. glabrata* (1; 1%). Um número significativo de casos de candidemia (50; 51,5%) foi representada por pacientes recém-nascidos e os agentes foram: *C. parapsilosis* (29, 58%), *C. albicans* (18, 36%), *C. tropicalis* (2; 4%), e *C. guilliermondii* (1, 2%). Nós relatamos uma distribuição de espécies incomuns como *C. parapsilosis* superior a *C. albicans* como agente de candidemia prevalente, provavelmente devido a casos recém-nascidos, enfatizando a relevância da identificação precisa das espécies associadas a candidemia no Brasil. Observamos um número reduzido de isolados de *C. orthopsilosis* (3; 3%) e ausência de *C.*

metapsilosis. Estes achados corroboram com dados nacionais e internacionais. Os perfis de suscetibilidade ao fluconazol foi alta (> 90%) para todas as espécies, mas menor para *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. glabrata*. Caspofungina mostrou alta atividade contra todos os isolados. Os dados deste estudo reforçam a importância dos testes de suscetibilidade e identificação precisa das espécies para orientação terapêutica empírica e profilática.

ABSTRACT

The occurrence of candidemia depends on the hospital, geographic region, risk factors and patient age, besides the antifungal usage in hospital units. In the coastal region of Santos city, Sao Paulo State, there is no epidemiological surveillance data regarding candidemia occurrence. We aimed in this study i) to phenotypically identify the etiologic agents of candidemia, ii) molecularly determine the presence of *C. dubliniensis* among phenotypes of *C. albicans* and the species of *C. parapsilosis* complex; iii) to investigate the emergency of new candidemia yeast species; iv) to analyze the antifungal susceptibility profile of the candidemia agents to fluconazole, itraconazole and caspofungin. The study involved 97 bloodstream isolates obtained from patients with a clinical profile indicative of fungemia, attended from Jan/2008 to Dec/2010 in a public hospital. The susceptibility profiles to fluconazole, itraconazole, caspofungin was analyzed by microdilution according to European methodology (AFST-EUCAST). The species of *C. parapsilosis* complex were screened by PCR-RFLP methodology. The investigation of *C. dubliniensis* using PCR and two primers CAL5/NL4CAL e CDU2/NL4CAL resulted negative. Among all candidemia agents we found: *C. parapsilosis* (45; 46.4%), *C. albicans* (34; 35.1%); *C. tropicalis* (15; 15.5%); *C. guilliermondii* (2; 2.1%), and *C. glabrata* (1; 1%). A significant high number of cases (50; 51.5%) was represented by newborn patients and the candidemia agents were: *C. parapsilosis* (29; 58%), *C. albicans* (18; 36%), *C. tropicalis* (2; 4%), and *C. guilliermondii* (1; 2%). We reported an unusual species distribution as *C. parapsilosis* exceeding *C. albicans* as prevalent candidemia agent, probably due to the newborn cases, stressing the relevance of accurate identification of species associated with candidemia in Brazil. A low number of *C. orthopsilosis* strains (3; 3%) was identified and no *C. metapsilosis* isolates were found. These findings corroborate with previous national and international data. The susceptibility profiles to fluconazole was high (>90%) for all species, but lower for *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* and *C. glabrata*. Caspofungin showed high activity against all isolates. Data from this study reinforces the importance of susceptibility testing and

accurate species identification for empiric and prophylaxis therapeutic guidance.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

ATCC – *American Type Culture Collection*

bp – Pares de Base

BIOMOL – *Biologia Molecular*

°C – Graus Celsius

C. albicans – *Candida albicans*

C. guilliermondii – *Candida guilliermondii*

C. parapsilosis – *Candida parapsilosis*

C. tropicalis – *Candida tropicalis*

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

CIM – concentração inibitória mínima

CLSI – *Clinical Laboratory Standards Institute*

CASPO – Caspofungina

CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica

DNA - ácido desoxiribonucleico

et al. – do latim: *et alumnii*, em conjunto com

FCZ – Fluconazol

IAL – Instituto Adolfo Lutz

ICS – Infecção de corrente sanguínea

ITZ – Itraconazol

RNA – ácido ribonucleico

SADH – *Secondary alcohol dehydrogenase*

SENTRY – Programa Internacional de Vigilância Antimicrobiana

TBE – tris - borato EDTA

mg/L - Miligrama por Litro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Distribuição (N) por ano de 97 isolados de leveduras causadores de infecção de corrente sanguínea, em hospital da região da Baixada Santista, São Paulo, SP.....	27
Tabela 2 Frequencia de pacientes recém-nascidos com candidemia, em hospital da região da Baixada Santista, SP, Brasil.....	28
Tabela 3 Espécies de <i>Candida</i> spp. isoladas de pacientes recém-nascidos, com infecção de corrente sanguínea, em hospital público na região da Baixada Santista, SP, Brasil.....	29
Tabela 4 Valores de CIM de fluconazol para espécies de leveduras agentes de candidemia em hospital público da Baixada Santista.....	32
Tabela 5 Valores de CIM de itraconazol para espécies de leveduras agentes de candidemia em hospital público da Baixada Santista.....	32
Tabela 6 Valores de CIM de caspofungina para espécies de leveduras agentes de candidemia em hospital público da Baixada Santista.....	33
Tabela 7 Distribuição de valores de CIM (mg/L) de fluconazol frente a 97 isolados de <i>Candida</i> spp. agentes de infecção de corrente sanguínea.....	33
Tabela 8 Distribuição de valores de CIM (mg/L) de itraconazol frente a 97 isolados de <i>Candida</i> spp. agentes de infecção de corrente sanguínea.....	34
Tabela 9 Distribuição de valores de CIM (mg/L) de caspofungina frente a 97 isolados de <i>Candida</i> spp. agentes de infecção de corrente sanguínea.....	35

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Estrutura química da molécula de fluconazol.....11
- Figura 2** Estrutura química da molécula de itraconazol.....11
- Figura 3** Estrutura química da molécula de caspofungina.....12
- Figura 4** Galeria do sistema comercial API 20 C aux® ilustrando a assimilação de compostos de carbono, usada na identificação das espécies de leveduras de interesse médico.....19
- Figura 5** Produtos de PCR em gel de agarose 2%. M- marcador 100pb; 1 e 4 amostras clínicas; 2 e 5 cepa de *C.albicans* ATCC 90028; 3 e 6 cepa de *C. dubliniensis* ATCC 9768..... 22
- Figura 6** Gel de agarose 2% dos produtos de PCR-RFLP. PM: marcador molecular de 100 pb; Linhas 1 a 5: produtos de PCR de isolados clínicos de *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis*, cepa *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. orthopsilosis* ATCC 96139 e *C. metapsilosis* ATCC 96144; Linhas 6 a 10: produto da restrição (enzima *BanI*) de isolados clínicos de *C.orthopsilosis* e *C. parapsilosis*; cepa *C. orthopsilosis* ATCC 96139, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. metapsilosis* ATCC 96144.....23
- Figura 7** Placa de microtitulação usada no método de referência de microdiluição em caldo AFST-EUCAST para determinação de concentração inibitória mínima, onde C⁻, controle negativo; C⁺ controle positivo de crescimento.....25

Figura 8 Espectrofotômetro utilizado na leitura dos resultados da metodologia AFST-EUCAST.....	26
Figura 9 Frequência de espécies de 97 agentes causadores de infecção de corrente sanguínea em hospital público da Baixada Santista.....	30
Figura 10 Suscetibilidade de 97 isolados de <i>Candida</i> spp. agentes de infecção de corrente sanguínea frente ao fluconazol.....	34
Figura 11 Suscetibilidade de 97 isolados de <i>Candida</i> spp. agentes de infecção de corrente sanguínea frente ao itraconazol.....	35
Figura 12 Suscetibilidade de 97 isolados de <i>Candida</i> spp. agentes de de infecção de corrente sanguínea frente a caspofungina.....	36

ÍNDICE

1	Introdução.....	1
1.1	Candidemia.....	1
1.2	Candidemia: frequência e importância.....	3
1.3	Candidemia: agentes.....	5
1.4	Fármacos antifúngicos usados em candidemia.....	9
1.5	Determinação de resistência <i>in vitro</i> a antifúngicos.....	12
1.6	Relevância do estudo dos agentes em candidemia em hospital da Baixada Santista.....	14
2	Objetivos.....	16
2.1	Objetivo geral.....	16
2.2	Objetivos específicos.....	16
3	Material e Métodos.....	17
3.1	Amostras.....	17
3.2	Aspectos Éticos.....	17
3.3	Metodologia Fenotípica.....	18
3.4	Metodologia Molecular.....	19
3.4.1	<i>Extração e quantificação do DNA genômico dos isolados.....</i>	<i>19</i>
3.4.2	<i>Pesquisa de C. dubliniensis.....</i>	<i>21</i>
3.4.3	<i>Análise Molecular do Complexo C. parapsilosis.....</i>	<i>22</i>
3.5	Testes de Sensibilidade a Antifúngicos.....	24

3.5.1 Microdiluição.....	24
4 Forma de análise dos resultados.....	26
5 Resultados.....	27
5.1 Identificação Fenotípica.....	27
5.2 Identificação Molecular.....	29
5.3 Resultados do teste de Concentração Inibitória mínima (CIM).....	31
6 Discussão.....	37
7 Conclusões.....	46
Referências bibliográficas.....	48
Anexo 1 - Documento de Pré-Parecer concedido pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz CEPIAL.....	58
Anexo 2 - Valores de <i>breakpoints</i> para os antifúngicos fluconazol, itraconazol, caspofungina, aplicáveis a cada espécie de <i>Candida spp</i>.....	59
Anexo 3 – Papeleta de envio de leveduras.....	60
Apêndice 1 Identificação fenotípica e genotípica e perfil de suscetibilidade a antifúngicos de 97 isolados de <i>Candida spp</i>. provenientes de um hospital público da Baixada Santista, SP, Brasil.....	61

1 Introdução

As leveduras do gênero *Candida* pertencem ao filo Deuteromycota, são ovais, medem cerca de 5 micra e se multiplicam assexuadamente, por gemulação. Por vezes, coexistem em cultura formas gemulantes (blastoconídios) e outras tubulares e ramificadas, denominadas hifas, verdadeiras ou pseudo-hifas. Muitas espécies constituem população residente da microbiota normal humana, da superfície da pele e de algumas mucosas, sendo que a carga de leveduras varia de acordo com o sítio anatômico. Estudos foram realizados no intuito de determinar a frequência de leveduras na população sadia e os resultados têm demonstrado percentuais que variam de 2% a 70% na pele, cavidade oral, vagina, jejuno, íleo, colón e região anorretal (Sidrim et al., 2004).

Mais de vinte diferentes espécies de *Candida* têm sido relatadas como agentes etiológicos de candidíase invasiva, sendo que mais de 90% se enquadra em apenas cinco delas: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (Pfaller et al., 2007). Entretanto, tem sido descrito o isolamento de espécies emergentes de *Candida* relacionadas a infecções superficiais e invasivas, como: *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis*, *C. inconspícua*, entre outras (Colombo e Guimarães, 2003).

1.1 Candidemia

O aumento do número de casos de infecções fúngicas oportunistas, principalmente, daquelas associadas às leveduras do gênero *Candida* é um fato notório da atualidade (Cantón et al., 2001).

“Foi Langenbeck, em 1839, quem pela primeira vez observou em aftas bucais de um paciente com tifo a mais importante levedura patogênica ao homem, conhecida atualmente como *C. albicans*. Em 1842, David Gruby definiu a candidíase oral e classificou esse microrganismo no gênero *Sporotrichum*; em 1846, Berg estudou detalhadamente o microrganismo e estabeleceu definitivamente sua relação com a candidíase oral; em 1853, Charles Robin denominou esse microrganismo de *Oidium albicans*, redenominado por Zopf, em 1890, em *Monilia albicans*. Somente em 1923, Berkhout transferiu esta espécie para o gênero *C.* criando *C. albicans*. Essa levedura foi descrita no decorrer da história com número superior a 111 diferentes denominações, as quais se encontram descritas no livro *The Yeast*, 1984” (Sidrim et al., 2004, p. 266).

Atualmente as infecções fúngicas são relacionadas ao progresso da medicina, pois, nas últimas décadas ganharam maior importância entre as infecções hospitalares, principalmente, pelo aumento da sobrevivência de pacientes imunossuprimidos, à difusão de transplantes de órgãos, ao uso de práticas invasivas como dispositivos endovasculares, antibioticoterapia de amplo espectro e ao tratamento com drogas imunossupressoras, entre outros (Cantón et al., 2001; Melhem, 2004; Colombo e Guimarães, 2003, Pappas et al., 2009).

Cabe ressaltar que a maioria dos fungos não produz danos ao homem, desde que as barreiras do hospedeiro estejam íntegras. Entretanto, diversos fatores intrínsecos e extrínsecos podem modificar as defesas do hospedeiro. Pacientes hospitalizados, que fazem uso prolongado de antibióticos de largo espectro, sondas e/ou cateteres, e aqueles que apresentam neutropenia e/ou ficam internados por longos períodos são os mais suscetíveis a adquirir fungemia por leveduras; dados, de estudo realizado em hospital público infantil do estado de São Paulo, mostram que

de 59 isolados de sangue, 21 estavam associados ao uso de cateter (Matsumoto et al., 2001).

1.2 Candidemia: frequência e importância

Estudos estimam que, aproximadamente, 10% de todas as infecções invasivas nosocomiais podem ser atribuídas a *Candida* spp. (Cantón, 2001; Wisplinghoff et al., 2004; Pfaller et al., 2007; Dimopoulos et al., 2009). Pacientes internados em unidades de tratamento intensivo (UTI) têm maior possibilidade de desenvolver candidemia e, de acordo com estudos, são descritas taxas em torno de 10% (Ostrosky-Zeichener et al., 2003; Dimopoulos et al., 2009). Nos Estados Unidos espécies de *Candida* spp. são a quarta causa de infecção nosocomial e cerca de 8 a 10% é adquirida durante internação em hospitais (Pfaller e Diekema, 2007).

Na década de 90, *Candida* spp. foi o quarto micro-organismo mais frequentemente isolado de hemoculturas nos Estados Unidos; infecções por *C. albicans* tiveram um aumento relativo de 52% (1980) para 60% (1990) em dez anos (Beck-Sagué, et al., 1993). Em estudo, Pfaller e Diekema (2007) compararam os índices de candidemia na Europa, Estados Unidos e Canadá, destacando uma grande diferença entre eles. Na Europa o índice variou de 1,9 a 11 por 100.000 habitantes, no Canadá foi 2,8/100.000 hab., assim como nos Estados Unidos, mostrando grande variação entre as cidades: Iowa (6,0), São Francisco (7,1), Atlanta (8,7), Connecticut (7,1) e Baltimore com o maior índice 24 por 100.000 habitantes. As taxas encontradas em estudos brasileiros variam, mas podem chegar a 2,4 por 1000 admissões hospitalares (Colombo et al., 2006 e Pereira et al., 2010).

No Brasil, um estudo epidemiológico reuniu dados sobre infecções de corrente sanguínea de quatro hospitais da cidade de São Paulo, durante um período de 12 meses, indicando 7.038 episódios de bacteremias e fungemias, sendo *Candida* spp. responsável por 4,3 % desses quadros (Colombo e Guimarães, 2003). Em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) do Brasil, *Candida* spp. foi o quarto microrganismo mais comumente isolado em amostras de hemoculturas (Colombo et al., 1999; Colombo e Guimarães, 2003). Existem poucos dados oficiais e, conforme informação disponibilizada no site do Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Estado de São Paulo (http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa80_ih.htm), *C. albicans* apresentou índice de 2,4% e isolados classificados como não-*C. albicans* ocorreram em 1,6% dos casos de infecção de corrente sanguínea, internados em 2009, em mais de 600 hospitais no estado. Com base nessa pesquisa, candidemia foi descrita como terceira, ou quarta, causa de infecção sistêmica no Estado de São Paulo no ano de 2009.

Em relação às candidemias, é importante observar que em hospitais de grande porte e complexidade funcional a taxa de mortalidade pode ser elevada, variando de 27% a 79%, sendo o índice de letalidade em torno de 38% (Yamamura et al., 1999; Colombo e Guimarães, 2003). Um estudo transversal e observacional, com 100 episódios de candidemia, realizado no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, entre janeiro de 2001 e dezembro de 2004, mostrou taxa de mortalidade de 56% (França et al., 2008).

Segundo Colombo et al. (1999) a frequência de óbitos varia de acordo com a espécie envolvida, *C. tropicalis* (63%), *C. albicans* (52%) e *C. parapsilosis* com 28%. Horn et al. (2009) observou maior mortalidade entre os casos de infecção por *C. krusei* (52,9%) e menor naqueles com *C. parapsilosis* (23,7%).

1.3 Candidemia: agentes

Dados globais sobre as espécies causadoras de candidemia podem ser avaliados pelo estudo SENTRY *Antimicrobial Surveillance Program*, programa de vigilância internacional que, desde 1997, relata frequência, assim como monitora a suscetibilidade global e taxas de resistência a antifúngicos. A última publicação disponível do Programa indicou prevalência mundial de *C. albicans* (48,4%), seguido de *C. glabrata* (18,2%), *C. parapsilosis* (17,1%), *C. tropicalis* (10,6%) e *C. krusei* (2,0%) conforme a região geográfica (Pfaller et al., 2011). Yamamura et al. (1999) reuniram dados de 415 casos de candidemia, de quatorze centros médicos canadenses, sendo 48 (11,6%) em crianças e 367 (88,4%) em adultos. Os patógenos causadores foram: *C. albicans* em 286 casos (68,9%), *C. parapsilosis* em 43 (10,4%), *C. glabrata* em 34 (8,2%), *C. tropicalis* em 27 (6,5%) e outras espécies de *Candida* em 18 (4,3%); candidemia polimicrobiana ocorreu em 7 casos (1,7%).

Embora *C. albicans* tenha notória prevalência como agente causador de candidemia em vários estudos, a incidência no estudo de Horn et al. (2009) foi pouco superior para espécies não-*C. albicans* (54,4%) em relação à *C. albicans* (45,6%). Outra grande pesquisa conduzido por Horn et al. (2009), teve como base a *Prospective Antifungal Therapy Alliance*, estudo multicêntrico, observacional e prospectivo com base nos registros de dados clínicos de pacientes com infecções fúngicas invasivas. Este estudo deu ênfase especial à epidemiologia, diagnóstico e tratamento, de 2.019 pacientes de candidemia, atendidos entre 2004 e 2008.

Em regiões da América Latina, estudos mostraram *C. albicans* com a maior frequência, geralmente, perto de 50% (Goldani et al., 2003; Godoy et al., 2003; Silva et al., 2004; Ruiz et al., 2005; Medrano et al., 2006), dado que corrobora a literatura internacional, nos quais mais de 50% dos pacientes tem essa espécie como agente prevalente (Sandven et al., 2000; Donelli, 2006; Sobel, 2006, Córdoba et al., 2011).

Ruiz et al. (2005) mostraram, com base em 75 amostras de leveduras causadoras de infecção da corrente sanguínea em pacientes internados em hospital público de Botucatu, São Paulo, *C. albicans* como prevalente (38,7%) seguida por *C. parapsilosis*(30,7%).

A maior pesquisa realizada no Brasil, foi conduzida por Matta et al. (2007) e indicou que em 1000 cepas, provenientes de hemoculturas de quatro hospitais terciários no Estado de São Paulo (1995- 2003), *C. albicans* foi responsável por 40% das infecções, seguida de *C. tropicalis* (24,3%), *C. parapsilosis* (23,8%), *C. glabrata* (4,4%) e *C. guilliermondii* (3%).

Uma espécie relacionada à *C. albicans*, denominada *C. dubliniensis* foi descrita na década de 80, em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Esta espécie, aparentemente, é menos patogênica do que *C. albicans*, mas tem maior facilidade em desenvolver resistência a azólicos (Sullivan et al., 1995). Os casos de infecção sistêmica por esta espécie ainda são raros, sendo a espécie, mais associada às infecções de mucosa oral. No entanto, *C. dubliniensis* foi identificada em 22 de 149 isolados de infecção de corrente sanguínea, previamente, classificados como *C. albicans*, provenientes de múltiplos centros nos Estados Unidos (1995-1999). Em 548 amostras de leveduras da coleção da Universidade Federal de São Paulo (SP) verificou-se que 2% das amostras armazenadas como *C. albicans* eram, de fato, *C. dubliniensis* (Colombo e Guimarães, 2003). Estes achados justificam a importância de cepas classificadas como *C. albicans*, serem re-avaliadas quanto à presença de *C. dubliniensis* (Sancak et al., 2003).

C. parapsilosis é um patógeno de via exógena, que pode ser encontrado tanto na pele, como em superfícies mucosas, sendo isolado, frequentemente, de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) 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). *C. parapsilosis* situa-se em segundo lugar dentre os agentes de candidemia, quando a

população sob estudo é pediátrica ou neonatal, pois estes pacientes fazem, uso frequente de cateter e são mais manipulados pelos profissionais de saúde do que pacientes adultos (Matsumoto et al., 2001; Ruiz et al., 2005; Medrano et al., 2006). Xavier et al. (2008), em estudo sobre candidemia neonatal em hospital público do Mato Grosso do Sul, mostraram que em 4 casos a mesma levedura isolada em ponta de cateter estava presente na hemocultura do paciente, com base em tipagem molecular de 25 isolados clínicos de *Candida* spp.

Na década de 90, *C. parapsilosis* foi dividida em três grupos (I, II e III), com base no estudo de seu DNA. Análises moleculares mostraram que, de fato, não se trata de subgrupos, mas sim de três espécies distintas: *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* substituindo os antigos grupos II e III, com base no gene SADH que codifica a enzima *Secondary alcohol dehydrogenase*. (Lin et al., 1995; Roy et al., 1998; Tavanti et al., 2005; Tavanti et al., 2007). As duas novas espécies são, fenotipicamente, idênticas e genotipicamente distintas de *C. parapsilosis* (Tavanti et al., 2005).

C. orthopsilosis e *C. metapsilosis* foram relatadas em infecções da corrente sanguínea e também em outros sítios anatômicos (Gomez-Lopez et al., 2008; Tavanti et al., 2007). Estudo realizado em Barcelona, Espanha, mostra a revisão de 345 isolados de infecção de corrente sanguínea por *Candida*, dentre os quais 68 (23%) foi devido ao complexo *C. parapsilosis*. A prevalência real de *C. parapsilosis*, *sensu stricto* foi de 19,42%, 1,7% para *C. metapsilosis* e 1,4% para *C. orthopsilosis* (Gomez-Lopes et al., 2008).

C. tropicalis, geralmente, está relacionada a infecções endógenas pós-cirúrgicas e também a pacientes com neoplasias, principalmente, leucemia (Diekema et al. 2002; Horn et al. 2009). Entre as espécies do gênero, *C. tropicalis* é a espécie com maior capacidade invasora e dos casos com candidemia, por esta espécie, cerca de 50% a 60% estavam colonizados previamente ao quadro infeccioso. *C. tropicalis* é descrita como o segundo, após *C. albicans*, ou terceiro patógeno, depois de *C. albicans* e *C. parapsilosis* (Catón et al., 2001; Pereira et al., 2008). Grande correlação

às doenças hematológicas e a pacientes receptores de medula óssea foi observada e, por isso, recomenda-se profilaxia antifúngica nos primeiros dias de internação, para diminuir o risco de infecção por essa espécie de levedura (Cantón et al., 2001).

Em países da América Latina, incluindo o Brasil, *C. tropicalis* é a segunda, ou terceira, espécie não-*C. albicans* mais frequentemente associada à candidemia, mesmo em pacientes não portadores de câncer (Goldani et al., 2003; Godoy et al., 2003). Goldani et al. (2003) ressaltaram a importância dessa espécie, publicando o isolamento de *C. tropicalis* de 27% de 101 pacientes avaliados (1996 a 1999) no Hospital das Clínicas de Porto Alegre.

Outra espécie agente de candidemia é *C. glabrata*, que tem maior prevalência em pacientes idosos. Um estudo em 17 centros médicos em Iowa, EUA, descreveu prevalência de 25% dessa espécie em pacientes maiores de 65 anos (Diekema et al., 2002). Pfaller et al., 2011 com base no SENTRY do biênio 2008-2009 mostraram prevalência global de 18,2% para esta espécie de *Candida*.

C. glabrata parece ser a menos virulenta entre as espécies oportunistas, porém, é a que está associada com a segunda maior taxa de mortalidade devido à maior resistência adquirida ao fluconazol, fármaco comumente usado no tratamento em candidemia, nesta espécie (Vazquez et al., 1998 *apud* Cantón et al., 2001). *C. glabrata*, assim como *C. krusei* afeta pacientes com antecedentes de profilaxia antifúngica com fluconazol.

C. krusei é, geralmente, o patógeno isolado de pacientes com neoplasias hematológicas e receptores de transplantes; a espécie tem grande importância devido à sua resistência intrínseca ao fluconazol (Horn et al., 2009). Devido a este fato, alguns autores relatam aumento na ocorrência de fungemias causadas por *C. krusei* em pacientes neutropênicos, expostos ao fluconazol (Colombo e Guimarães, 2003).

1.4 Fármacos antifúngicos usados em candidemia

Com a descoberta da propriedade antimicótica do benzimidazol, vários estudos foram realizados com intuito de descobrir outros derivados azólicos com a mesma propriedade. Surgiram, inicialmente, os derivados imidazólicos, como por exemplo: miconazol (1967), clotrimazol (1969), econazol (1975), isoconazol (1979) e tioconazol (1967). O arsenal terapêutico antifúngico aumentou nos últimos anos, buscando atender à demanda crescente na micologia médica. A partir da década de 1980, devido o incremento nos métodos de diagnóstico, aumento das septicemias por leveduras, procedimentos cirúrgicos invasivos, surgimento de doenças imunossupressoras, como a AIDS/SIDA, estimulou a indústria químico-farmacêutica a buscar novas alternativas de fármacos para o tratamento das infecções fúngicas. Cetoconazol (1981), tioconazol (1984), oxiconazol (1986), entre outros, foram fármacos importantes e, com o avanço na pesquisa, descobriram-se os derivados triazólicos, como por exemplo: fluconazol (1990), itraconazol (1992) e voriconazol (2002).

No tratamento de infecções fúngicas invasivas quatro principais classes de antifúngicos são usadas: polienos, particularmente, anfotericina B, triazóis (fluconazol, voriconazol, itraconazol, posaconazol), equinocandinas (caspofungina, anidulafungina, micafungina) e pirimidinas (flucitosina) (Pappas et al., 2003; Pappas et al., 2009).

O fluconazol (FCZ) é, amplamente, utilizado nas infecções fúngicas e pertencente ao grupo dos triazóis (Figura 1). Esse fármaco age inibindo a 14-alfa lanosterol demetilase, enzima do citocromo P450 que é codificada pelo gene ERG11. A ação implica em uma interferência na cadeia de produção do ergosterol, necessário à estruturação da membrana plasmática do fungo. A falta de ergosterol confere ação fungistática aos triazóis e o acúmulo de esteróis precursores do ergosterol leva à ação fungicida desses fármacos. O FCZ é absorvido rapidamente e sua biodisponibilidade oral resulta em concentrações equivalentes, ao redor de

90%, alcançadas mediante administração intravenosa. Entre os triazóis, é o que tem maior penetração em líquido cefalorraquidiano e de corpo vítreo, chegando a concentrações de, pelo menos, 50% em comparação ao soro, por este motivo é usado no tratamento de infecções intraoculares por *Candida*, assim como naquelas de sistema nervoso central-meningites (Pappas et al., 2009).

O itraconazol (Figura 2) é outro triazol que age de forma semelhante, podendo não ser eficaz em células resistentes a outros azóis, devido à resistência cruzada. Este fármaco é indicado no tratamento de candidíase em mucosas, especialmente em pacientes que tiveram falha clínica usando o fluconazol como primeira opção de terapia. Existem poucos estudos com o uso do mesmo em tratamento de candidíase invasiva, assim como estudos clínicos de avaliação da toxicidade, porém já é descrito que existem diferenças na formulação em cápsula e solução oral na absorção gástrica, por este motivo o itraconazol não é administrado, com frequência, em quadros sistêmicos (Pappas et al., 2009).

Em 2001, o *Food and Drug Administration* (FDA – órgão governamental norte americano criado em 1862 que faz controle de medicamentos) aprovou a caspofungina, membro da classe das equinocandinas, que tem mostrado um papel importante no tratamento de algumas infecções fúngicas invasivas, como na aspergilose (Sidrim et al., 2004). As equinocandinas têm ação na parede celular, interferindo na formação da 1,3 beta-glucana importante para a estruturação da célula fúngica (Pfaller e Diekema 2007; Pappas et al., 2004). A primeira equinocandina indicada para uso clínico foi a caspofungina (Figura 3), indicada para candidemia em pacientes não neutropênicos, ou até mesmo neutropênicos (Pereira et al., 2010). O grande interesse nesse fármaco é para aqueles casos resistentes aos antifúngicos azólicos (Pappas et al., 2009).

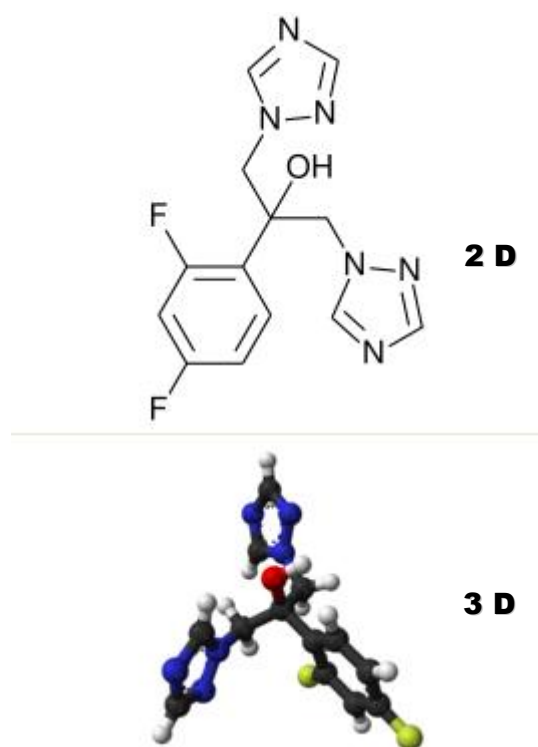


Figura 1 Estrutura química da molécula de fluconazol

Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Fluconazol>

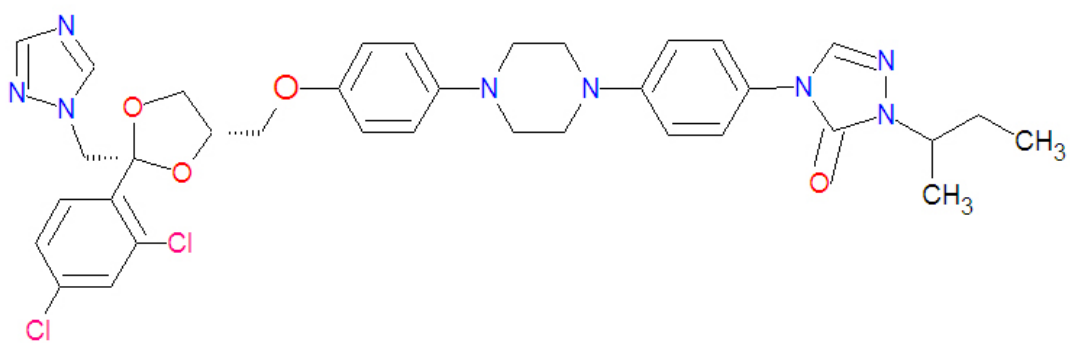


Figura 2 Estrutura química da molécula de itraconazol

Fonte: http://en.citizendium.org/wiki/File:Itraconazole_structure.jpg

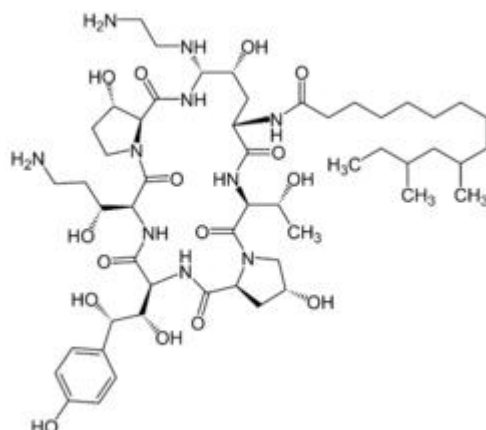


Figura 3 Estrutura química da molécula de caspofungina
Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Caspofungina>

1.5 Determinação de resistência *in vitro* a antifúngicos

A suscetibilidade das leveduras do gênero *Candida* aos antifúngicos disponíveis depende, dentre outros fatores, da espécie do isolado, sendo previsível na maioria delas; porém, nem sempre um determinado isolado segue o padrão geral dos membros de sua espécie. Esta identificação do agente patológico é necessária para o sucesso da terapia empregada (Mendes-Giannini e Melhem, 2000). Colombo (2000) em estudo com hospitais terciários no Brasil identificou, ao lado de *C. albicans* (37%) em 145 casos de candidemia, outras espécies: *C. parasilosis* (25%), *C. tropicalis* (24%), *C. rugosa* (5%) e *C. glabrata* (4%), mostrando que estas, muitas vezes, foram resistentes aos tratamentos convencionais, complicando o quadro clínico do paciente e, tornando assim, ruim o prognóstico do paciente. Essa é uma das razões da crescente importância dos testes de susceptibilidade que deve ser realizado após a identificação de gênero e espécie (Crocco et al., 2004).

As metodologias de referência têm como base a reação de inibição de crescimento do agente etiológico, em meio líquido contendo

antifúngicos, distribuído em tubos ou microplacas. O método de referência, utilizado hoje para investigação *in vitro* de fenótipos resistentes a antifúngicos, foi desenvolvido a partir da década de 80, principalmente pelo *Clinical Laboratory Standards Institute*, CLSI (anteriormente, denominado *National Committee for Clinical and Laboratory Standards*, NCCLS) (CLSI, 2008). Após o ano 2000, o comitê europeu para testes com antimicrobianos (*European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing*, EUCAST) contribuíram para aperfeiçoamento do método, sendo também, atualmente, considerado um método padrão. O método europeu foi criado a partir do norte-americano, no intuito de tornar objetiva e reprodutível a leitura da reação e diminuir o tempo (de 48h para 24h) para leitura do resultado. EUCAST apresenta modificações em relação ao CLSI, tais como: maior concentração (100x mais) de células no inóculo, maior concentração (10x mais) de glicose no meio, uso obrigatório de placas de microtitulação de fundo plano para leitura automatizada em espectrofotômetro (Cuenca-Estrella et al., 2002; Rodriguez-Tudela et al., 2010). O método AFST-EUCAST produz resultados equivalentes ao do CLSI, porém é indicado apenas para análise de leveduras fermentadoras da glicose, como as do gênero *Candida*, quando o método do CLSI aplica-se, também, ao gênero *Cryptococcus* (Espinel-Ingroff et al., 2005).

Em ambos os métodos, a definição de pontos de corte (*breakpoints*) está em constante atualização e, nos dias de hoje, ainda não é aplicada para todos os antifúngicos e espécies de leveduras, sendo esta uma limitação para sua aplicação clínica. Os métodos visam detectar cepas resistentes *in vitro* que poderiam antever falência terapêutica *in vivo*. Dentre as dificuldades de se definir *breakpoint* está a própria definição de resistência aos antifúngicos, que pode ser classificada em: resistência microbiológica e resistência clínica. A resistência clínica é definida, como persistência, ou progressão, de uma infecção, mesmo com a administração do tratamento antifúngico adequado, relaciona-se com distintos fatores, tanto do fármaco, quanto do paciente. Resistência microbiológica, por sua vez, é um fenômeno verificado *in vitro*, no qual o agente etiológico consegue se

desenvolver na presença de concentrações terapêuticas do fármaco, antifúngico (Perea e Patterson, 2002). A resistência microbiológica subdivide-se em três tipos: intrínseca ou inata, primária e secundária (ou adquirida). A intrínseca é dita quando nenhum membro de uma espécie é sensível ao antifúngico, como por exemplo. *C. krusei* frente ao fluconazol. Resistência primária é quando dentro de uma espécie normalmente sensível a determinado antifúngico, encontra-se uma cepa com resistência natural contra o mesmo, sem necessidade de haver estado em contato com o fármaco. Denomina-se resistência secundária, ou adquirida, quando uma cepa, previamente sensível desenvolve resistência ao antifúngico após a exposição. A forma adquirida pode ocorrer de alterações genotípicas, que se manifestam de forma estável, ou transitória, como por exemplo. *C. glabrata* frente ao fluconazol (Mellado et al., 2002; Melhem, 2004).

1.6 Relevância do estudo dos agentes em candidemia em hospital da Baixada Santista

O Ministério da Saúde do Brasil, através da Agência Nacional de Vigilância em Saúde (ANVISA), da Coordenação Geral de Laboratórios (CGLAB) e com o apoio da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), iniciou em 2005 ações para implantação da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana. A rede conta com hospitais-sentinela, públicos e privados, capacitados para triar fenótipos de resistência a fluconazol em amostras de leveduras identificadas, por métodos automatizados ou semi-automatizados. A partir da implementação da rede, em 2006, foram induzidas linhas de pesquisa em cada região do Brasil, visando analisar, com fundamento científico, os dados gerados pela rede, para incorporar novos conhecimentos e disseminar recomendações técnicas para melhoria do controle das infecções em cada local e região.

Atualmente, o Instituto Adolfo Lutz (IAL) da cidade de Santos desenvolve atividades de vigilância laboratorial tendo por finalidade contribuir para elucidação e controle de agravos e riscos da saúde individual e coletiva, assim como investigação e aplicação de métodos apropriados para a prevenção, proteção e recuperação da saúde. Além disso, no decorrer da década de 90, acompanhou a descentralização das ações de vigilância epidemiológica da região, contribuindo para operacionalização da coleta de amostras adequadas e execução de técnicas padronizadas no diagnóstico, das doenças de interesse à saúde pública. De acordo com as necessidades do Sistema Único de Saúde (SUS), o IAL Regional de Santos vem atuando nas áreas de vigilância epidemiológica e sanitária, desenvolvendo atividades de apoio diagnóstico, investigação científica e tecnológica de interesse às prioridades de saúde pública com divulgação do conhecimento gerado.

A Região Metropolitana da Baixada Santista é constituída por 9 municípios, possui uma população de 1.600.000 habitantes e conta com uma rede hospitalar que, nem sempre, realiza hemoculturas para fungos no próprio hospital e, por isso, o laboratório do IAL de Santos recebe amostras biológicas de pacientes de unidades hospitalares para realização de tais exames. A complementação das análises, dependendo de sua complexidade e disponibilidade de recursos, é realizada no Núcleo de Micologia do IAL de São Paulo. Desse modo, o IAL de São Paulo recebe todos os isolados encaminhados pela rede Sentinela e tem a possibilidade de aplicar os métodos de referência para investigação epidemiológica. Um estudo neste contexto pode fornecer dados epidemiológicos para orientar terapia empírica nos hospitais estudados, visando contribuir para o sucesso terapêutico do paciente e o monitoramento de tendências na distribuição de espécies e fenótipos de resistência.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Gerar conhecimentos sobre os agentes de candidemia em hospital público de referência da Baixada Santista, auxiliar o corpo clínico ao tratamento empírico e controle de infecção nessa unidade, servir de subsídio para outros hospitais da região do estado de São Paulo.

2.2 Objetivos específicos

1. Identificar, fenotipicamente, agentes etiológicos de candidemia quanto ao gênero e espécie;
2. Verificar ocorrência de cepas de *C. dubliniensis* dentre fenótipos de *C. albicans*;
3. Investigar a frequência das espécies crípticas, *C. orthopsilosis*, *C. parapsilosis sensu stricto* e *C. metapsilosis* por análise molecular do DNA;
4. Determinar o perfil de suscetibilidade dos agentes de candidemia, aos antifúngicos: fluconazol, itraconazol e caspofungina.

3 Material e Métodos

3.1 Amostras

Foram estudadas todas as amostras de leveduras, de infecção de corrente sanguínea do hospital Guilherme Álvaro, enviadas ao Instituto Adolfo Lutz de São Paulo no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2010. Para cálculo da taxa de frequência do gênero, espécie e fenótipo de resistência, foi contabilizada apenas uma amostra de cada paciente, a menos que obtidas de episódios com um mês de intervalo, e com exceção dos casos com agentes múltiplos, isolados em única, ou várias hemoculturas.

3.2 Aspectos Éticos

A pesquisa antes de sua fase de projeto foi avaliada sob o ponto de vista ético, para assegurar que os participantes da pesquisa agissem com integridade e dignidade. Para tal, três princípios básicos foram usados como norteadores: a beneficência, o respeito à pessoa e a justiça. Além disso, foi realizado no projeto uma avaliação do risco-benefício, visto que, para o desenvolvimento do mesmo foram utilizadas apenas isolados de leveduras que após o diagnóstico seriam descartados pelo hospital de origem e, portanto, o risco desta pesquisa ao paciente é mínimo ou isento. O projeto deste estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética (CEPIAL), conforme anexo 1.

3.3 Metodologia Fenotípica

As amostras de leveduras foram isoladas e identificadas, de modo presuntivo, em *C. albicans* ou “outra levedura” no laboratório do hospital, antes de serem enviadas ao IAL-Santos.

Dos tubos enviados pelos hospitais, contendo a cultura de levedura, foi feito um plaqueamento e purificação em ágar cromogênico (Chromagar, Difco, EEUU), conforme instruções fornecidas pelo fabricante, o mesmo foi utilizado para isolar e identificar presuntivamente *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*; conforme ilustrado:

Cor e aspecto típico da colônia	Microrganismo pré-identificado
Verde	<i>Candida albicans</i>
Azul-metálico	<i>Candida tropicalis</i>
Rosa, rugosa	<i>Candida krusei</i>
Branco à violeta	Outras espécies

Este meio se baseia na utilização do substrato β glicosaminidase e diferencia as leveduras de acordo com a morfologia e a cor das colônias. Os frascos originais (ágar Sabouraud dextrose) foram enviados ao Núcleo de Micologia do IAL-SP juntamente com o laudo de identificação prévia. A identificação de gênero e espécie foi confirmada com uso do sistema comercial API 20 aux (BioMérieux, Fr), conforme instruções fornecidas pelo fabricante (Figura 4). A galeria API 20 C AUX engloba vinte cúpulas que contêm substratos desidratados para efetuar 19 testes de assimilação de compostos de carbono. Após inoculação e incubação, as reações foram comparadas com os controles de crescimento (presença ou ausência de turvação); as leveduras crescem apenas se forem capazes de utilizar o substrato correspondente. A leitura dessas reações faz-se por comparação e a identificação é possível consultando o catálogo analítico ou um sistema de identificação disponível na internet (Api Web); além de análise micromorfológica (Mendes e Melhem, 2000; Lacaz et al., 2002). Os isolados

foram catalogados no banco de cepas do Núcleo de Micologia do IAL–SP, mantidos em solução de glicerol 15% em freezer a – 20°C.



Figura 4 Galeria do sistema comercial API 20 C aux® ilustrando a assimilação de compostos de carbono, usada na identificação das espécies de leveduras de interesse médico.

Fonte: <http://www.microid.co.kr/business/API.htm>

3.4 Metodologia molecular

3.4.1 Extração e quantificação do DNA genômico dos isolados

Para as análises moleculares, foram aplicadas as técnicas de PCR e PCR-RFLP. O DNA genômico de todas as cepas foi extraído, seguindo-se duas etapas:

1) Obtenção de protoplastos (Branchini et al., 1995; Shin et al., 2001)

Algumas colônias de leveduras (24h a 48h) foram removidas para um microtubo (Eppendorf) contendo 1mL de EDTA 50mM. Os microtubos foram centrifugados em microcentrífuga a 10.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foi adicionado 1mL de EDTA 50mM. Este processo de lavagem foi repetido até obtenção de sobrenadante límpido, sendo que, na última lavagem foi deixado apenas o sedimento. O sedimento foi, então, ressuspenso em 200 µL de EDTA 50 mM ao qual foi adicionado 40 µL de enzima Lyticase (100U/80µL). Esta solução foi em seguida incubada em banho-maria a 37°C por 1h, com homogeneização em

vortex a cada 15 minutos. Após incubação, cada microtubo foi centrifugado por 5 minutos e, posteriormente, o sobrenadante foi desprezado.

2) Lise Celular (Sambrook et al.,1989)

Ao protoplasto obtido na primeira fase, foi adicionado 200 µL a 300 µL de tampão de lise (10 mM EDTA; 0,5% SDS; 0,01% N-Laurylsacozyl; 10 µg/ml proteinase K e 10 mM Tris-HCL, ph 8). Após homogeneização com vortex, o material foi incubado em banho-maria a 56°C por 2 h, agitando-se em vortex a cada 20 minutos. Posteriormente, o material foi centrifugado por 5 minutos e o sobrenadante foi retirado para outro tubo Eppendorf. Ao sobrenadante foram adicionados 300 µL de clorofórmio (24:1 clorofórmio/isopropanol) para promover a precipitação das proteínas. Após centrifugação por 15 minutos, houve a formação de três fases. A fase aquosa na parte superior da solução foi retirada para outro tubo Eppendorf. Para promover a precipitação do DNA, foi adicionado 300 µL de isopropanol. O material foi centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante foi desprezado. Ao sedimento foi adicionado 300 µL de etanol 70%. Após centrifugação, por 10 minutos a 10.000 rpm, o sobrenadante foi desprezado. Após secagem do sedimento contendo DNA, o mesmo foi ressuspenso com 50 µL de água para PCR.

Para a quantificação de DNA genômico, as amostras foram analisadas quanto à sua absorvância em espectrofotômetro (NanoDrop 1000), 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/ 280 que tiveram que apresentar valores entre 1,8 e 2,0. Os DNAs genômicos foram mantidos em freezer a - 20°C, até o momento da análise.

3.4.2 Pesquisa de *C. dubliniensis*

A diferenciação entre isolados de *C. albicans* e *C. dubliniensis* foi feita através da técnica de PCR, com duas reações usando PCR SuperMix (Invitrogen) com pares distintos de *primers*, sendo um deles para confirmação de isolados identificados fenotipicamente como sendo *C. albicans* (senso: CAL5- 5'TGTTGCTCTCTCGGGGGCGGCCG-3'; anti-senso: NL4CAL- 5'AAGATCATTATGCCAACATCCTAGGTAAA3') e outro par de *primers* para *C. dubliniensis* (senso: CDU2- 5'AGTTACTCTTTTCGGGGGTGGCCT-3'; anti-senso: NL4CAL- 5'AAGATCATTATGCCAACATCCTAGGTAAA3'), os primers verso e reverso espécie-específico foram designados de uma base de dados contendo sequência que compõem a região 600-nucleotídeos variável (D1/D2) na extremidade 5' da subunidade (26S) do gene rDNA. Nas seguintes condições de amplificação foram empregadas nesta fase: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 95°C por 30minuto; 65°C por 45 minutos; 72°C por 30 minutos e extensão final de 10 minutos a 72°C como descrito por Mannarelli et al. (1998). Após amplificação, os produtos do PCR foram aplicados no gel de agarose (2%) e submetidos à eletroforese, em sistema horizontal contendo solução de TBE (tris - borato EDTA) durante 40 minutos a 100 V e 400 mA. Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio. Cepas-padrão (*C. albicans* ATCC 90028 e *C. dubliniensis* ATCC 9768) foram tratadas e analisadas da mesma forma como os isolados do estudo. Os géis foram, então, observados em transiluminador ultravioleta, com comprimento de onda de 302 nm (Syngene). Os tamanhos das bandas foram comparados e a espécie foi identificada como exemplificado na Figura 5.

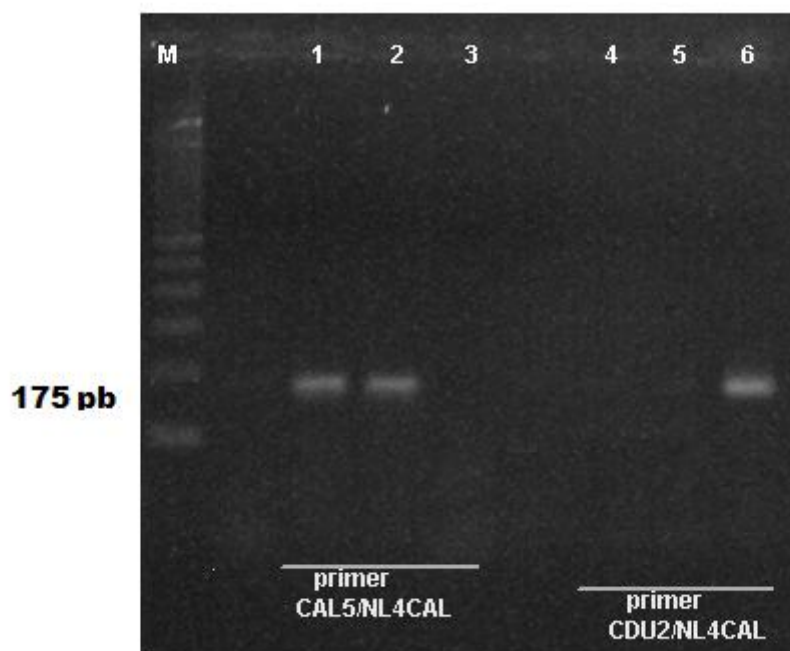


Figura 5 Produtos de PCR em gel de agarose 2%. M- marcador 100pb; 1 e 4 amostras clínicas; 2 e 5 cepa de *C.albicans* ATCC 90028; 3 e 6 cepa de *C. dubliniensis* ATCC 9768.

3.4.3 Análise Molecular do Complexo *C. parapsilosis*

Para diferenciação entre as espécies: *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*, foi utilizada técnica de PCR-RFLP, segundo Tavanti et al., 2005. Para a técnica, o fragmento *SADH* (*Secondary alcohol dehydrogenase*) foi amplificado, utilizando-se PCR SuperMix (Invitrogen) e par de *primers* (S1F: 5' GTTGATGCTGTTGGATTGT-3' e S1R: 5'-CAATGCCAAATCTCCCAA-3') nas seguintes condições: desnaturação inicial de 94° C por 5 minutos, 30 ciclos de 94° C por 1 minuto; 50°C por 1 minuto; 72°C por 1minuto e extensão final de 10 minutos a 72°C. Os produtos do PCR foram, então, digeridos com enzima de restrição *BanI* em tampão específico da enzima por 90 minutos.

Após amplificação, os produtos do PCR-RFLP foram aplicados no gel de agarose (2%) em TBE; submetidos à eletroforese, juntamente, com as cepas-padrão (*C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. orthopsilosis* ATCC 96139 e *C. metapsilosis* ATCC 96144), em sistema horizontal contendo solução de TBE durante 40 minutos a 100V e 400 mA. Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio. Em seguida, observados, em transiluminador (Syngene) ultravioleta (302 nm) e analisadas as bandas, em comparação às produzidas pelas cepas-padrão, para identificação de espécie, como exemplificado na Figura 6.

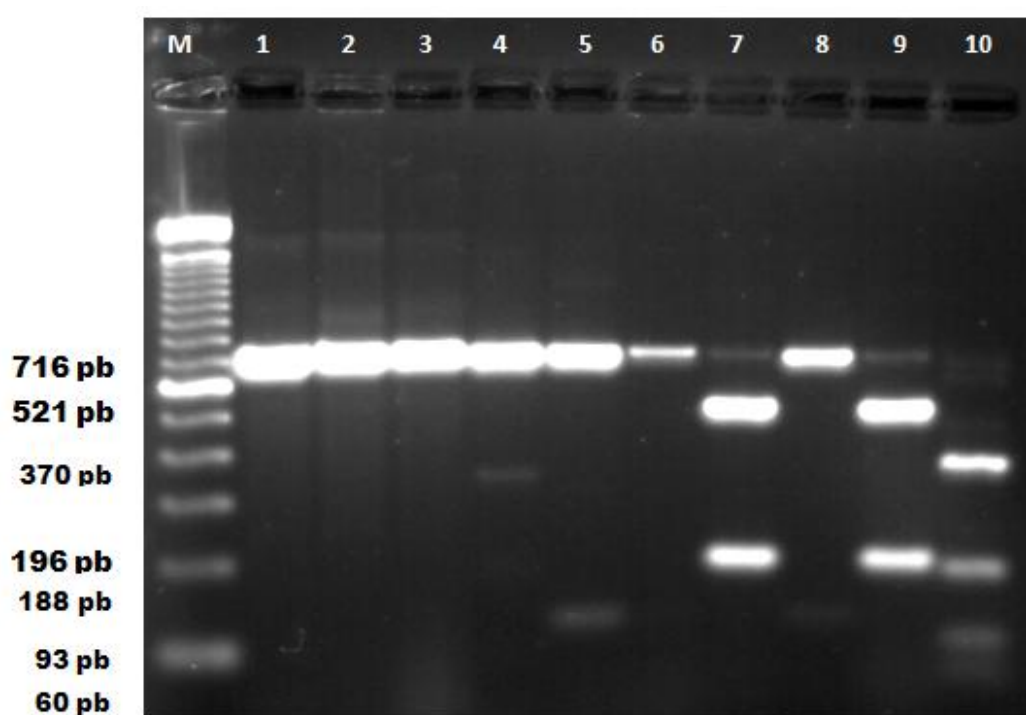


Figura 6 Gel de agarose 2% dos produtos de PCR-RFLP. PM: marcador molecular de 100 pb; Linhas 1 a 5: produtos de PCR de isolados clínicos de *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis*, cepa *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. orthopsilosis* ATCC 96139 e *C. metapsilosis* ATCC 96144; Linhas 6 a 10: produto da restrição (enzima *BanI*) de isolados clínicos de *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis*; cepa *C. orthopsilosis* ATCC 96139, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. metapsilosis* ATCC 96144.

3.5 Testes de Sensibilidade a Antifúngicos

3.5.1 Microdiluição

O perfil de sensibilidade de cada amostra foi avaliado, segundo o subcomitê AFST-EUCAST. Os resultados dos testes foram expressos em concentração inibitória mínima (CIM). O meio de cultura usado na prova foi RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, USA), sem bicarbonato de sódio e com L-glutamina. Soluções-mãe de FCZ e CASPO, em concentração de 5120 mg/L, foram preparadas em água destilada. A solução-mãe de ITZ, na concentração de 1600 µg/mL, foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, EEUU). As soluções de antifúngicos foram então, colocadas nas placas de microtitulação onde foram feitos os testes. As soluções foram preparadas de modo que as suas concentrações finais, após a adição do inóculo de levedura, ficassem entre 64 mg/L e 0,12 mg/L para FCZ e CASPO e para ITZ, entre 8 mg/L e 0,015 mg/L. 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., 2007). Um inóculo de cada amostra foi preparado como suspensão salina em concentração de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL. Alíquotas de 100 µL, de cada inóculo foram colocadas nos poços das placas contendo antifúngicos. 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 foi feito com o meio RPMI, sem antifúngico e sem inóculo, e distribuído em toda a coluna 1. Esse controle 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 cada inóculo.

As placas, conforme exemplo na Figura 7, foram tampadas e incubadas a 35⁰C, 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 (Figura 8).

O ponto de leitura ou “*endpoint*”, que indicou a concentração inibitória mínima (CIM) de FCZ, ITZ e CASPO foi o que permitiu inibição de 50% do crescimento (“*inhibition concentration*” ou IC50) de cada amostra de levedura, em relação ao seu controle positivo.

Resistência *in vitro* foi definida como segue: CIMs de FCZ >4 mg/L, disponível em: (http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Antifungal_breakpoints_v_4.1.pdf, atualizado em 15-03-2012) CIM de ITZ ≥ 1mg/L (CLSI, 2008); CASPO valores de CIM ≥ 1 mg/L para *C. albicans*, *C. tropicalis* e ≥ 8 para *C. parapsilosis* foram usados para classificar isolados não-sensíveis (Pfaller et al., 2011), conforme Anexo 2.

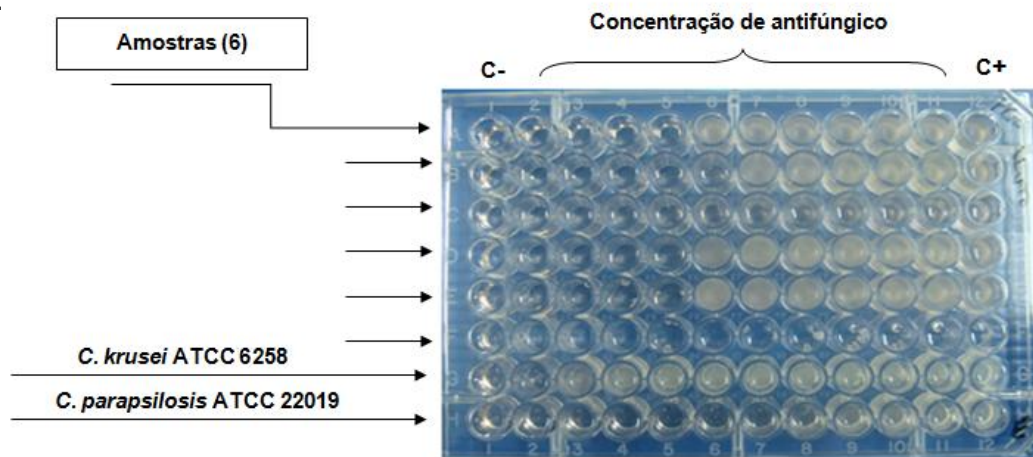


Figura 7 Placa de microtitulação usada no método de referência de microdiluição em caldo AFST-EUCAST para determinação de concentração inibitória mínima, onde C⁻, controle negativo; C⁺ controle positivo de crescimento.



Figura 8 Espectrofotômetro utilizado na leitura dos resultados da metodologia AFST-EUCAST.

4 Forma de análise dos resultados

Os resultados foram analisados segundo frequência das espécies e valores de CIM para cada antifúngico. Os resultados de CIM em termos de valores brutos e categorias de sensibilidade (sensível, intermediária, resistente, não-sensível). Os parâmetros de valor médio, valor modal, CIM₅₀ e CIM₉₀, definidos, respectivamente, como a concentração do fármaco necessária para inibir 50% e 90% das amostras analisadas também foram calculados.

5 Resultados

5.1 Identificação Fenotípica

No período de janeiro de 2008 a dezembro de 2010 foram analisados 97 isolados provenientes de pacientes com diagnóstico de candidemia no hospital de referência da Baixada Santista.

A identificação por métodos fenotípicos resultaram em: *C. parapsilosis* (60,0%-2008; 34,3%-2009 e 44,4%-2010) e *C. albicans* (28,6%-2008; 45,7%-2009 e 29,6%-2010), como as espécies mais frequentes, seguidas de *C. tropicalis* (8,6%-2008; 17,1%-2009 e 22,2%-2010), *C. guilliermondii* (2,9%-2008 e 2009) e *C. glabrata* (3,7%-2010) conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1 Distribuição (N) por ano de 97 isolados de leveduras causadores de infecção de corrente sanguínea, em hospital da região da Baixada Santista, São Paulo, SP

	2008	2009	2010
<i>C.parapsilosis</i>	21 – 60,0%	12 - 34.3%	12 – 44,4%
<i>C. albicans</i>	10 - 28.6%	16 - 45.7%	8 - 29.6%
<i>C. tropicalis</i>	3 - 8.6%	6 - 17.1%	6 - 22.2%
<i>C. guilliermondii</i>	1 - 2.9%	1 - 2.9%	0%
<i>C. glabrata</i>	0%	0%	1 - 3.7%
Total	35 - 100%	35 - 100%	27 - 100%

Dos 97 isolados, todos do gênero *Candida*, 50 (51,5%) correspondem a agentes de infecção em pacientes recém-nascidos e 47 (48,5%) em pacientes não-recém-nascidos, de acordo com as informações contidas na papeleta de envio das amostras (Anexo 3). Em recém-nascidos as espécies foram: *C. parapsilosis* (29, 58%), *C. albicans* (18; 36%), *C. tropicalis* (2; 4%) e *C. guilliermondii* (1; 2%), como mostram as Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 Frequencia de pacientes recém-nascidos com candidemia, em hospital da região da Baixada Santista, SP, Brasil.

População	N (%)
Recém-nascidos	50 (51,5)
Não recém-nascidos	47 (48,5)
Total	97 (100)

Tabela 3 Espécies de *Candida* spp. isoladas de pacientes recém-nascidos, com infecção de corrente sanguínea, em hospital público na região da Baixada Santista, SP, Brasil

Espécie em Recém- nascidos	N (%)
<i>C. parapsilosis</i>	29 (58,0)
<i>C. albicans</i>	18 (36,0)
<i>C. tropicalis</i>	2 (4,0)
<i>C. guilliermondii</i>	1(2,0)
Total	50 (100)

5.2 Identificação Molecular

Nos isolados classificados, fenotipicamente, como *C. albicans* (35,1%), foi confirmada ausência de *C. dubliniensis* após análise molecular.

Dentre os 45 isolados classificados, fenotipicamente, como *C. parapsilosis* (46,4%) foram diferenciados 3 (3,1%) como sendo *C. orthopsilosis*, por apresentar banda de 716 bp, enquanto 42 (43,3%) dos isolados de *C. parapsilosis sensu stricto* apresentaram bandas de 521 bp e 196 bp.

A frequência das espécies, após as análises moleculares, está ilustrada na Figura 9.

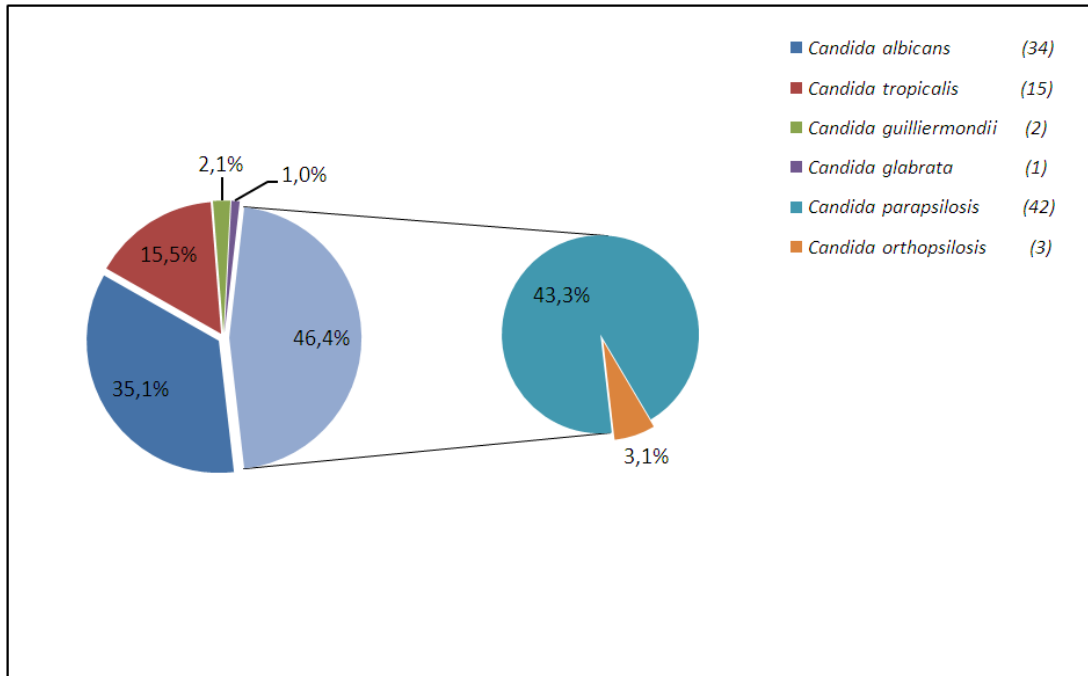


Figura 9 Frequência de espécies de 97 agentes causadores de infecção de corrente sanguínea em hospital público da Baixada Santista

5.3 Resultados do teste de Concentração Inibitória mínima (CIM)

O perfil de sensibilidade dos 97 isolados causadores de infecção de corrente sanguínea foi avaliado frente aos antifúngicos: FCZ, ITZ e CASPO e, com base nos resultados foram calculados o valor modal, média geométrica, intervalo, CIM₅₀ e CIM₉₀ (Tabelas 4, 5 e 6).

Os resultados de CIM constam no Apêndice 1 e a suscetibilidade das 97 amostras frente aos antifúngicos testados pode ser observada nas Tabelas 7, 8, 9 e 10; além de ilustrados nas Figuras 10, 11 e 12.

Valores modais para FCZ, ITZ e CASPO foram respectivamente: 1 mg/L, 0,03 mg/L e 1 mg/L para *C. parapsilosis* e de 0,5 mg/L, 0,03 mg/L e 0,5 mg/L para *C. orthopsilosis*; 0,25 mg/L, 0,03 mg/L e 0,12 mg/L para *C. albicans*; 0,5 mg/L, 0,12 mg/L e 0,12 mg/L para *C. tropicalis*. Para *C. guilliermondii* e *C. glabrata* não foi calculado o valor modal devido o baixo número (n) de isolados.

O intervalo de FCZ frente às espécies foi de 0,5 mg/L a 8 mg/L para *C. parapsilosis*; 0,5 mg/L para *C. orthopsilosis*; 0,12 mg/L a 1 mg/L para *C. albicans*; 0,12 mg/L a 1 mg/L para *C. tropicalis*; *C. guilliermondii* foi de 2 mg/L a 16 mg/L e 64 mg/L para *C. glabrata*.

Para ITZ, o intervalo de CIM foi, de 0,015 mg/L a 0,12 mg/L para *C. parapsilosis*; 0,03 mg/L para *C. orthopsilosis*; 0,015 mg/L a 0,06 mg/L para *C. albicans*; 0,03 mg/L a 0,25 mg/L para *C. tropicalis*; 0,25 mg/L a 0,5 mg/L para *C. guilliermondii* e 0,25 mg/L para *C. glabrata*.

Para CASPO os intervalos foram de 0,12 mg/L a 2 mg/L para *C. parapsilosi*; 0,5 mg/L para *C. orthopsilosis*; 0,12 mg/L a 1 mg/L para *C. albicans*; 0,12 mg/L para *C. tropicalis*; *C. guilliermondii* apresentou intervalo de 0,5 mg/L a 1 mg/L e um único isolado de *C. glabrata* apresentou 0,12 mg/L.

Os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀, respectivamente, para fluconazol, itraconazol e caspofungina foram 1 mg/L / 2 mg/L – 0,03 mg/L / 0,06 mg/L – 0,5 mg/L / 1 mg/L para *C. parapsilosis*; 0,25 mg/L / 0,5 mg/L – 0,03 mg/L / 0,06 mg/L – 0,12 mg/L / 0,12 mg/L para *C. albicans*; 0,5 mg/L – 1 mg/L / 0,12 mg/L – 0,25 mg/L / 0,12 mg/L – 0,12 mg/L para *C. tropicalis*; *C. orthopsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. glabrata* não tiveram valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ calculados devido o baixo número de espécies isoladas neste estudo.

Tabela 4 Valores de CIM de fluconazol para espécies de leveduras agentes de candidemia em hospital público da Baixada Santista.

<u>C I M (mg/L) para FCZ</u>					
Espécie	Moda	Média	Intervalo	CIM50	CIM90
<i>Candida parapsilosis</i> (42)	1	1.48	0.5-8	1	2
<i>Candida orthopsilosis</i> (3)	0.5	0.5	0.5	NC	NC
<i>Candida albicans</i> (34)	0.25	0.31	0.12-1	0.25	0.5
<i>Candida tropicalis</i> (15)	0.5	0.47	0.12-1	0.5	1
<i>Candida guilliermondii</i> (2)	NC	9	2-16	NC	NC
<i>Candida glabrata</i> (1)	NC	NC	64	NC	NC
Total (97)					

NC NÃO CALCULADO

Tabela 5 Valores de CIM de itraconazol para espécies de leveduras agentes de candidemia em hospital público da Baixada Santista.

<u>C I M (mg/L) para ITZ</u>					
Espécie	Moda	Média	Intervalo	CIM50	CIM90
<i>Candida parapsilosis</i> (42)	0.03	0.05	0.015-0.12	0.03	0.06
<i>Candida orthopsilosis</i> (3)	0.03	0.03	0.03	NC	NC
<i>Candida albicans</i> (34)	0.03	0.03	0.015-0.06	0.03	0.06
<i>Candida tropicalis</i> (15)	0.12	0.12	0.03-0.25	0.12	0.25
<i>Candida guilliermondii</i> (2)	NC	0.38	0.25-0.5	NC	NC
<i>Candida glabrata</i> (1)	NC	NC	0.25	NC	NC
Total (97)					

NC NÃO CALCULADO

Tabela 6 Valores de CIM de caspofungina para espécies de leveduras agentes de candidemia em hospital público da Baixada Santista.

C I M (mg/L) para CASPO

Espécie	Moda	Média	Intervalo	CIM50	CIM90
<i>Candida parapsilosis</i> (42)	1	0,73	0,12-2	0,5	1
<i>Candida orthopsilosis</i> (3)	0,5	0,5	0,5	NC	NC
<i>Candida albicans</i> (34)	0,12	0,16	0,12-1	0,12	0,12
<i>Candida tropicalis</i> (15)	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
<i>Candida guilliermondii</i> (2)	NC	0,75	0,5-1	NC	NC
<i>Candida glabrata</i> (1)	NC	NC	0,12	NC	NC
Total (97)					

NC NÃO CALCULADO

Tabela 7 Distribuição de valores de CIM (mg/L) de fluconazol frente a 97 isolados de *Candida* spp. agentes de infecção de corrente sanguínea

Espécie	CIM (mg/L) FCZ									
	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
<i>Candida parapsilosis</i> (42)	0	0	7	21	11	2	1	0	0	0
<i>Candida orthopsilosis</i> (3)	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida albicans</i> (34)	4	24	4	2	0	0	0	0	0	0
<i>Candida tropicalis</i> (15)	1	4	8	2	0	0	0	0	0	0
<i>Candida guilliermondii</i> (2)	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
<i>Candida glabrata</i> (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Total (97)	5	28	22	25	12	2	1	1	0	1

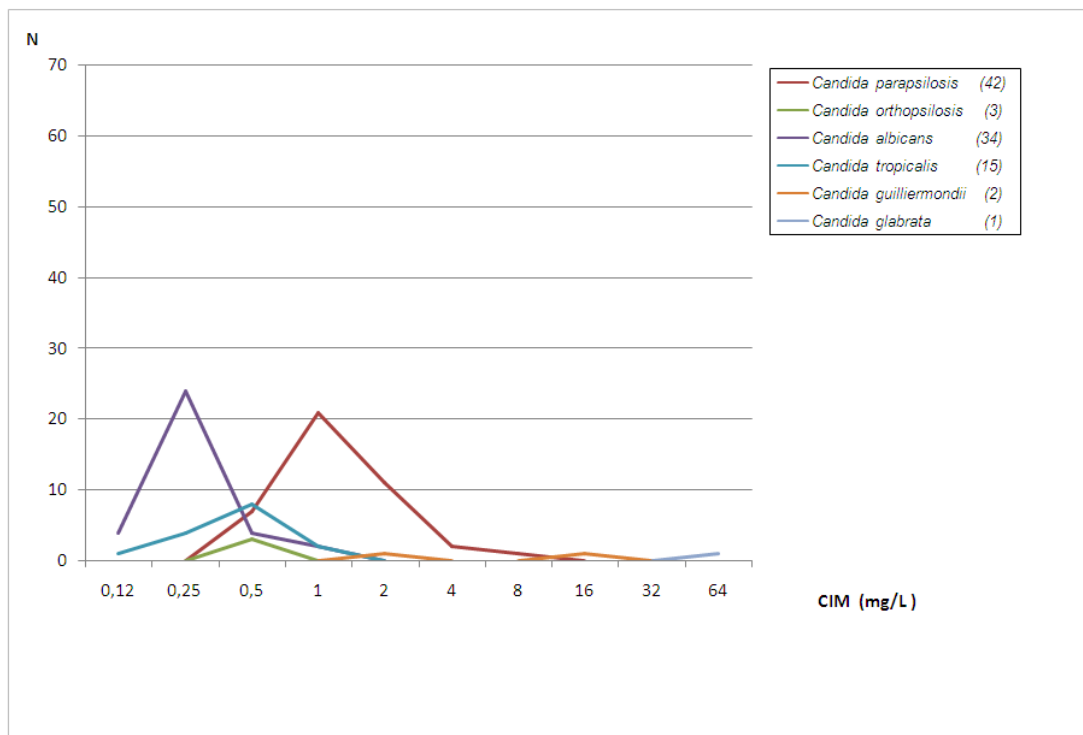


Figura 10 Suscetibilidade de 97 isolados de *Candida* spp. agentes de infecção de corrente sanguínea frente ao fluconazol.

Tabela 8 Distribuição de valores de CIM (mg/L) de itraconazol frente a 97 isolados de *Candida* spp. agentes de infecção de corrente sanguínea.

Espécie	CIM (mg/L) ITZ									
	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8
<i>Candida parapsilosis</i> (42)	2	20	16	4	0	0	0	0	0	0
<i>Candida orthopsilosis</i> (3)	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida albicans</i> (34)	8	20	6	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida tropicalis</i> (15)	0	1	5	6	3	0	0	0	0	0
<i>Candida guilliermondii</i> (2)	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
<i>Candida glabrata</i> (1)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Total (97)	10	44	27	10	5	1	0	0	0	0

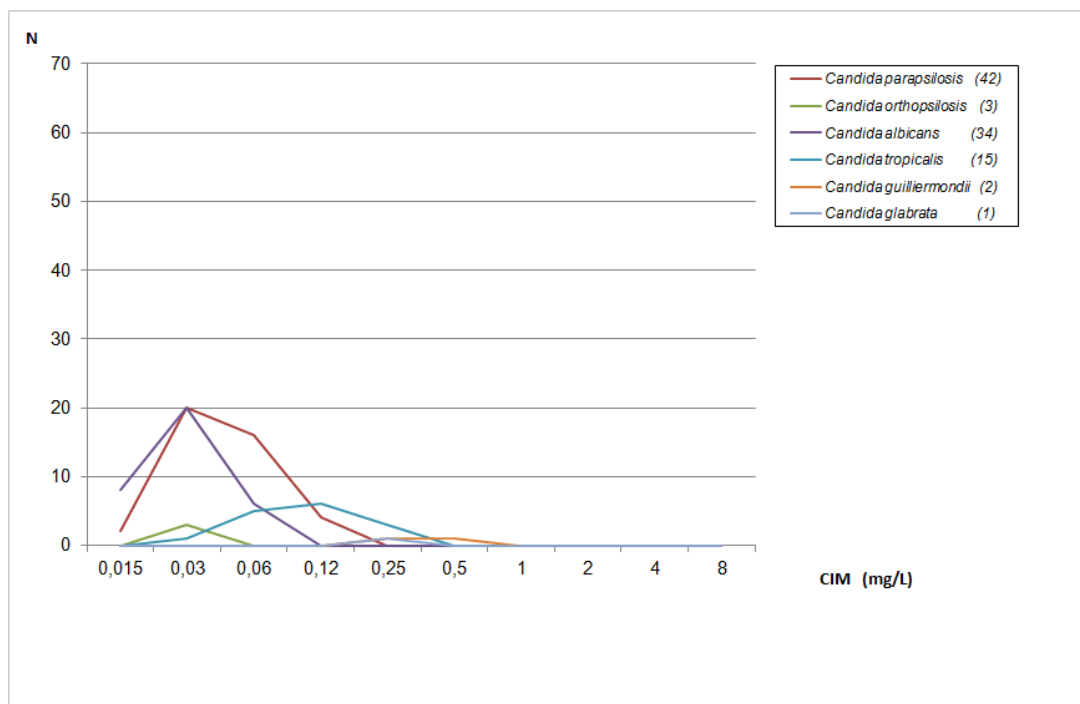


Figura 11 Suscetibilidade de 97 isolados de *Candida* spp. agentes de infecção de corrente sanguínea frente ao itraconazol

Tabela 9 Distribuição de valores de CIM (mg/L) de caspofungina frente a 97 isolados de *Candida* spp. agentes de infecção de corrente sanguínea.

Espécie	CIM (mg/L) CASPO									
	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
<i>Candida parapsilosis</i> (42)	1	7	14	18	2	0	0	0	0	0
<i>Candida orthopsilosis</i> (3)	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida albicans</i> (34)	31	1	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Candida tropicalis</i> (15)	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida guilliermondii</i> (2)	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Candida glabrata</i> (1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total (97)	48	8	19	20	2	0	0	0	0	0

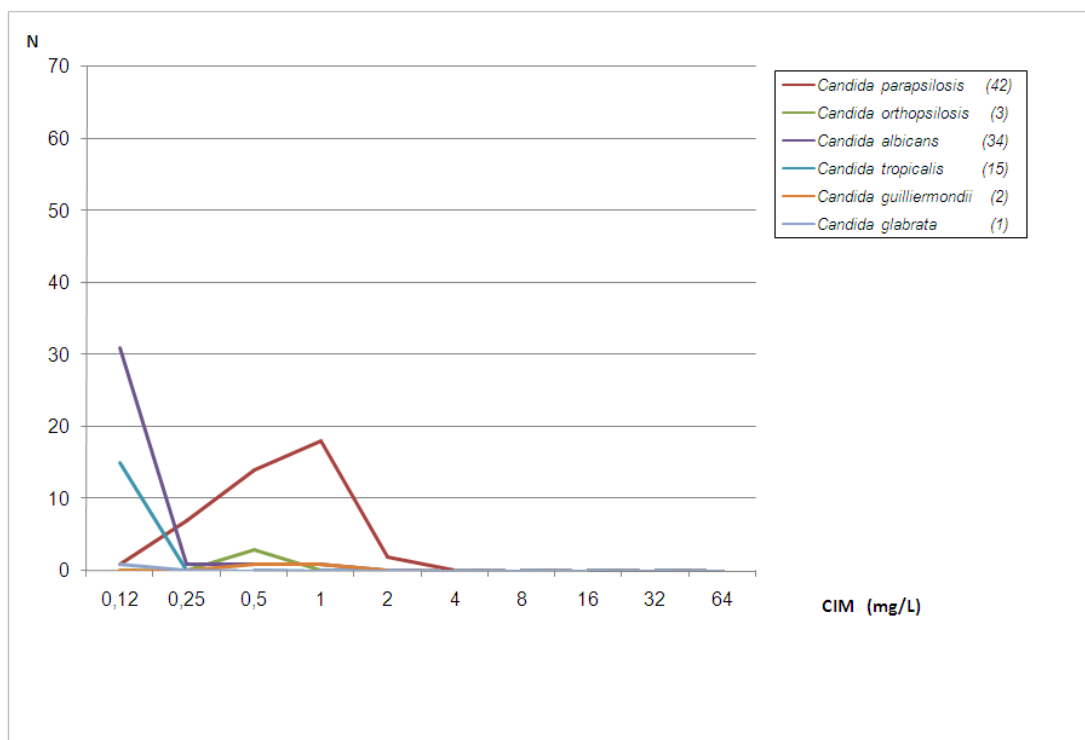


Figura 12 Suscetibilidade de 97 isolados de *Candida* spp. agentes de infecção de corrente sanguínea frente a caspofungina.

Tabela 10 Classificação dos 97 agentes de infecção de corrente sanguínea de acordo com os valores de concentração inibitória mínima (CIM)

Antifúngico espécie	FCZ			ITZ			CASPO		
	S	I	R	S	S-DD	R	S	I	R
<i>C. parapsilosis</i> (42)	39	2	1	42	0	0	42	0	0
<i>C. orthopsilosis</i> (3)	3	0	0	3	0	0	3	0	0
<i>C. albicans</i> (34)	34	0	0	34	0	0	32	1	1
<i>C. tropicalis</i> (15)	15	0	0	12	3	0	15	0	0
<i>C. guilliermondii</i> (2)				0	2	0			
<i>C. glabrata</i> (1)				0	1	0			

6. Discussão

Em hospitais brasileiros de alta complexidade, o gênero *Candida* tem grande importância pela morbidade (aproximadamente, 80% das infecções fúngicas) e letalidade (40%-60%), segundo Colombo e Guimarães (2003). O maior estudo em agentes de candidemia é o Programa SENTRY, cujos dados enfatizam a relevância mundial do tema. Em 2007, Pfaller et al. divulgaram os resultados (1997-2005) da análise do maior número de cepas (196.508 isolados de *Candida* spp.) de 134 centros médicos de distintas regiões: Ásia, América Latina, Europa, África, Oriente Médio e América do Norte, que confirmaram *C. albicans* como prevalente (65,6%) dentre isolados de *Candida* spp. Em nossa pesquisa, a taxa de *C. albicans* encontrada foi menor (34; 35,1%) entre os 97 agentes causadores de infecção de corrente sanguínea, se comparado ao estudo mundial. O entanto, a porcentagem se assemelha a outras obtidas por outros estudos brasileiros que também mostraram *C. albicans*, em frequência menor do que a soma das outras espécies como: Colombo et al., 2003; Matta et al., 2007 (40%) e Ruiz et al., 2005 com 38,7% para *C. albicans*. As diferenças podem ser explicadas, pela população estudada que apresentam fatores de risco distintos que podem influenciar na distribuição das espécies, como é o caso de recém-nascidos, presentes em grande parte da população deste estudo, assim como pacientes pediátricos (Ruiz et al., 2005).

A determinação acurada da espécie causal das infecções invasivas por leveduras do gênero *Candida* tem grande importância epidemiológica, pois o prognóstico pode ser melhor definido, assim como diagnóstica na escolha do fármaco e, em particular, nos aspectos de resistência a antifúngico. Após a descrição de *C. dubliniensis*, espécie críptica de *C. albicans* que pode apresentar resistência ao fluconazol, os testes moleculares para busca desse agente tornaram-se importantes. Com amplificação de bandas genômicas, todos os isolados de *C. albicans* identificados fenotipicamente neste estudo, foram analisados. Nenhum

isolado de *C. albicans* foi re-classificado como sendo *C. dubliniensis*, após análise molecular por PCR, dado concordante com a literatura que indica baixo índice para esta espécie, confirmando a raridade de *C. dubliniensis* como agente de candidemia. Este achado, muitas vezes, pode ser associado a diversos fatores, incluindo até questões técnicas, como metodologia de isolamento e identificação (Chang et al., 2003). Horn et al. (2009) com base em 2019 cepas isoladas de hemoculturas de casos do Canadá, identificaram 0,35% de *C. dubliniensis*, mostrando taxa baixa (0,5%) e semelhante a descrita em estudos prévios, conforme revisão de Messer et al. (2009). Em estudo de 12 meses sobre candidemia realizado na Escócia, Reino Unido, Odds et al. (2007), identificaram *C. albicans* como espécie prevalente (152 isolados), sendo que 7 pacientes apresentaram *C. dubliniensis*, resultando em frequência baixa (2,9%) condizente com os dados já publicados. Dimopoulos et al. (2009) em estudo de 10 anos na Grécia, no entanto, encontraram a maior taxa (8,8%), até hoje registrada na literatura, de *C. dubliniensis* em amostras de hemocultura (n=135), provenientes de pacientes em Unidade de Terapia Intensiva (UTI).

Ao lado de *C. albicans*, a espécie de maior relevância global em candidemia é *C. parapsilosis*, como confirmado neste estudo. Essa espécie representou 6,6% de 141.383 isolados de *Candida* compilados entre 2001 a 2005, pelo Programa ARTEMIS (*ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program*) e foi o agente em candidemia 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 para *C. parapsilosis* (7,5%), ocupando a terceira posição entre os agentes de candidemia, após *C. albicans* e *C. glabrata* (Leroy et al., 2009). Alguns estudos brasileiros mostram *C. parapsilosis* sendo segundo, ou terceiro, agente mais comum em candidemias, como Matta et al. (2007) em 23,8% e Colombo et al. (2006) em 20,5% dos isolados estudados.

A diferença observada na frequência entre *C. albicans* (35,1%) e *C. parapsilosis* (46,4%), neste estudo pode ser explicada pela população de

pacientes classificados como recém-nascidos que correspondeu a 55,1% dos pacientes com infecção de corrente sanguínea. *C. parapsilosis* foi a espécie prevalente em UTI neonatal, possivelmente, pela alta manipulação necessária aos pacientes. Além disso, um recém-nascido deve ser considerado como um indivíduo imunodeficiente, seu sistema imunológico é imaturo no momento nascimento, que desse modo está sujeito a maior risco de infecção fúngica nosocomial (Cantón et al., 2001). Soma-se a esta situação o fato dessa espécie ter alta capacidade de se manter em soluções glicosiladas, além de produzir biofilmes (Branchini et al., 1994; Medrano et al., 2006). A espécie está associada à contaminação exógena relacionada ao uso de cateter e ao contato intenso pelos profissionais de saúde aos pacientes (Matsumoto et al., 2007, Ruiz et al., 2005; Medrano et al., 2006). O estudo de Lupetti et al. (2002) exemplifica bem a transmissão nosocomial dessa espécie. Os autores descreveram um caso de fungemia por *C. parapsilosis* em recém-nascido e atribuíram a transmissão horizontal por interação direta entre enfermeiros e bebê, sendo que este desenvolveu primeiramente, um quadro de conjuntivite e, mais tarde, candidíase sistêmica; a colonização infantil por transmissão vertical da mãe foi excluída, porque *C. parapsilosis* nunca foi isolado das culturas de triagem realizadas no período de internação do bebê na UTI-neonatal

De modo interessante, Pereira et al. (2010) estudaram 52 casos de candidemia, com maioria dos casos (26%) apresentando *C. parapsilosis* como agente infectante, mas sem relação com faixa etária da população.

A infecção por *C. 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, com precisão, espécies do complexo *C. parapsilosis* (Pfaller et al., 2008; Pereira et al., 2010). Sabe-se hoje que *C. parapsilosis* representa um complexo de três membros e, dada a alta importância desse agente em candidemia, a identificação das espécies crípticas é obrigatória em estudo epidemiológico. Nesta dissertação, dentre os 45 fenótipos classificados como sendo *C. parapsilosis* e submetidos à

reação de PCR-RFLP, apenas 3 (3,1%) foram identificados como sendo *C. orthopsilosis*. Essa taxa é similar àquela descrita (4,5%) por Tavanti et al. (2007) encontrada dentre 33 isolados (13 pacientes) obtidos de vários hospitais na Itália. No único estudo brasileiro, Gonçalves et al. (2010) mostraram prevalência um pouco maior (9%) de *C. orthopsilosis* entre 141 agentes de candidemia. Os autores encontraram, ainda, 3% de isolados de *C. metapsilosis*, espécie não observada neste estudo. Na metodologia empregada neste estudo, nenhum isolado correspondeu ao perfil molecular de *C. metapsilosis*. Raros estudos descreveram *C. metapsilosis* em hemoculturas, sendo que as taxas são sempre baixas. Lockhart et al. (2008) descrevem que, de 1929 isolados classificados como *C. parapsilosis*, apenas 34 (1,8%) foram re-classificados com *C. metapsilosis* e, dentre estes, a maioria (60%) foi proveniente de corrente sanguínea; os demais eram de abscessos, cateteres, fluido de ascite e líquido articular. Gomez-Lopes et al. (2008) descreveram prevalência de 1,7% (6/345) para esta espécie em sangue de casos de candidemia.

A frequência de *C. parapsilosis* ultrapassou a de *C. tropicalis*. As amostras identificadas como *C. tropicalis*, a terceira espécie mais frequente neste estudo (15,5%), geralmente, está relacionada a infecções endógenas pós-cirúrgicas e também a pacientes de neoplasias, principalmente, leucemia e, possivelmente, faziam parte da microbiota intestinal dos pacientes (Diekema et al. 2002; Horn et al. 2009). Embora exista pouca informação na literatura sobre capacidade de cepas de *Candida* sobreviver em superfícies ambientais. Chowdhary et al., 2003; conseguiu recuperar dois isolados de *C. tropicalis*, sendo um proveniente de colchão e outro de cobertor, ambos usados por recém-nascidos em UTI-neonatal, indicando a possibilidade de contaminação nosocomial, por esta espécie, em um paciente na unidade de internação de estudo. Os achados deste estudo enfatizam a importância de *C. tropicalis* como agente de candidemia no Brasil, assim como já descrito por diversos estudos, como em Pereira et al. 2010 (26%), Matta et al., 2007 (24,3%) e Colombo et al., 2006 (20,9%). *C. guilliermondii* apresentou frequência de 2,1% neste estudo, sendo que em

2008 foi isolada de um paciente adulto e, em 2009, de um paciente recém-nascido. *C. guilliermondii* teve a mesma frequência (3%) em infecções de corrente sanguínea na América Latina (Pfaller e Diekema, 2007). Pfaller et al. (2006) descreveram ocorrência de 1029 isolados de *C. guilliermondii*, ressaltando a variação da taxa segundo a região geográfica, com 1,1% (n=190) de isolados provenientes da Ásia, 1,0% (n=392) da Europa, 3,7% (n=413) da América Latina e 0,6% (34) da América do Norte. Segundo Pfaller et al. (2006) é uma espécie mais frequentemente associada com onicomicose sendo, raramente, encontrada como causa de infecção fúngica invasiva. Savini et al. (2010) enfatizam que a literatura já descreve esta espécie como agente de fungemia em pacientes com câncer. De fato, o importante estudo de Girmenia et al. (2006) descreveu aumento da frequência de candidemia devido à *C. guilliermondii*, com 29 de 243 episódios (11,7%) em pacientes com neoplasias hematológicas, em um hospital italiano durante um período de 22 anos. A tipagem molecular, realizada pelos autores, não revelou qualquer evidência de uma fonte de infecção comum; no entanto, pelo menos 65,5% dos 29 episódios ocorreram em pacientes que faziam uso de cateter venoso, indicando uma possível associação com a presença de um corpo estranho intravascular.

Outra espécie já descrita como agente de candidemia em estudos nacionais e internacionais, *C. krusei*, não foi encontrada neste pesquisa. No Brasil, diferente do continente norte-americano e europeu, *C. glabrata* apresenta-se em taxas menores (1,3% e 4%) (Ruiz et al., 2005; Pereira et al., 2010). Em estudo de 12 meses sobre candidemia realizado na Escócia, Reino Unido, Odds et al. (2007) identificaram 21% de *C. glabrata*, ocupando o segundo lugar como agente causador de candidemia. Leroy et al. (2009) descreveram em seu estudo prevalência de 16,7% para esta espécie de *Candida*. *C. glabrata* está associada a candidemia em pacientes idosos (acima de 65 anos), esta espécie foi isolada em apenas um paciente como agente nos casos estudados desta dissertação que englobou grande parte de pacientes jovens.

Em relação aos perfis de suscetibilidade a antifúngicos, os resultados em relação a *C. albicans* indicaram que no amplo intervalo de CIM de fluconazol (0,12 mg/L a 1 mg/L) não há valores que significam resistência a esse fármaco. Os valores encontrados concordam com a afirmação de Pfaller et al. (2004) sobre a manutenção, durante vinte anos, do perfil de sensibilidade de *C. albicans* em várias regiões do globo, frente ao fluconazol, mesmo com o amplo uso profilático e terapêutico desse fármaco. A faixa de valores baixos de CIM é, frequentemente, citada em estudos internacionais como o de Rodriguez-Tudela et al. (2007) e publicações nacionais como os de França et al. (2008) e Matta et al. (2007). Em contraste, um estudo único de Dimopoulos et. al. (2009), na Grécia, mostrou valores máximos de 32 mg/L para *C. albicans*, o que chama atenção, por ser valor raramente descrito para a espécie.

A sensibilidade de *C. albicans* pode ser observada, ainda, sob os parâmetros de CIM₅₀ e CIM₉₀, moda e média geométrica. Comparando com os dados nacionais, os valores encontrados são concordantes com Matta et. al., 2007 (CIM₅₀/CIM₉₀=0,25mg/L/0,5mg/L). Odds et. al. (2007) também observaram valores semelhantes (MIC₅₀/MIC₉₀=0,25mg/L/0,5mg/L) e equivalente a outros trabalhos internacionais, como o de Jung et. al., 2010 (CIM₅₀/CIM₉₀ = 0,125mg/L/0,5mg/L) e Messer et al. 2009 (CIM₅₀/CIM₉₀ = ≤0,5 mg/L/≤0,5mg/L).

Para itraconazol, um fármaco que também pode ser usado em candidemia, os valores de MIC₅₀ (0.03 mg/L) e MIC₉₀ (0,06 mg/L) encontrados neste estudo são iguais aqueles observados por Messer et al., 2009, no Programa de Vigilância Internacional - SENTRY- pelos resultados de 771 isolados de *C. albicans*.

C. albicans frente à caspofungina foi altamente sensível, sendo apenas um isolado classificado como intermediário e outro como resistente ao fármaco; resistência *C. albicans* a classe das equinocandinas não é comum, mas já foi associado com substituições de aminoácidos na enzima

alvo do fármaco (*fkp1*) o que poderia diminuir a afinidade no sítio de ação (Pfaller et al., 2011).

C. parapsilosis frente ao fluconazol apresentou apenas duas amostras com CIMs um pouco mais elevados (4 mg/L), valor considerado intermediário e uma amostra com valor de 8 mg/L, valor considerado resistente segundo *breakpoint* adotado para resultados obtidos pela metodologia AFST-EUCAST. Este valor de CIM para FCZ foi bem inferior ao encontrado por Silva et al. (2009) que descreveram CIMs de 16 mg/L a 64 mg/L em 5,6% dos isolados de *C. parapsilosis*. O valor de CIM₉₀ para fluconazol foi de 2 mg/L igual ao descrito por Matta et al. (2007), sendo um pouco inferior ao descrito por Messer et al. (2009) que mostraram valor de CIM₉₀ de 4 mg/L para *C. parapsilosis* frente ao fluconazol.

A suscetibilidade dos isolados de *C. parapsilosis* frente à caspofungina mostraram CIM₅₀ e CIM₉₀ de 0,5 mg/L e 1mg/L, respectivamente. O valor foi inferior ao descrito por Dimopoulos et. al. (2009) que observou MIC₉₀ de 2 mg/L. Destaca-se que, nesta dissertação, os valores foram maiores do que os encontrados para os isolados de *C. albicans* que apresentaram CIM₅₀ e CIM₉₀ de 0,12 mg/L.

C. tropicalis mostrou-se sensível à caspofungina e FCZ, mas com um quinto (3/15) dos isolados mais resistentes para ITZ, sendo esse fármaco sem definição de *breakpoint* segundo EUCAST. De modo geral, as taxas de resistência a fluconazol, nessa espécie, são variáveis. Pfaller et al. (2004) em seu estudo com isolados de 1992 a 2001, mostraram que os isolados de *C. tropicalis* foram sensíveis ao FCZ, independente da área de origem. Estudos relatam *C. tropicalis* como agente de candidemia com índice de resistência variando de 3 a 7% frente a fármacos azólicos (Matta et al., 2007; Diekema et al., 2002; Hajjeh et al., 2004).

Deve-se ressaltar que existe um problema técnico, denominado *trailing*, fenômeno que leva a falsos resultados de resistência, principalmente, em *C. tropicalis* frente a fármacos azólicos e outras drogas fungistáticas. O fenômeno consiste em crescimento residual da levedura,

mesmo em concentrações acima do CIM, induzindo à interpretação errônea de resistência. Isto ocorre em isolados sensíveis que, quando em testes com leituras tardias (>24h) passam a ser interpretados como resistentes a antifúngicos fungistáticos (Marr et al., 1999; Facioli ., 2009).

C. guilliermondii, neste estudo, apresentou valores de fluconazol sendo uma amostra com MIC de 2 mg/L e outra com MIC 16 mg/L. Valores que segundo artigo de revisão de Savini et al. (2010) devem classificar as cepas como sensível e sensível dose-dependente, respectivamente. Porém, a ausência de *breakpoints* para essa espécie, segundo a metodologia empregada – EUCAST - impede a inserção dos isolados em categorias. Girmenia et al. (2006) mostraram que esta espécie de *Candida* foi altamente sensível em 91% (considerando *breakpoint* norte-americano de CIM \leq 8 μ g/ml) frente ao fluconazol. Há uma forte preocupação sobre o potencial de resistência a fluconazol e outros azóis, assim como ao antifúngico mais potente (anfotericina B) e, ainda, aos novos compostos (equinocandinas) em isolados clínicos de *C. guilliermondii*, enfatizando-se a necessidade de maior atenção a essa espécie, ainda pouco estudada (Cantón et al., 2006).

C. glabrata foi observada em apenas um paciente e apresentou CIM de 64 mg/L para fluconazol; 0,25 g/L para itraconazol e 0,12 mg/L para caspofungina, devido ao n (amostras) a verificação de perfil de resistência pelo método empregado apresenta uma probabilidade muito baixa em ser clinicamente utilizável como parâmetro.

Os índices de candidemia em UTIs nas quais as instalações foram feitas com foco em evitar, ou minimizar, infecções nosocomiais, como: implantação de filtros de absorção de partículas e pressão positiva, dão indícios de que a origem da infecção, muitas vezes, é endógena. A colonização prévia da boca, do trato gastrintestinal, da vagina e da pele também é considerada um fator de risco para infecções oportunistas. No entanto, em muitos casos, a infecção pode ser decorrente de contaminação através das mãos de profissionais da área de saúde, produtos de infusão contaminados, biomateriais e fontes ambientais. Por isso, é importante a

identificação correta da espécie responsável pela candidemia para determinação da fonte de infecção, bem como, conhecimento de seu perfil de suscetibilidade aos fármacos antifúngicos dando subsídios a melhor terapêutica. O avanço tecnológico na área da saúde, juntamente com a avaliação da resistência e caracterização por técnicas de tipagem molecular de cepas de *Candida* spp. podem proporcionar melhorias no diagnóstico e tratamento das candidemias aumentando, assim, a expectativa de cura e prolongando a sobrevida de muitos pacientes.

Os resultados deste estudo corroboram a relevância dos estudos epidemiológicos de monitoramento da infecção sanguínea, destacando a necessidade de uma vigilância contínua para se avaliar as tendências em cada instituição hospitalar.

7. Conclusões

C. parapsilosis foi a espécie que apresentou maior frequência, o que indica a importância da análise acurada da espécie associada ao quadro de candidemia, para monitorar tendências ao longo do tempo e diferenças regionais. Outras espécies encontradas foram: *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii*.

Foi confirmada a espécie *C. parapsilosis* como a de maior prevalência em casos internados em Unidades de Tratamento Intensivo Neo-Natal, em relação, a outros casos.

Foi observada ausência de *C. dubliniensis*, entre fenótipos de *C. albicans* causadores de candidemia. A tipagem molecular de fenótipos de *C. parapsilosis*, indicou poucos isolados de *C. orthopsilosis* como agente de infecção de corrente sanguínea, corroborando com dados da literatura nacional e internacional

A alta suscetibilidade de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* ao fluconazol, confirma dados publicados e pode ser uma informação um subsídio para terapia empírica da candidemia no hospital avaliado.

Itraconazol foi menos ativo, se comparado ao fluconazol, mas nenhuma cepa resistente foi observada, indicando que, em caso de necessidade, esse fármaco pode ser empregado para terapia da candidemia.

Um isolado de *C. guilliermondii* menos sensível ao fluconazol, foi também menos sensível ao itraconazol, ressaltando a ocorrência de resistência cruzada nessa espécie e mostrando a relevância da determinação do perfil de resistência a fármacos antifúngicos frente a agentes de micoses invasivas.

Caspofungina se mostrou eficaz *in vitro*, mesmo para isolados menos sensíveis ao fluconazol, podendo ser uma alternativa de tratamento. Para *C. parapsilosis* esse fármaco foi menos eficaz chamando a atenção para a necessidade de melhor monitoramento dessa espécie.

Referências bibliográficas

Beck-Sagué CM; Jarvis, WR National nosocomial infections surveillance system. Secular trends in the epidemiology nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. *J. Infect Dis* 1993; 167: 1247-1251.

Branchini MLM, Geiger DCP, Fischman O, Pignatari AC. Molecular typing of *C. albicans* strains isolated from nosocomial candidemia. *Rev Inst Med trop São Paulo* 1995; 37(6): 483-487.

Cantón, E.; Viudes, Á.; Pemán, J. Infección sistémica nosocomial por levaduras. *Rev. Iberoam. Micol.* 2001, v. 18, p. 51-55.

Chang MR, Carvalho NCP, Oliveira ALL et al. Surveillance of pediatric infections in a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Braz J Infect Dis* 2003; 7(2):149-160.

Chowdhary A., Becker K, Fegeler W., Gugnani H. C., Kapoor L., Randhawa V. S., Mehta G. An outbreak of candidemia due to *C. tropicalis* in a neonatal intensive care unit. *Mycoses* 2003; 46: 269–274.

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.

Colombo, A. L.; Guimarães, T. Epidemiology of hematogenous infections due to *C. spp.* *Rev. Soc. bras. Med. trop.* 2003; v.36, p.599-607.

Colombo, A. L.; Epidemiology and treatment of hematogenous candidiasis: a Brazilian perspective. *Braz. J. Infect. Dis.* 2000; v. 4, p: 113-118.

Colombo, A. L.; Nucci, M.; Salomão, R.; Branchini, M. L.; Deross A. *et al.*; High rate of non-albicans candidemia in Brazilian tertiarycare hospitals. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1999; v.34, p: 281–286.

Córdoba, S.; Vivot, W., Bosco-Borgeat, M.; Taverna, C.; Szusz, W.; Murisengo, O.; Isla, G.; Davel, G. Species distribution and susceptibility profile of yeasts isolated from blood cultures: results of a multicenter active laboratory-based surveillance study in Argentina *Revista Argentina de Microbiología* (2011); 43: 176-185.

Cuenca-Estrella, M.; Lee-Yang, W.; Ciblak, M. A.; Arthington-Skaggs, B. A.; Mellado, E.; Warnock, D. W.; Rodriguez-Tudela, J. L. Comparative Evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST Broth Microdilution Procedures for Antifungal Susceptibility Testing of *C. Species*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002; 3644–3647.

Crocco EI, Mimica LMI, Muramatu LH, Garcia C, Souza VM, Ruiz LRB, Zaitz C. Identificação de espécies de *C. e* susceptibilidade antifúngica in vitro: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. *An Bras Dermatol*. 2004; 79(6): 689-697.

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.

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

Dimopoulos G, Velegaki 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.; Pfaller, M. A.; Rinaldi, M.; Rodriguez-Tudela, J. L.; Verweij, P. E. International and Multicenter Comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 Broth Microdilution Methods for

Testing Susceptibilities of *C. spp.* to Fluconazole, Itraconazole, Posaconazole, and Voriconazole. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 3884–3889.

Facioli, JB. Estudo sobre a influência do fenômeno trailing na determinação da suscetibilidade a antifúngos em isolados clínicos de *C. tropicalis* [dissertação de mestrado]. São Paulo: Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da SES/SP; 2009.

França J. C. B., Ribeiro C. E. L., Queiroz-Telles F. de. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, freqüência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2008; 41(1): 23-28.

Girmenia, C., G. Pizzarelli, F. Cristini, F. Barchiesi, E. Spreghini, G. Scalise, and P. Martino. *C. guilliermondii* fungemia in patients with hematologic malignancies. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44:2458–2464.

Godoy P, Tiraboschi IN, Severo LC, Bustamante B, Calvo B, Almeida LP *et al.* Species distribution and antifungal susceptibility profile of *C. spp.* bloodstream isolates from Latin American Hospitals. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98(3): 401-5.

Goldani IZ, Mário PSS. *C. tropicalis* Fungemia in a Tertiary Care Hospital. *Journal of infection.* 2003; 46: 155-160.

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 *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis*. Results from populationbased surveillance of candidemia in Spain. *Antimicrob. Agents. Chemother* 2008; 52:1506–1509.

Gonçalves SS, Amorim CS, Nucci M, Padovan AC, Briones MR, Melo AS, Colombo AL. Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *C. parapsilosis* species complex: results from a nationwide surveillance of Candidaemia in Brazil. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16(7): 885-7.

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, et al. Epidemiology and Outcomes of Candidemia in 2019 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy Alliance Registry. *Clinical Infectious Diseases*, 2009; 48:1695 – 703.

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.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vacarri EM, Mello NT. *Tratado de Micologia Médica Lacaz*. 9. ed. São Paulo: Savier; 2002.

Leroy O, Gangneux JP, Montravers P, Mira JP, Gouin F, Sollet JP, Carlet J, Reynes J, Rosenheim M, Regnier B, Lortholary O; Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *C. infections* in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). *Crit Care Med*. 2009; 37(5):1612-8.

Levin AS, Costa SF, Mussi NS, Basso M, Sinto SI, Machado C, Geiger DC, Villares MC, Schreiber AZ, Barone AA, Branchini ML. *C. 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.

Levy I. Emergence of *C. 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 *C. parapsilosis* from Clinical Sources. *J Clin Microbiol* 1995; 33:1815-1821.

Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *C. orthopsilosis*

and *C. metapsilosis*, in comparison to the closely-related species *C. parapsilosis*. J. Clin. Microbiol 2008; 46:2659–2664.

Lupetti A., Tavanti A., Davini P., Ghelardi E., Corsini V., Merusi I., Boldrini A., Campa M., Senesi S. Horizontal Transmission of *C. parapsilosis* Candidemia in a Neonatal Intensive Care Unit. journal of clinical microbiology 2002; 40(7): 2363–2369.

Mannarelli BM, Kurtzman CP. Rapid identification of *C. 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.

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.

Matsumoto Fe, Gandra Rf, Ruiz Ls, Auler Me, Marques Sa, Pires Mf, Gambale W, Paula Cr. Yeast isolated from blood and catheter in children from a public hospital of São Paulo, Brazil. Mycopathologia 2001; 154(2): 63 – 9.

Matta DA, Machado AM, Azevedo AC, Kusano EJ, Travassos NF, Salomao R, Colombo AL. Antifungal susceptibility of 1000 *C. bloodstream* isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 57(4): 399-404.

Medrano DJ, Brilhante RS, Cordeiro Rde A, Rocha MF, Rabenhorst SH, Sidrim JJ. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *C. parapsilosis*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2006; 48(1): 17-20.

Melhem MSC. Manual de Controle das Infecções Hospitalares – Capítulo Resistência de *C.* e outras Leveduras a Anfotericina B e Fluconazol. Manual Técnico. São Paulo: APECIH, 2004.

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

Mendes-Giannini M.J.S & Melhem M.S.C. Fungos. In: Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Autoimunes. Ferreira, W. & Ávila,S (coord.), 2ªed., Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 2000.

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

NCCLS-NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) Clinical Laboratory standards Institute (CLSI), documento M27-A3, 2008.

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.

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.

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

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

Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr., Calandra TF, Edwards Jr., 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.

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

Pappas PG, Rex JH, Sobel JD, Filler SG, Dismukes WE, Walsh TJ, Edwards JE. Guidelines for Treatment of Candidiasis 2004; 161-189.

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

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

Pereira GH, Müller PR, Torchio DS, Szeszs MW, Pukinskas SRBS, Myiashita F, Fernandez LB, Melhem MSC. Prevalência e Características Clínicas das Fungemias em Hospital Terciário da Cidade de São Paulo, Br. Livro de Resumos do VII Fórum de Infecções Fúngicas na Prática Clínica, 2008. Campinas, São Paulo, Brasil.

Pfaller MA, Diekema DJ, Andes D, Arendrup MC, Brown SD, Lockhart SR, Motyl M, Perlin DS, CLSI Subcommittee for Antifungal Testing. Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: Integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. *Drug Resist*, 2011 Jun;14(3):164-76.

Pfaller MA, Moet GJ, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. C. bloodstream infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008-2009. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(2): 561-6.

Pfaller MA, Boyken L, Hollis R, Kroeger J, Messer S, Tendolkar S, Diekema DJ. Use of Epidemiological Cutoff Values To Examine 9-Year Trends in Susceptibility of *C. Species* to Anidulafungin, Caspofungin, and Micafungin. *J.Clin.Microbiol*, 2011; 49(2): 624-629.

Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ng KP, Colombo A, Finkelievich J, Barnes R, Wadula Geographic and temporal trends in isolation and antifungal susceptibility of *C. parapsilosis*: a global assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J. Clin Microbiol.* 2008; 46(3):842-9.

Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Meis JF, Gould IM, et al. RESULTS FROM THE ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2005: an 8,5-Year Analysis of Susceptibilities of *C. Species* and other yeast Species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *J.Clin.Microbiol.*, 2007; 45: 1735-45.

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

Pfaller MA, Diekema DJ, Mendez M et al. *C. guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3551–6.

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.

Rodríguez-Tudela J. L., Arendrup M. C., Cuenca-Estrella M., Donnelly J.P.

Lass-Flörl C. EUCAST BREAKPOINTS FOR ANTIFUNGALS. Drug News & Perspectives 2010; 23(2): 93-97.

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 candidemia. Agents Antimicrobiol. Chemother, 2007.

Roy B, Meyer SA. Confirmation of the Distinct Genotype Groups within the Form Species *C. 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 Medica 2005; 15: 13-21.

Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, v.2, 1989.

Sancak B, Rex JH, Paetznick V, Chen E Rodriguez J. Evaluation of a Method for Identification of *C. dubliniensis* Bloodstream Isolates. J Clin Microbiol 2003; 49 (1): 489-491.

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

Savini V., Catavitello C., Onofrillo D., Masciarelli G., Astolfi D., Balbinot A., Febbo F., D'Amario C. e D'Antonio D. What do we know about *C. guilliermondii*? A voyage throughout past and current literature about this emerging yeast. Mycoses 2010; (54): 434–441.

Shin JH, Shin DH, Song JW, Kee SJ, Suh SP, Ryang DW. Electrophoretic Karyotype Analysis of Sequential *C. parapsilosis* Isolates from Patients with Persistent or Recurrent Fungemia. J Clin Microbiol 2001; 39: 1258–1263.

Sidrim JJC, Rocha MFG. Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan AS; 2004.

Silva AP, Miranda IM, Lisboa C, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Prevalence, Distribution, and Antifungal Susceptibility Profiles of *C. 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 M.C. Antifungal susceptibility of 50 *C.* isolates from invasive mycoses in Chile. *Med Mycol* 2004; 42(3): 283-5.

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

Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *C. dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiol* 1995; 141: 1507-1521.

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

Tavanti A, Hensgens LAM, Ghelardi E, Campa M, Senesi S. Genotyping of *C. 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.

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

Yamamura DL, Rotstein C, Nicolle LE, Ionnou S. Candidemia at selected Canadian sites: results from the Fungal Diseases Registry of the Canadian Infectious Disease Society 1999; 160: 493-499.

Vazquez JA, Dembry LM, Sanchez V, et al. Nosocomial *C. glabrata* colonization: an epidemiologic study. *J Clin Microbiol* 1998; 36:421-426.

Xavier P. C. N., Chang M. R., Nunes M. O., Palhares D. B., Andreotti R. S., Bonfim G. F., Almeida N.F.J. Candidemia neonatal, em hospital público do Mato Grosso do Sul. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2008; 41(5):459-463.

Anexo 1



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
Comitê de Ética em Pesquisa - CEPIAL
Av. Dr. Arnaldo, 355 – Sala 83 - Cerqueira César - 01246-902
Fone: 3068-2859 e-mail: cepial@ial.sp.gov.br



São Paulo, 28 de dezembro de 2011.

Protocolo: 100/2011

Registro CEPIAL nº 020/2011 de 02/08/11

1º Parecer – Protocolo 037/2011 de 05/08/11

2º Parecer – Protocolo 067/2011 de 10/11/11

Projeto de Pesquisa: “Avaliação e perfil de suscetibilidade a antifúngicos dos agentes de candidemia em hospital público de referência da Baixada Santista, Brasil”.

Pesquisador Responsável: Márcia de Souza Carvalho Melhem

Instituição: Instituto Adolfo Lutz

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz - CEPIAL analisou e deliberou em reunião de dezembro de 2011, de acordo com a Resolução CNS nº 196 de 10 de outubro de 1996 e resoluções complementares, o projeto na categoria **APROVADO**.

Em conformidade com o item IX. 2 da Resolução CNS nº 196/1996 - cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios parciais deverão ser encaminhados ao CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Luz Marina Trujillo

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL

1ª via – coordenador

2ª via – CEPIAL

LMT/dvmp

Anexo 2

Valores de *breakpoints* para os antifúngicos fluconazol, itraconazol, caspofungina, aplicáveis a cada espécie de *Candida* spp.

Antifúngico	Fonte	Sensível	S-DD/Intermediário	Resistente
		(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
Fluconazol	AFST-EUCAST*	≤ 2	4	> 4
	CLSI**	≤ 2	4	≥ 8
Itraconazol	CLSI	≤ 0,12	0,25-0,5	≥ 1
Caspofungina	(Pfaller et al., 2011)	≤ 0,25	0,5	≥ 1
<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. krusei</i>				
<i>C. parapsilosis</i>	(Pfaller et al., 2011)	≤ 2	4	≥ 8

AFST-EUCAST, *European Commitee for Antifungal Susceptibility Testing*;

CLSI, *Clinical Laboratory Standard Institute*; * não aplicável por EUCAST

S-DD, *susceptibility dose dependent*, suscetibilidade dependente da dose

(*) *breakpoints* aplicáveis apenas para *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*;

(**) *breakpoint* não aplicável para *C. krusei*.

Anexo 3



INSTITUTO ADOLFO LUTZ
 COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS-SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
 SERVIÇO DE PARASITOLOGIA – SEÇÃO DE MICROLOGIA
 Av. Dr. Arnaldo, 354-02-00 - Jd. do Anjo, 047 - São Carlos - SP

SIGH no IAL

Papeleta de Envio de Levedura
PROGRAMA NACIONAL DE MONITORAMENTO DE RESISTÊNCIA MICROBIANA
 Isolada de SANGUE LCR

NOME PACIENTE..... IDADE.....
 Nº REGISTRO NO HOSPITAL..... UTI/adulto pediátrica neonatal Enfermaria.....
 HOSPITAL: Beneficência Portuguesa Itapocica da Serra Vila Alpina Emílio Ribas
 Guilherme Álvares São Domingos Capão Grajaú Engedra
 Pirajussara Heliópolis Sirio Libanes HC Unicamp Saldini
 Lab. Registro Lab II São Amaro São Ciríaco Sta. Marcelina Regional Oeste Paulo Sacramento
 Bru Tamboré Ferraz Vascon. Mário Covas Arthur R. Saboy V. Penteado Campo Limpo
 LAB. DE APOIO..... do HOSPITAL SENTINELA.....
 LACEN.....
 Data...../...../ 2008 Ass. Responsável pelo preenchimento.....

Preencher no Laboratório

IDENTIFICAÇÃO DA LEVEDURA NO LABORATÓRIO

Nº Kolina	Gênero / Espécie	Halo inibição e/ou MIC de Fluconazol
		Não realizado.....mm (disco-difusão)
		Não realizado.....µg/mL (CLSI <input type="checkbox"/> E-Test <input type="checkbox"/>)

X O teste de sensibilidade não foi realizado no laboratório do hospital

Data/...../ 2008 Ass. Responsável preenchimento.....
 Carimbo

IDENTIFICAÇÃO DA LEVEDURA NO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

SIGH IAL	Gênero / Espécie
_____	_____

Data:/...../ 2008 Ass. Responsável.....
 Carimbo

Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)					Interpretação (doc. M27-A, CLSI, 2002)			
Nº Seção IAL	Fluconazol	Voriconazol	Itraconazol	Anfotericina B	Antifúngico	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)		
						Sensível	200	Resistente
_____					Fluconazol	≤3	16 - 32	≥64
					Voriconazol	≤1	2	≥4
					Itraconazol	≤ 0,12	0,25-0,5	≥1

Data:/...../ 2008 Ass. / Carimbo Responsável

Apêndice 1

Identificação fenotípica e genotípica e perfil de suscetibilidade a antifúngicos de 97 isolados de *Candida* spp. provenientes de um hospital público da Baixada Santista, SP, Brasil.

Nº Amostra	Identificação		CIM (mg/L)		
	fenotípica	genotípica	FCZ	I TZ	CASPO
20090900000414	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	0.25	0.03	0.12
20090900000465	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	0.25	0.03	0.12
20090900000950	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	0.25	0.03	0.12
20090900000954	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	0.25	0.06	0.12
20090900001405	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	0.5	0.06	0.12
20090900001466	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	0.25	0.03	0.12
20090900001514	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	0.25	0.06	0.12
20090900002668	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	0.12	0.03	0.12
20090900002669	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	0.25	0.03	0.12
20090900003151	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	0.25	0.03	0.12
20080100062303	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	0.25	0.03	0.12
20080100079275	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	0.25	0.03	0.12
20080100084341	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	0.12	0.03	0.12
20080100084346	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	0.12	0.03	0.12
20080100089471	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	0.25	0.03	0.12
20090900000953	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	1.0	0.06	1.0
20090900000955	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	2.0	0.06	0.5
20090900000956	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	2.0	0.06	0.25
20090900000958	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	1.0	0.06	0.5
20090900000959	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	2.0	0.06	1.0
20090900001460	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	4.0	0.03	1.0
20090900002307	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	1.0	0.06	0.5
20090900002308	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.06	1.0
20080100053509	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	1.0	0.06	1.0

20080100053513	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	1.0	0.03	1.0
20080100061173	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	1.0	0.12	1.0
20080100061176	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	2.0	0.06	0.5
20080100061180	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	4.0	0.06	0.5
20080100061181	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	1.0	0.03	0.5
20080100079271	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.03	0.12
20080100079277	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	0.5	0.03	0.5
20090900000402	<i>C. tropicalis</i>	NR	0.5	0.12	0.12
20090900000413	<i>C. tropicalis</i>	NR	0.5	0.12	0.12
20090900000949	<i>C. tropicalis</i>	NR	0.25	0.25	0.12
20090900001406	<i>C. tropicalis</i>	NR	1.0	0.25	0.12
20080100062305	<i>C. tropicalis</i>	NR	0.5	0.06	0.12
20090100053661	<i>C. parapsilosis</i>	NR	2.0	0.12	0.5
20090900002671	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	2.0	0.06	0.5
20090900003152	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	2.0	0.12	0.5
20090100054626	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	1.0	0.03	1.0
20080100049673	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	1.0	0.03	1.0
20080100049679	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	1.0	0.03	1.0
20090900002309	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	0.5	0.06	1.0
20090100053655	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	0.25	0.03	0.12
20090100053671	<i>C. tropicalis</i>	NR	0.5	0.06	0.12
20090900003153	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	1.0	0.06	0.5
20090100053654	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	0.25	0.03	0.12
20090100060400	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	1.0	0.03	0.12
20080100079279-2	<i>C. tropicalis</i>	NR	0.5	0.25	0.12
20080100079279-1	<i>C. guilliermondii</i>	NR	16	0.5	0.5
20080100089474	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	0.5	0.06	0.25
20090100060398	<i>C. tropicalis</i>	NR	1.0	0.12	0.12
20090900002311	<i>C. guilliermondii</i>	NR	2.0	0.25	1.0
20080100053509	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	2.0	0.06	1.0
20080100058004	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	1.0	0.03	2.0

20080100061178	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	2.0	0.06	2.0
20080100079269	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	1.0	0.03	1.0
20080100053509	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	2.0	0.12	0.25
20080100053513	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	1.0	0.06	0.5
20080100058004	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	1.0	0.03	0.5
20080100061178-2	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.03	0.5
20080100061178-3	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	1.0	0.15	0.25
20080100061178-4	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	1.0	0.06	0.25
20080100062296	<i>C. tropicalis</i>	NR	0.25	0.12	0.12
20080100079271	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	1.0	0.03	0.25
20080100079275	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	0.25	0.03	0.12
20080100084341	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	0.25	0.03	0.12
20080100084346	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	0.25	0.03	0.12
20080100089471	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	0.25	0.03	0.12
20090900001258	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	0.25	0.03	0.12
20100900000345	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	1.0	0.03	0.25
20100900000346	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	2.0	0.03	1.0
20100900000347	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	1.0	0.015	1.0
20100900000348	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	1.0	0.03	1.0
20100900006582	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	1.0	0.03	1.0
20100900007395	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	0.12	0.015	0.12
20100900006591	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	0.5	0.03	0.5
20100900007399	<i>C. tropicalis</i>	NR	0.5	0.06	0.12
20100900007401	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	0.5	0.015	0.12
20100900007402	<i>C. tropicalis</i>	NR	0.25	0.03	0.12
20100900007404	<i>C. tropicalis</i>	NR	0.25	0.125	0.12
20100900008151	<i>C. tropicalis</i>	NR	0.5	0.125	0.12
20100900008154	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	0.25	0.015	0.12
20100900009008	<i>C. tropicalis</i>	NR	0.5	0.06	0.12
20100900009010	<i>C. tropicalis</i>	NR	0.12	0.06	0.12
20100900009318	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	0.25	0.015	0.12
20100900009012	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.03	1.0
20100900009320	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	64	0.25	0.12
20100900009804	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	0.25	0.015	0.12

20100900009864	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.03	0.5
20100900009865	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.03	0.5
20100900009868	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.03	0.25
20100900009803	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	0.25	0.015	0.12
20100900009430	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	8.0	0.06	1.0
20100900009797	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	0.25	0.015	0.12
20100900009799	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	0.25	0.015	0.12
20100900009866	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	0.5	0.03	0.5

NR, Não realizado; FCZ fluconazol; ITZ, itraconazol; CASPO, caspofungina.