

Hussein Ali Zein

Caracterização do complexo *Candida glabrata* em isolados de hemocultura e avaliação da sensibilidade a antifúngicos

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

Área de Concentração:

Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientadora:

Prof.^a Dr.^a Marcia de S.C.Melhem

São Paulo

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Zein, Hussein Ali

Caracterização do complexo *Candida glabrata* em isolados de hemocultura e avaliação da sensibilidade a antifúngicos/ Hussein Ali Zein – São Paulo, 2014.

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: Marcia de S.C. Melhem

1. *Candida glabrata*
2. Agentes antifúngicos
3. Tolerância a fármacos
4. Concentração inibitória mínima

SES/CCD/CD- 288/14

DEDICATÓRIA

Aos meus pais pelo amor e confiança na concretização de um sonho, que sempre estiveram presentes em todas as etapas da minha vida. A minha orientadora Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem pelo apoio, carinho, voto de confiança e dedicação em todos esses anos.

A todos os amigos do Nucleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz- São Paulo pelo apoio durante a pesquisa.

Muito Obrigado

AGRADECIMENTOS

Às pesquisadoras do Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz, Walderez, Sandra, Dulce, Marilena, pelo amplo conhecimento compartilhado e apoio durante essa fase.

Aos funcionários e amigos do Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz, em especial a Miriam, pela paciência e respeito, me receberam muito bem e colaboraram para realização desse trabalho.

Ao Lucas e Lidiane por me ajudar durante esses anos na realização do trabalho, sempre dispostos a ajudar, independente da situação, serei sempre grato.

À Dayane por ser esta pessoa maravilhosa, sempre disposta a ajudar, uma pessoa com caráter impar.

À banca examinadora de qualificação e de defesa do mestrado, pelas colocações pertinentes para a melhoria desse 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 esta fase.

Aos Professores, aos Mestres, Doutores, e aos que, de uma forma ou de outra, independente de títulos, dedicam-se ao ensino, seja de que área for.

Aos meus amigos Nikolas, Michel e Denise, que sempre me apoiam, incentivaram, acreditaram no meu trabalho e principalmente por serem estas pessoas maravilhosas. Muito Obrigado.

Aos meus familiares e amigos que mesmo longe torceram por mim.

Resumo

Candida glabrata assumiu grande importância na clínica médica, desde que, sua resistência adquirida ao fluconazol foi descrita. Além disso, estudos mostraram a fraca atividade *in vitro* de outros fármacos azólicos contra isolados dessa espécie. *C. glabrata* é agente de infecções invasivas e o monitoramento da eficácia de antifúngicos usados na prática médica frente a isolados dessa espécie tem relevância clínica. *C. bracarensis* e *C. nivariensis* são espécies relacionadas, fenotipicamente, à *C. glabrata* para as quais há necessidade de métodos moleculares para sua identificação. Na América Latina, a ocorrência de infecções em corrente sanguínea por *C. glabrata* e espécies correlatas não é tão alta quanto na América do Norte e, por isso, pouco é conhecido sobre sua distribuição e perfil de suscetibilidade a antifúngicos nessa região. Neste estudo, foram analisados 75 isolados com características morfológicas e bioquímicas de *C. glabrata*, obtidos da corrente sanguínea de pacientes atendidos em hospitais do estado de São Paulo, entre 2007 e 2013. As concentrações inibitórias mínimas (CIM) de cinco fármacos antifúngicos: anfotericina B, caspofungina, voriconazol, fluconazol e itraconazol, foram determinadas pela metodologia de microdiluição de referência M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). A ação fungicida de anfotericina B foi avaliada por método de curva de morte. A pesquisa das duas espécies correlatas foi realizada com metodologia de reação em cadeia da polimerase (PCR) em todos os isolados. Nenhum isolado de *C. bracarensis* e *C. nivariensis* foi encontrado neste estudo. Resistência a itraconazol foi encontrada em 18,6 % (14) das cepas de *C. glabrata*. Altos valores de CIM de voriconazol (> 0,5 mg/L), de acordo com *cut-off* (ponto de corte) epidemiológico, foram observados para duas cepas. O intervalo de CIM para fluconazol variou de 4mg/L a 16mg/L, para caspofungina os valores de CIM situaram-se entre 0,03 mg/L e 0,5 mg/L e os de anfotericina B ficaram entre 0,12mg/L e 1 mg/L. Na curva de morte verificou-se que a maioria das cepas morreu antes das 24h, permanecendo viáveis apenas 3 isolados, sendo que 2 deles não sofreram ação fungicida da anfotericina B dentro das condições experimentais. Concluiu-se que fluconazol, anfotericina B e

caspofungina mostraram forte efeito inibitório frente a todos os 75 isolados de *C. glabrata*; no entanto, resistência ao itraconazol e menor sensibilidade ao voriconazol, assim como tolerância à ação fungicida de anfotericina B foi observada. Esses dados indicaram emergência de isolados resistentes a mais de um fármaco e reforçam a necessidade de monitorar a atividade de antifúngicos usados na clínica médica, com vistas a otimizar o tratamento dos casos de candidemia.

Palavras chave: *Candida glabrata*, Espécies correlatas, Resistência, Antifúngicos

Abstract

Candida glabrata has assumed great importance in clinical medicine, since acquired resistance to fluconazole had been described. Furthermore, studies have shown the weak *in vitro* activity of other azole drugs against isolates of this species. Since *C. glabrata* is an agent of invasive infections, monitoring the effectiveness of antifungal agents used in medical practice against isolates of this species has become of great importance. *C. bracarensis* and *C. nivariensis* are phenotypically related species to *C. glabrata* and so it is necessary molecular methods to identify properly these members. In Latin America, the occurrence of bloodstream infections in *C. glabrata* and related species is not as high as in North America, and little is known about their distribution and antifungal susceptibility profile in this region. In this study, we analyzed 75 isolates with morphological and biochemical features of *C. glabrata* obtained from the bloodstream of patients treated in hospitals in the state of São Paulo, between 2007-2013. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of five antifungal drugs, namely: amphotericin B, caspofungin, voriconazole, fluconazole and itraconazole were determined by microdilution reference method M27-A3 from the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). The fungicidal action of amphotericin B was evaluated by the method of time-kill curves. The investigation of the two related species was performed with polymerase chain reaction (PCR) in all isolates. No isolate of *C. bracarensis* and *C. nivariensis* was found in this study. Resistance to itraconazole was found in 18.6% (14) strains of *C. glabrata*. High MIC values of voriconazole (> 0.5 mg/L), according to epidemiological cut-off were observed for two strains. The fluconazole-MICs ranged from 4mg/L to 16mg/L, caspofungin-MIC were between 0.03 mg/L and 0.5 mg/L, and amphotericin B-MIC were between 0.12 mg/L and 1 mg/L. Time-kill curves method showed that the majority of strains died before 24 h, remaining viable 3 isolates, and 2 of them suffered no fungicidal action of amphotericin B under the experimental conditions. It was concluded that fluconazole, amphotericin B, and caspofungin showed strong inhibitory effect against all 75 clinical isolates of *C. glabrata*, however, resistance to itraconazole and lower susceptibility to

voriconazole, besides tolerance to killing effect of amphotericin B was observed. These data indicate the emergence of strains resistant to more than one drug and reinforce the need to monitor the activity of antifungal agents used in clinical medicine, in order to optimize the treatment of cases of candidemia.

Key words: *Candida glabrata*, related species, Resistance, Antifungals Agents

Lista de Abreviaturas e Siglas

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AMB	Anfotericina B
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
CASPO	Caspofungina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
EUA	Estados Unidos da América
FCZ	Fluconazol
ITZ	Itraconazol
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SDD	Sensibilidade dose dependente
sp.	Espécie
spp.	Espécies
PCR	Reação em cadeia da polimerase
VCZ	Voriconazol
%	Percentual
TBE	Tris/Borato/EDTA

Lista de Tabelas, Figuras e Apêndices

- Figura 1 Célula fúngica: principais sítios de ação dos fármacos antifúngicos e mecanismos de resistência descritos em isolados de *C. glabrata* (adaptado de TSCHERNER et al., 2011)..... 18
- Figura 2 Ilustração de gel de agarose, indicando banda em 423 pb característica de *C. glabrata*: M - padrão de peso molecular de 100 pb; linhas 1 a 25 isolados de *C. glabrata*; com bandas características em 423 pb; *C. glabrata* ATCC 90030.....33
- Figura 3 Ilustração de gel de agarose para eletroforese com reação de PCR, onde: M, padrão de peso molecular de 100 pb; linhas 26 a 50 isolados de *C. glabrata*; ATCC, American Type Culture Collection *C. glabrata* ATCC 9003034
- Figura 4 Ilustração de gel de agarose para eletroforese com reação de PCR, onde: M, padrão de peso molecular de 100 pb; linhas 51 a 73 isolados de *C. glabrata*; ATCC, American Type Culture Collection *C. glabrata* ATCC 9003034
- Figura 5 Ilustração de gel de agarose, indicando banda em 423 pb característica de *C. glabrata*: M - padrão de peso molecular de 100 pb; linhas 74 e 75 isolados de *C. glabrata*; com bandas características em 423 pb; *C. glabrata* ATCC 90030; *C. bracarensis* ATCC 10154; *C. nivariensis* ATCC 9983.....37
- Figura 6 Concentração inibitória mínima (CIM, mg/L) dos 75 isolados de *C. glabrata*, frente aos antifúngicos fluconazol, itraconazol, voriconazol, caspofungina e anfotericina B.....39

Figura 7 Ação fungicida da anfotericina B (1 mg/L) sobre 75 isolados clínicos de <i>C. glabrata</i> , por método de curva de morte. Linha preta: <i>C. glabrata</i> ATCC 90030 sem exposição à anfotericina B.....	43
Figura 8 Ação fungicida de anfotericina B (1 mg/L) sobre 3 isolados de <i>C. glabrata</i> por método de curvas de morte. Linha vermelha: <i>C. glabrata</i> ATCC 90030 sem exposição à anfotericina B.....	44
Tabela 1 Taxa de resistência de <i>C. glabrata</i> a Fluconazol, Itraconazol e Voriconazol segundo estudos realizados com método CLSI	10
Tabela 2 Interpretação dos valores de concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos de acordo com o documento M27 S4E (CLSI, 2012), Pfaller et.al. 2012 e Nolte et. al. 1997.....	32
Tabela 3 Distribuição dos 75 isolados de <i>C. glabrata</i> conforme a concentração inibitória mínima (CIM, mg/L) dos fármacos: Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol, Caspofungina e Anfotericina B	38
Tabela 4 Concentração inibitória mínima (MIC, mg/L 50% e 90%), dos antifúngicos frente a 75 isolados de <i>Candida glabrata</i>	41
Apêndice 1 – Suscetibilidade a antifúngicos (MIC, mg/L) de 26 (1-26) isolados de <i>Candida glabrata</i>	71
Apêndice 2 – Suscetibilidade a antifúngicos (MIC, mg/L) de 24 (26-50) isolados de <i>Candida glabrata</i>	72
Apêndice 3 – Suscetibilidade a antifúngicos (MIC, mg/L) de 25 (50-75) isolados de <i>Candida glabrata</i>	73
Apêndice 4 – Contagem de unidades formadoras de colônias, por mL, na metodologia de curvas de morte para 75 isolados de <i>Candida glabrata</i> frente à anfotericina B.....	74

Índice

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 <i>C. glabrata</i> e espécies relacionadas.....	12
1.2 <i>C. glabrata</i> como agente de candidemia	13
1.3 Resistência a antifúngicos em <i>C. glabrata</i>	16
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Origem dos isolados de <i>Candida glabrata</i>	24
3.2 Purificação, confirmação fenotípica de espécie e manutenção dos isolados	24
3.2.1 Análise morfológica.....	25
3.2.2 Auxanograma.....	25
3.2.3 Zimograma.....	26
3.3 Análise molecular dos fenótipos de <i>Candida glabrata</i>	26
3.3.1 Extração de DNA	26
3.3.2 Lise Celular	27
3.3.3 Quantificação do DNA genômico e determinação de pureza.....	27
3.3.4 Análise molecular do complexo <i>C. glabrata</i> por reação em cadeia da polimerase	27
3.4 Investigação de fenótipos de resistência a antifúngicos	29
3.5 Avaliação do poder fungicida de anfotericina B por curvas de morte	31
4 RESULTADOS	32
5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÕES	53
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

Vários estudos têm relatado espécies de *Candida* como a causa mais importante de micoses invasivas no mundo todo, seguido de membros do gênero *Aspergillus* e espécies de *Cryptococcus*. A frequência geral de candidemia, em pacientes hospitalizados, dobrou nas últimas três décadas (Pfaller & Diekema, 2007; Bonfietti et al., 2012). Além disso, programas de vigilância e controle de patógenos de importância epidemiológica identificaram espécies de *Candida* como a terceira causa mais comum de infecções da corrente sanguínea em unidade de terapia intensiva. Fatores de risco para candidíase invasiva incluem: colonização por espécies de *Candida*, supressão imunológica (neutropenia, drogas imunossupressoras, incluindo glicocorticóides, câncer e quimioterapia) e alterações nas barreiras físicas, tais como: cirurgia gastrointestinal, hemodiálise, nutrição parenteral e tratamento com antibióticos de amplo espectro, que facilitam o acesso do organismo para a corrente sanguínea, (Castano et al., 2005).

Candida representa uma das maiores causas de infecção invasiva e a infecção de corrente sanguínea de origem hospitalar estando associada à alta taxa de mortalidade, aproximadamente, 40% (Malani et al., 2005). Na candidemia, pode ocorrer disseminação a múltiplos órgãos, resultando na formação de micro-abscessos, lesões cutâneas embólicas, abscessos renais e hepato-esplênicos, endocardite, meningite, artrite e osteomielite, entre outras complicações (Zardo & Mezzari, 2004). Espécies de *Candida* chegam a número superior a 150, mas apenas cerca de trinta delas são reconhecidas como patógenos humanos. Os principais agentes são: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii* e *Candida lusitanae* (Jung et al., 2010).

Candida albicans é o agente predominante de candidíases superficiais, bem como profundas; porém, outras espécies de *Candida* têm surgido nos últimos anos como patógenos oportunistas importantes, incluindo *C. glabrata* (Esposito et al., 2013).

C. glabrata é uma espécie que, até poucas décadas atrás, acreditava-se não ser patogênica; porém, com o aumento do número de pessoas com imunodeficiência, provou-se que *C. glabrata* é oportunista, sistêmico ou de mucosa, especialmente causando vulvovaginites, nesse grupo de pacientes (SOBEL *et al.* 2002). Dependendo do sítio da infecção, *C. glabrata* é a 2ª ou 3ª maior causa de candidíase depois de *C. albicans* (Sobel *et al.*, 2002).

A incidência de *C. glabrata* está associada à idade avançada (> 60 anos) e pacientes submetidos à cirurgia abdominal, fato que pode ser decorrente da forte colonização do trato gastrointestinal nesta idade (Lockart *et al.*, 1999; Nunes, 2009). *C. glabrata* é uma espécie de grande importância em candidemias na América do Norte. Em 1989, essa espécie era a quarta mais comumente relacionada à infecção de corrente sanguínea (ICS) nos EUA, no entanto, Trick *et al.* (2002) mostraram que de 1995-1999, *C. glabrata* passou ser a segunda principal responsável por essas infecções. Descrita como sendo relacionada à pacientes idosos, foi responsável por 25% de todas as fungemias documentadas em pacientes maiores de 65 anos (Diekema *et al.*, 2002). A taxa de morbimortalidade é alta em pacientes hospitalizados, em especial, devido à resistência dessa espécie aos antifúngicos da classe dos azóis (Hajjeh *et al.*, 2004).

Tabela 1 Taxa de resistência de *C. glabrata* a Fluconazol, Itraconazol e Voriconazol segundo estudos realizados com método CLSI

País	Autor/Ano	Número de Cepas	Antifúngico	Resistência (%)
EUA*	PFALLER 2010	159	Fluconazol	2,5
EUA	MALANI 2002	103	Fluconazol	60
Mundial	SENTRY 2009	159	Fluconazol	2,5
BRASIL	DA MATTA 2007	44	Fluconazol	4,4
BRASIL	COLOMBO 2006	35	Fluconazol	6
Mundial	SENTRY 2009	159	Itraconazol	39
EUA	SAFDAR 2002	347	Itraconazol	15,2
EUA	PFALLER 2010	159	Voriconazol	2,5

* EUA, Estados Unidos da América

Na América do Sul, a espécie de maior prevalência também é *C. albicans* (Ruiz et al., 2005) e, de acordo com a literatura internacional, *C. albicans* é responsável por cerca de 50% dos pacientes com candidemia (Sobel et al., 2006). A taxa de prevalência dessa espécie varia muito, na dependência de fatores como: idade, população de pacientes, técnicas de identificação e isolamento, tipo de hospital e atendimento (Melhem, 2004). Apesar de *C. albicans* ser o agente prevalente em infecções sistêmicas, há relatos do aumento da frequência de outras espécies, em particular *C. parapsilosis* (Pereira et al., 2010). Espécies consideradas raras foram descritas como agentes desses quadros, como: *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis*, *C. zeylanoides* e *C. inconspícua* (Giannini & Melhem, 2000; Pappas et al., 2009; Passos et al., 2007).

A identificação correta da espécie de *Candida* é importante no tratamento individual do caso, visto que a sensibilidade às terapias antifúngicas varia conforme a espécie. A identificação rápida e presuntiva das espécies de *Candida* é necessária em laboratórios de diagnóstico. Essa análise, manual ou automatizada, é realizada por métodos, com base em técnicas fenotípicas convencionais para análise morfológica e bioquímica (Lacaz et al., 2000).

No entanto, esses procedimentos de rotina não atendem aos requisitos para monitoramento epidemiológico correto que inclui a classificação das espécies de difícil identificação por serem, fenotipicamente, indistinguíveis (Giannini & Melhem, 2000). Em razão dos laboratórios adotarem, recentemente, técnicas moleculares para identificação rápida de isolados de *Candida* spp. muitas espécies crípticas foram descobertas (Tavanti et al., 2005). Ferramentas para identificação correta de espécie e fenótipos de resistência são importantes para identificação dos agentes causais para adequado controle das infecções. Métodos de diagnóstico molecular têm potencial de identificação acurada e o sequenciamento de genes de rDNA permitiu identificar novas espécies dentro de um único fenótipo (Bishop et al., 2007).

Estudos voltados à correta identificação, com base em análise molecular, permitem melhor definição da prevalência, bem como, da resistência a antifúngicos desses agentes. O tratamento empírico de infecções hospitalares

graves e outras formas de candidíase comuns e recidivantes pode ser iniciado com base em dados epidemiológicos de frequência e perfil de sensibilidade dos seus agentes nas distintas regiões do mundo (Colombo; Guimaraes, 2003; Horn et al., 2009). Determinadas espécies, descritas recentemente, dentro de fenótipos de *Candida parapsilosis*, como: *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* são classificadas, apenas, por métodos que incluem análise molecular (Tavanti et al., 2005). Dois estudos de pesquisa independentes descreveram novas espécies crípticas em isolados de *C. glabrata*: *C. nivariensis* (Alcoba- Florez et al., 2005) e *C. bracarensis* (Correia et al., 2006).

1.1 *C. glabrata* e espécies relacionadas

C. glabrata é um organismo comensal, encontrado na microbiota normal da pele, boca, vagina e trato gastrointestinal. É uma levedura pertencente ao maior grupo taxonômico do Reino Fungi, denominado Ascomycetes e à classe Saccharomycotina. *C. glabrata* é considerada uma levedura não dimórfica, pois sua morfologia se restringe, quase que exclusivamente a pequenos blastoconídios (1-4 µm) e sem formação de hifas (Csank & Haynes 2000).

C. glabrata é, evolutivamente, mais relacionada com *Saccharomyces cerevisiae* que a outros fungos patogênicos, tais como: *C. albicans*. No entanto, em contraste com *S. cerevisiae* que pode mudar no seu ciclo de vida entre formas de células diplóides e haplóides (Wong et al., 2002), *C. glabrata* é considerado um organismo haplóide e assexuado. Além disso, embora *C. glabrata* seja, filogeneticamente, mais próxima de *S. cerevisiae* do que outras espécies de *Candida*, essa espécie pode causar com maior frequência, infecções em seres humanos. É provável que as diferenças entre o genoma de *S. cerevisiae* e *C. glabrata* e as semelhanças entre *C. glabrata* e *C. albicans* caracterize sua patogenicidade; no entanto, os fatores de virulência de *C. glabrata* ainda não são bem compreendidos (Bonfietti et al., 2012).

Os quadros de candidemia, nas diversas regiões do globo, mostram distribuições distintas dos agentes etiológicos (Pfaller et al., 1999). A variação na frequência de *C. glabrata*, além da questão geográfica, pode ser atribuída a

outros fatores, como: idade, fatores de risco e doenças de base da população com candidemia (Trick et al., 2002; Pfaller et al., 2007). As duas novas espécies - *C. nivariensis* e *C. bracarensis* -, dado suas características fenotípicas semelhantes à *C. glabrata*, podem, facilmente, serem identificadas erroneamente, dentro da rotina laboratorial como tal. Apesar de que *C. nivariensis* e *C. bracarensis* terem sido, descritas na literatura (Alcoba-Florez et al., 2005; Correia et al., 2006; Bishop et al., 2008), mas sua incidência em isolados de *C. glabrata* continua sendo pouco conhecida (Romeo et al., 2009). *C. nivarensis* e *C. bracarensis* têm sua importância em razão de apresentarem menor sensibilidade aos azóis comparadas a *C. glabrata* (Lockhart et al., 2009; Borman et al., 2008).

A prevalência, a sensibilidade e a significância clínica dessas novas espécies ainda foram pouco estudadas e há uma grande lacuna sobre esse tema na literatura consultada (Lockhart et al., 2009; Borman et al., 2008). Em 2005, *C. nivariensis* foi isolada de três pacientes em um hospital na Espanha, tendo sido classificada como idêntica à *C. glabrata*, mas distinguível por meio do sequenciamento da região ITS2 (*internal transcribed space 2*). Um estudo realizado nos EUA, com 137 isolados de *C. glabrata* identificadas por características fenotípicas, avaliou a presença de *C. bracarensis* e *C. nivariensis* com sondas de hibridização *in situ*, identificando 3 (2,2%) isolados como *C. bracarensis* e nenhum como *C. nivariensis* (Bishop et al., 2007).

1.2 *C. glabrata* como agente de candidemia

Dos quadros de infecção de corrente sanguínea por leveduras, 90% pode ser atribuídos a 5 espécies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (Pfaller & Diekema 2007). *C. albicans* representa 45-60% da incidência de candidíase invasiva nos EUA e em todo o mundo. Na América do Norte, *C. glabrata* representa 20-22% dos casos invasivos de candidíase (Pfaller & Diekema 2007). *C. glabrata* é o segundo agente etiológico de candidemia na América do Norte, enquanto *C. parapsilosis* ou *C. tropicalis* o é na América do

Sul e Europa, após *C. albicans* (Sandven, 2000; Pfaller et al., 2001; Colombo et al., 1999; Godoy et al., 2003; Antunes et al., 2004; Hajjeh et al., 2004; Rodero et al., 2005; Colombo et al., 2006; Pfaller & Diekema, 2007; Colombo et al., 2008; Hinrichsen et al., 2008).

C. glabrata traz preocupação quanto às altas taxas de mortalidade a que está associada, chegando até a 78%, conforme o grupo estudado (Krcmery & Barnes, 2002; Viudes; Peman; Canton; Ubeda et al., 2002; Alonso-Valle et al., 2003; Horn et al., 2009). Em relação a outras espécies, um estudo mostrou mortalidade maior em pacientes com *C. glabrata* (60%) e *C. tropicalis* (75%), quando comparada a *C. albicans* (44%) em indivíduos com infecção de corrente sanguínea (Safdar et al., 2004). As taxas de mortalidade podem ser decorrentes da associação desse agente a pacientes graves, como aqueles em estágio terminal de câncer e pacientes internados em UTI (Colombo et al., 1999; Krcmery & Barnes, 2002).

A prevalência de *C. glabrata* não parece estar aumentando em países europeus (8,8% a 10,5%), latino-americanos (4,7% a 7,4%) e asiáticos (7,2% - 12,1%). No entanto, no Brasil, dada sua extensa área territorial e diversidade de serviços de saúde, a epidemiologia das candidemias não está bem definida. Alguns excelentes estudos contribuem para esse conhecimento e mostram que *C. glabrata* (2% a 8%) tem baixa frequência e *C. albicans* é a maior responsável (20% a 50%) por quadros de candidemias, seguido por *C. parapsilosis* (17% a 35%), *C. tropicalis* (12% a 27%) e *C. krusei* (1% a 2%) (Antunes et al., 2004; Nunes, 2009).

Em São Paulo, em 82 pacientes com candidemia, *C. albicans* foi responsável por 50% dos casos, enquanto *C. glabrata* ocorreu em apenas 2,3% deles (Costa et al., 2000). Colombo et al. (1999) em 145 casos de candidemia em São Paulo e Rio de Janeiro, verificaram que as espécies não *Candida albicans* predominaram (63%), incluindo *C. glabrata* (4%) como agente etiológico. O mesmo grupo de pesquisadores, em outro estudo realizado em 11 hospitais das regiões Sul, Sudeste e Central, relataram *C. albicans* (40,9%) como principal agente e descreveu *C. glabrata* em frequência semelhante (4,9%)

ao estudo anterior (Colombo et al., 2006). Outros trabalhos realizados na região Sul mostraram que *C. albicans* estava envolvida em 45% a 59% dos casos e *C. glabrata* em 3% a 9% dos quadros de candidemia (Antunes et al., 2004; Aquino et al., 2005; Franca et al., 2008). Na região Centro-Oeste, *C. albicans* é responsável por cerca de 50% das candidemias e *C. glabrata* oscila entre 0 a 5,3% (Passos et al., 2007; Chang et al., 2008; Nunes, 2009).

De modo geral, *C. glabrata*, no Brasil foi descrita em taxas de 0 a 9% (média 4,2) como agente das candidemias, com a maior proporção descrita por Hinrichsen *et al.* (2008) em Recife (Nucci; Silveira et al., 1998; Antunes et al., 2004; Barberino et al., 2006; Colombo et al., 2006; Passos et al., 2007; Chang et al., 2008; Franca et al., 2008; Bonfietti et al., 2012; Purisco et al., 2013). Segundo Moretti *et al.* (2013) um estudo realizado entre 2006 e 2010, no Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, sobre espécies de *Candida* nas Unidades de Terapia Intensiva, mostrou que nos 313 episódios de candidemia, as taxas por *C. glabrata* aumentaram de 3% para 11.2%

O uso crescente de antifúngicos, de forma empírica e profilática, tem sido citado como um dos fatores de alteração na epidemiologia das espécies de *Candida* em hospitais, em especial *C. glabrata*. O uso indiscriminado de fluconazol, em países mais desenvolvidos, é apontado como possível fator determinante de seleção de cepas de *C. glabrata*, desde que esta espécie tem grande capacidade em desenvolver resistência secundária ou adquirida (Wingard, 1994). Acredita-se que o maior índice de isolamento de *C. glabrata* nos Estados Unidos e em outros países, se deve ao uso do fluconazol de forma empírica e em terapias profiláticas em pacientes suscetíveis à infecção fúngica invasiva (Galban & Mariscal, 2006). O extenso tempo de utilização de fluconazol promove pressão seletiva sobre as populações de leveduras da microbiota (Lin et al., 2005). Assim, a ocorrência de candidemias causadas por *C. krusei* (espécie com resistência intrínseca ao fluconazol) e *C. glabrata* (com alta resistência adquirida) seriam explicadas (Pappas et al., 2009).

A questão da profilaxia com drogas azólicas, em pacientes sob risco de infecção grave por leveduras, é outra questão em constante avaliação quanto aos efeitos determinantes do aparecimento de resistência em cepas expostas a

essas drogas. Uma revisão de estudos clínicos randomizados mostrou que a profilaxia com fluconazol aumenta o risco de colonização por cepas menos sensíveis ao fluconazol, além de facilitar o desenvolvimento de outras espécies que não-*C. albicans*, já que esta espécie é em regra sensível ao fluconazol, mas não interfere de modo significativo, no risco de infecções graves por essas outras espécies (Briona et al., 2007).

1.3 Resistência a antifúngicos em *C. glabrata*

Ainda que o arsenal terapêutico para candidemia esteja bem definido, casos de resistência clínica são conhecidos (Pappas et al., 2009). Diversos fatores estão implicados na evolução clínica; porém, a ocorrência de cepas resistentes pode ser uma causa relevante nesse contexto. A resistência pode ser observada *in vitro* e divide-se em resistência natural e secundária. Resistência natural pode ocorrer em todos os membros de determinada espécie, como é o caso de *C. krusei* frente ao fluconazol, ou apenas em certas cepas pertencentes a uma espécie, em regra, sensível a um antifúngico (Pappas et al., 2009). A resistência secundária ou adquirida ocorre quando cepas sensíveis de uma espécie desenvolvem resistência a um determinado antifúngico após exposição ao fármaco. A natureza da resistência adquirida ou secundária é explicada quando células de cepas sensíveis passam a ser resistentes devido ao contato com o fármaco ou, ainda, pode ser inerente ao próprio microrganismo.

Resistência adquirida é observada em *C. glabrata* frente ao fluconazol (Cannon et al., 2009). A resistência em *C. glabrata* é importante frente aos fármacos mais utilizados na prática clínica, englobados na classe dos azóis: fluconazol, itraconazol e voriconazol. A ação principal dos fármacos dessa classe é a inibição da enzima 14 alfa-demetilase (14 DM) que participa da biossíntese do ergosterol fúngico. O ERG 11 é o gene que codifica essa proteína do citocromo P450, alvo dos fármacos azólicos. Distintas mutações pontuais nesse gene resultam em mudanças de aminoácidos da proteína codificada, levando a alterações conformacionais da mesma, podendo resultar no decréscimo da sua afinidade aos distintos antifúngicos azólicos (Sanglard, 2002;

Rodero et al., 2003). Além disso, a expressão gênica de ERG 11 pode estar aumentada em cepas resistentes, de modo que a biossíntese de ergosterol promova desenvolvimento celular (Zardo & Mezzari 2004).

Para *C. glabrata* são observados índices de resistência altos, dependendo dos autores e breakpoint empregados para interpretar os valores de concentração mínima inibitória (MIC). Para essa espécie são descritas taxas de resistência de até 25,7 % para fluconazol e 9,9% para voriconazol (Messer et al., 2009).

Em isolados de *C. glabrata*, as taxas de resistência ao fluconazol, o antifúngico mais empregado em infecções por leveduras, variam geograficamente de modo significativo. Cerca de 7% a 14% das cepas de hemocultivos nos EUA e de 3,7% a 40% na Europa foram descritas como resistentes a fluconazol (Diekema; Messer et al., 2002; Ostrosky-Zeichner et al., 2003; Hajjeh et al., 2004; Cuenca-Estrella et al., 2005; Tortorano et al., 2006; Da Matta et al., 2007). Sobel *et al.* (2003) descreveram 4,5% de isolados de *C. glabrata* como resistentes ao fluconazol (concentração inibitória mínima igual ou maior a 64µg/mL). No estudo de Ritcher *et al.* (2005), a resistência ao fármaco foi observada em 3,7% dos isolados, sendo 15,2% em *C. glabrata*.

Alguns autores relatam também a menor sensibilidade dessa espécie para itraconazol, sendo descrito resistência entre 6% a 51% (Ostrosky-Zeichner et al., 2003; Colombo et al., 2006; Da Matta et al., 2007; Franca et al., 2008). Coordenando o Programa SENTRY, de abrangência mundial, Pfaller *et al.* (1999) mostraram resistência ao fluconazol em 2,9% dos isolados europeus, 2,5% das cepas dos EUA, 2,4% dentre aqueles da América Latina e 1,6% isolados oriundos do Canadá.

Um estudo no período de (1995 a 2002) realizado com 103 cepas de *C. glabrata*, mostrou 60% de resistência ao fluconazol, 83% ao itraconazol e 44% ao voriconazol, ressaltando a alta capacidade dessa espécie em adquirir resistência a distintos fármacos da classe dos azóis (Malani et al., 2005).

Em 2010 Pfaller et al. estudando 159 isolados de *C. glabrata* mostrou que 39% deles eram resistentes ao itraconazol, 2,5% ao fluconazol, 2,5% à

casposfungina e 0,6% à micafungina (Pfaller et al., 2010). O maior estudo sobre candidemias no Brasil mostrou tendência das taxas de resistência em dois períodos: 1995-1999 e 2000-2003, indicando alta sensibilidade ao fluconazol entre as distintas espécies de *Candida* (100% e 89,3%, respectivamente), com os únicos casos de resistência atribuídos à *C. glabrata* (4,5%) (Da Matta et al., 2007). Colombo et al. (2006) observaram que 6% dos isolados de *C. glabrata* de hemocultivos foram resistentes ao fluconazol.

A resistência aos diversos fármacos pode ocorrer, simultaneamente, pelos diversos mecanismos conforme ilustrado na Figura 1.

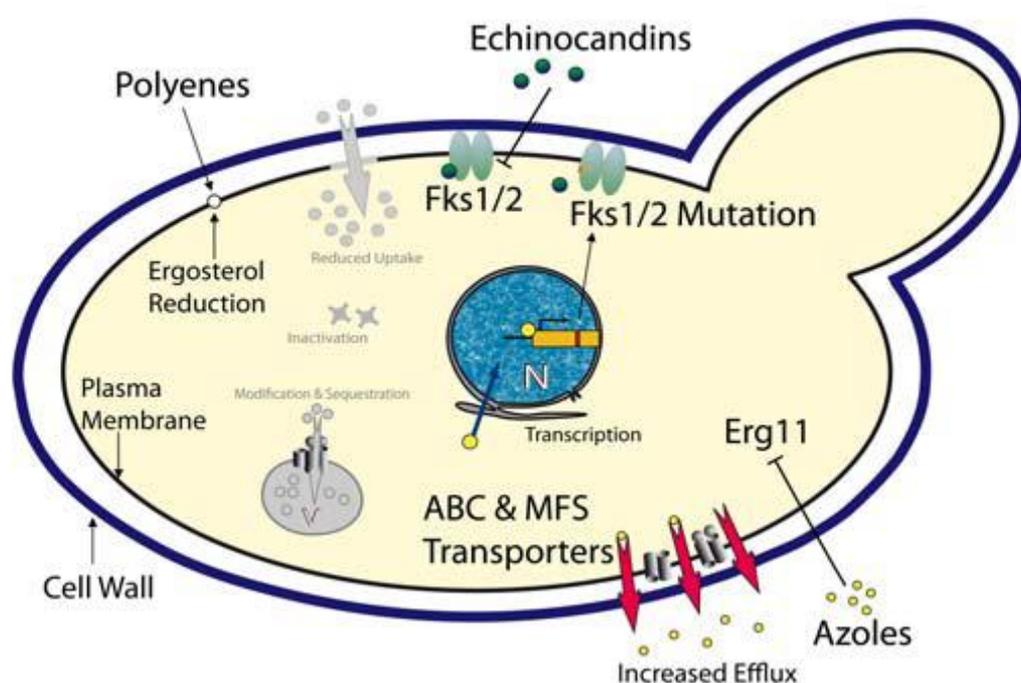


Figura 1 Célula fúngica, mostrando os principais sítios de ação dos fármacos antifúngicos e mecanismos de resistência descritos em isolados de *C. glabrata* (adaptado de Tscherner et al., 2011).

A anfotericina B (Amb), da classe dos polímeros, é um antifúngico, usado há mais de 60 anos, que inibe o principal componente da membrana celular do fungo, o ergosterol. Anfotericina B é usado como fármaco potente para tratamento de infecções invasivas, incluindo candidemia. Os polímeros ligam-se

ao ergosterol da bicamada da membrana, alterando a permeabilidade da membrana celular pela formação de oligodendromeros funcionando como poros, com subsequente efluxo de potássio e moléculas intracelulares causando a morte de fungos (Ben-Ami et al., 2008). A AmB não é absorvida por via intramuscular ou por via oral e, portanto, é administrada por via intravenosa ou, por vezes, por via inalatória. AmB tem um amplo espectro antifúngico, incluindo espécies de *Candida*, exceto *C. lusitanae*. Embora AmB seja um antifúngico eficaz, as toxicidades associadas a sua utilização limitaram o seu uso. O efeito colateral mais comum e mais grave é a nefrotoxicidade. Alguns graus de redução da função renal ocorrem em mais de 80% dos pacientes que receberam a droga e, embora estes geralmente se recuperem após terminar o tratamento, algumas deficiências na filtração glomerular podem permanecer (Branch, 1988).

Para permitir doses elevadas e reduzir os seus efeitos tóxicos para células de mamíferos, AmB foi formulado em lipossomas, complexos lipídicos e suspensões coloidais. Antes do desenvolvimento de outros agentes alternativos, como: azólicos e equinocandinas, AmB foi a droga de escolha para infecções por *Candida*. No entanto, as diretrizes mais recentes para candidíase invasiva recomendam classes mais novas e menos tóxicas de antifúngicos para uso como primeira linha, com exceção das candidíases neonatais (Pappas et al., 2009). Porém seu uso é controlado pelo fato desta classe de fármacos ser altamente nefrotóxico (Tscherner et al., 2011). A resistência de espécies de *Candida* para fármacos poliênicos é irrelevante, incluindo isolados de *C. glabrata*.

A caspofungina, fármaco da família das equinocandinas, é um derivado semissintético hidrossolúvel da pneumocandina B, produto isolado da fermentação do fungo *Glarea lozoyensis* (Abruzzo et al., 2000). Esses fármacos exibem atividade *in vitro* contra ampla variedade de leveduras, fungos filamentosos e dimórficos, clinicamente, importantes incluindo *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. (Pfaller et al., 1999; Vazquez et al., 1997). Seu modo de ação é por inibição da enzima 1,3 beta-d-glucanosintetase que participa da formação de componentes essenciais da parede celular, as glucanas.

Desse modo, os fármacos agem na estrutura da parede celular, causando instabilidade osmótica e morte das cepas sensíveis. A enzima-alvo das equinocandinas é uma proteína formada por subunidades catalíticas (FKSp e RHo1), sendo FKSp codificada por 3 genes (FKS1, FKS2, FKS3). As cepas que apresentam diminuição de sensibilidade às equinocandinas apresentam mutações nos genes FKS1 e FKS2 (Garcia-Effron et al., 2009). O sequenciamento do gene FKS1 mostrou que a maioria das cepas resistentes às equinocandinas tem mutações em regiões específicas da enzima denominadas “*hot spots*” o que, provavelmente, impede ou dificulta a ligação do fármaco ao seu sítio de ação.

Equinocandinas têm atividade contra a maioria das espécies de *Candida*, mas têm menor atividade contra alguns isolados de *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*. Esses fármacos são recomendados como alternativos ao fluconazol para tratamento primário da maioria de adultos não-neutropênicos com candidemia ou suspeita de candidíase invasiva (Pfaller et al., 2008).

Em relação à resistência em isolados das novas espécies, fenotipicamente, relacionadas à *C. glabrata*, há poucos estudos descrevendo sua suscetibilidade a antifúngicos. Frente a isolados de *C. nivariensis* os MICs de anfotericina B foram baixos (MICs, <1mg/L), assim como para caspofungina (MICs, <0,5 mg/L) (Wahyuningsih et al., 2007). No entanto, há relato de um isolado de *C. nivariensis* resistente a mais de um fármaco azólico: fluconazol, itraconazol e voriconazol, caracterizando o fenômeno denominado de resistência cruzada (Bishop et al., 2007). Metodologias de análise molecular são ferramentas em constante desenvolvimento que devem ser utilizadas para a identificação acurada dos velhos e novos patógenos para monitorar ocorrência de resistência nos agentes etiológicos (Bishop et al., 2008).

Os métodos para investigação da resistência *in vitro* a antifúngicos foram desenvolvidos e padronizados ao longo das últimas três décadas. O primeiro método de referência foi proposto pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008) em que a reação de inibição de crescimento do agente etiológico é observada em meio líquido contendo antifúngicos, denominado microdiluição. Os

testes para determinação de resistência a antifúngicos estão hoje padronizados por órgãos internacionais de referência, seja o norte americano (CLSI, 2008) ou o europeu EUCAST (Cuenca-Estrella et al., 2006). Os métodos são indicados para avaliar fenótipos de resistência a todos os fármacos, incluindo: polienos, azóis e equinocandinas.

Para anfotericina B, no entanto, é consenso que outras técnicas devem ser empregadas para melhorar o desempenho do método. Desde que anfotericina B é um fármaco de ação fungicida, a análise dessa atividade parece ser mais indicada do que o estudo do poder inibitório do mesmo. Método de curvas de morte, que avaliam o tempo de ação fungicida do fármaco, constitui uma ferramenta que pode oferecer dados mais fidedignos para demonstrar fenótipos de resistência ou tolerantes à anfotericina B. Esta metodologia foi empregada para espécies de *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans* (Klepser et al., 1998; Rodero et al., 2000; Silva et al., 2012).

Embora o número de antifúngicos tenha aumentado desde 2000, o tratamento de infecções fúngicas ainda é limitado a apenas 15 fármacos, atualmente aprovados para tratamento. Há muitas semelhanças entre as células de fungos e células de mamíferos que tornam o desenvolvimento e aplicação de antifúngicos difíceis. Ambos são eucariotas, com organelas semelhantes, e os antifúngicos devem atuar em sítios que são diferentes entre as células hospedeiras e fúngicas. A diferença mais amplamente explorada entre as células de mamíferos e fúngicas é que as membranas das células contêm diferentes esteróis, sendo que as células de mamíferos contêm colesterol e as células fúngicas contêm ergosterol. Ao nível celular, a maior diferença é que células fúngicas têm paredes e as células de mamíferos não as possuem. Os inibidores da biossíntese de parede celular bacteriana têm sido usados há anos, com pequenas toxicidades associadas a seu uso. Apenas, recentemente, alguns potentes inibidores da síntese da parede celular dos fungos tornaram-se disponíveis para uso terapêutico (Ben-Ami et al., 2008).

Todas as considerações desta introdução justificam que metodologias modernas e adequadas sejam empregadas para definir as espécies e os fenótipos de resistência dentre os agentes causais de infecções relevantes em

saúde pública, como candidemias. Em razão da habilidade da *C. glabrata* de expressar resistência em relação aos azóis e equinocandinas, esta espécie merece grandes estudos em distintas regiões do globo (Pfaller et al., 2010). Testes de sensibilidade combinados com caracterização molecular das cepas e detecção dos mecanismos de resistência aos antifúngicos são importantes para melhor conhecimento da epidemiologia das candidemias por essa espécie.

As informações advindas desses resultados poderão constituir material útil para a consolidação de um banco de dados, ainda inexistente no Brasil, para o desenvolvimento de um antibiograma regional que sirva para seleção empírica de antifúngicos para manejo dos quadros de infecção causados por leveduras (Hospenthal et al., 2004). Análises de tendências poderão ser realizadas ao longo do tempo e segundo distintas regiões geográficas, desde que, ao contrário dos países europeus e norte americano, pouco se conhece sobre esse tema em países da América Latina.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar amostras do complexo *Candida glabrata* para melhor conhecimento da distribuição de espécies e da sensibilidade a antifúngicos em isolados de hemocultura.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Pesquisar a ocorrência de espécies correlatas a *C. glabrata* - *C. nivariensis* e *C. bracarensis* - dentre os isolados de hemocultura analisados;
2. Investigar a presença de fenótipos de resistência aos antifúngicos: fluconazol, itraconazol, voriconazol, caspofungina e anfotericina B; frente à *Candida glabrata*
3. Avaliar o poder fungicida de anfotericina B sobre os isolados de *C. glabrata*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem dos isolados de *Candida glabrata*

Setenta e cinco isolados de sangue com características fenotípicas de *C. glabrata*, i.e. aspectos morfológicos e assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, mantidas na micoteca do Núcleo de Micologia, Centro de Parasitologia e Micologia, do Instituto Adolfo Lutz (IAL) foram selecionadas para este estudo. Os isolados foram obtidos, entre 2007 e 2013, de casos atendidos nos hospitais públicos, encaminhados ao IAL principalmente como Laboratório Central de Saúde Pública e Privada (LACEN) do Estado de São Paulo, do projeto Sentinela de Candidemia (OPAS) e Programa da Rede Nacional de Monitoramento em Resistência Microbiana (ANVISA-CGLAB-OPAS) para monitoramento de espécies e ocorrência de resistência a antifúngicos nesses agentes. Foram utilizadas cepas padrão para validação dos testes: *C. krusei* ATCC 6852, *C. parapsilosis* ATCC 22019 para testes de sensibilidade, *C. glabrata* ATCC 90030 para curva de morte, *C. nivarensis* ATCC 9983, *C. bracarensis* ATCC 10154 e *C. glabrata* ATCC 90030 para testes moleculares. As cepas-padrão de *C. bracarensis* ATCC 10154 e *C. nivarensis* ATCC 9983 foram, gentilmente, cedidas pelo Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

3.2 Purificação, confirmação fenotípica de espécie e manutenção dos isolados

Todos os isolados estavam mantidos em glicerol (15%) e, após terem sido retirados do freezer (-20°C), foram semeados em placas de Petri contendo ágar cromogênico (CHROMagar *Candida*, BBL-Difco) para confirmação de sua pureza. Colônias lisas, brilhantes e de coloração rosa, típicas de *C. glabrata* nesse meio, foram semeadas em ágar Sabouraud com cloranfenicol, para confirmação fenotípica de espécie, por análise micromorfológica em ágar fubá

acrescido de *Tween* 80 e perfil bioquímico pelo—método de assimilação (auxanograma) e fermentação (zimograma (Larone, 2011)). Os isolados foram mantidos em ágar Sabouraud com cloranfenicol durante todo o estudo para execução das análises. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.2.1 Análise morfológica

Para análise morfológica foram depositados 3 ml de ágar-fubá fundido sobre uma lâmina contida sobre um suporte dentro de uma placa de Petri. Após solidificação do meio, a levedura foi semeada com auxílio de uma alça em “L”, fazendo duas estrias paralelas e recobrimos as estrias com lamínula esterilizada. Foi feita uma câmara úmida, embebendo um algodão com água estéril e colocando na placa, para evitar dessecação do meio, durante o período de incubação da prova. Tampamos a placa e após 24h, 48h e 72h, examinamos a preparação em microscópio de luz. Observou-se a presença de blastoconídios indicando fenótipo de *Candida glabrata* (Larone, 2011).

3.2.2 Auxanograma

Na prova de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio (zimograma) foram usados dois meios na forma desidratada (Yeast Nitrogen Base e Yeast Carbon Base, BBL-DIFCO, EUA). A levedura foi semeada "pour plate", em cada um dos meios, previamente, distribuídos em 2 placas de Petri. São então adicionadas pequenas alíquotas de diferentes carboidratos que servem de fonte de carbono, sobre a superfície do meio isento de carbono. Após incubação à temperatura ambiente ou 25°C, por período de uma semana, a levedura assimilou e cresceu em volta de determinadas fontes, de acordo com o metabolismo característico de sua espécie. A leitura foi realizada pelo halo de turvação resultante do crescimento e indica prova de assimilação positiva para a respectiva fonte. *C. glabrata* assimilou trealose e glicose (Larone, 2011).

3.2.3 Zimograma

A capacidade de fermentar carboidratos, ao lado do auxanograma, irá completar o perfil bioquímico da levedura permitindo, em regra, a identificação acurada de gênero e espécie. Para o zimograma, diversas fontes de carboidratos foram colocadas em tubos respectivos, contendo meio básico líquido. *C. glabrata* foi semeada em cada tubo e após um período de até 15 dias a 25°C, a fermentação foi revelada por formação de bolhas de gás, observadas dentro dos tubos de Durhan, colocados previamente, durante a preparação do meio básico (Larone, 2011).

3.3 Análise molecular dos fenótipos de *Candida glabrata*

Para esta diferenciação foi aplicada a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), conforme descrito a seguir.

3.3.1 Extração de DNA

De início foi realizada a obtenção de protoplastos, segundo Branchini et al., (1994) e Shin et al., (2001). Colônias de *C. glabrata* com 24h a 48h de crescimento foram transferidas para microtubo de 2 ml (tipo Eppendorf) contendo 1ml de EDTA 50mM pH 8,0. Após homogeneização estes foram centrifugados em microcentrífuga a 10.000 rpm por 15', O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foi adicionado 1ml de EDTA 50 mM. Este processo de lavagem foi repetido até que o sobrenadante ficasse límpido. Após a última o sedimento foi ressuspenseo em 200µL de EDTA 50 mM e adicionado de 30 µL a 40 µL da enzima de lise *Trichoderma harzianum* (60mg/mL). Esta suspensão foi incubada em banho-maria a 37°C por 2h a 3h, agitando-se em vortex a cada 30'. Após a incubação, o material foi centrifugado por 10' e o sobrenadante desprezado.

3.3.2 Lise Celular (Sambrook et al., 1989)

Ao protoplasto foi adicionado 200 µL a 300 µL de tampão de lise. Após homogenização utilizando vortex, o material foi incubado em banho-maria (50°C) por 2h a 3h, agitando em vortex a cada 30'. Posteriormente, o material foi centrifugado por 15' e o sobrenadante transferido para outro microtubo. Ao sobrenadante foram adicionados 200 µL a 400 µL de clorofórmio (24:1 clorofórmio/isopropanol) para promover a precipitação das proteínas. Após centrifugação por 15', houve formação de três fases e a fase aquosa (parte superior) foi retirada para outro microtubo. Para promover a precipitação do DNA, foi adicionado ± 300 µL de isopropanol. O material, então, foi centrifugado por 15' a 10.000 rpm e o sobrenadante desprezado. Ao sedimento foi adicionado 200 µL a 500 µL de etanol a 70%. Após centrifugação por 15' a 10.000 rpm, o sobrenadante foi desprezado. Após secagem, o DNA foi ressuspenso com 50 µL de H₂O ultrapura e mantido a -20°C até sua utilização.

3.3.3 Quantificação do DNA genômico e determinação de pureza

O DNA obtido foi submetido à dosagem em equipamento NanoDrop 1000, sendo que a razão entre as leituras de densidade ótica (DO) de 260/ DO 280 que apresentaram valores entre 1,8 e 2,0 foram aceitos como quantidade desejada (Sambrook et al.,1989).

3.3.4 Análise molecular do complexo *C. glabrata* por reação em cadeia da polimerase

Na primeira etapa do procedimento, denominada de triagem, todas as cepas caracterizadas fenotipicamente como *C. glabrata* foram submetidas à reação de PCR com um par de *primer* específico para a espécie *C. glabrata* (senso: CGL1: TTA TCA CAC GAC TCG ACA CT) e (anti-senso: CGL2: CCC

ACA TAC TGA TAT GGC CTA CAA). Para a reação de PCR foi utilizada solução pronta para uso SuperMix (Invitrogen). A amplificação foi realizada em termociclador LongGene nas seguintes condições: desnaturação inicial de 94°C por 5', 40 ciclos de 94°C por 30"; 58°C por 30"; 72°C por 30" e extensão final de 10' a 72°C (Luo et al., 2002). Após a amplificação, os tubos contendo o produto da amplificação foram mantidos a -20°C até o momento da eletroforese.

Após amplificação, os produtos de PCR foram diluídos em tampão de amostra (30% glicerol; 0,25% xilenocianol FF; 0,25% azul de bromofenol) e aplicadas no gel de agarose a 2% em TBE. As amostras foram submetidas à eletroforese em sistema horizontal contendo TBE durante 50 minutos a 100V e 400mA. Após eletroforese o gel foi mergulhado em solução de brometo de etídio (0,5µg/mL) por 15', visualizados e fotodocumentados em equipamento Biolmaging System. O tamanho de fragmento amplificado obtido da PCR com, aproximadamente, 423pb foi aceito como resultado.

Numa segunda etapa, as cepas que não amplificaram com os *primers* CGL1/CGL2 foram submetidas à nova reação de PCR multiplex com o *primer* senso NIV-f (5'- AGGGAGGAGTTTGTATCTTTCAAC-3'), senso BRA-f (5'- GGGACGGTAAGTCTCCCG-3') e antissenso universal UNI- 5.8S (5' - ACCAGAGGGCGCAATGTG- 3'). Para a reação foi utilizada solução pronta para uso SuperMix (Invitrogen), A amplificação realizada em termociclador LongGene nas seguintes condições: desnaturação inicial de 94°C por 5', 34 ciclos de 94°C por 30"; 60°C por 40"; 72°C por 50" e extensão final de 10' a 72°C (ROMEO *et al.*, 2009).

Após a amplificação, os tubos contendo o produto da amplificação foram mantidos a -20°C até o momento da eletroforese. Os produtos de PCR foram diluídos em tampão de amostra (30% glicerol; 0,25% xilenocianol FF; 0,25% azul de bromofenol) e aplicadas no gel de agarose a 2% em TBE. As amostras foram submetidas à eletroforese em sistema horizontal contendo TBE durante 50 minutos a 100 V e 400 mA. Após eletroforese o gel foi mergulhado em solução de brometo de etídio (0,5µg/mL) por 15'. Os géis foram visualizados e fotodocumentados em equipamento Mini Bis Pro (Bio Imaging Systems). O

tamanho de fragmento amplificado (produto da PCR) com, aproximadamente, 293pb caracteriza *C. nivariensis* e 223bp indica presença de *C. bracarensis*.

3.4 Investigação de fenótipos de resistência aos antifúngicos

Para a avaliação “in vitro” da sensibilidade das leveduras aos antifúngicos: fluconazol (FCZ), itraconazol (ITZ), voriconazol (VCZ), anfotericina B e caspofungina foi utilizado o método de microdiluição em caldo, conforme procedimentos do documento M27-A3 (CLSI, 2008). O meio de cultura usado foi o RPMI 1640 (Sigma, St. Louis USA), sem bicarbonato de sódio e com L-glutamina. O perfil de sensibilidade de cada amostra foi classificado e avaliado segundo Pfaller et al., (2010).

O inóculo do isolado conteve número padrão de células e foi incubado por um período prescrito junto com o antifúngico. O objetivo deste método foi à determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

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

Os antifúngicos foram diluídos em 10 concentrações diferentes, conforme documentos M-27 A3 (CLSI, 2008) e distribuídos em placas de microtitulação contendo 96 poços. As placas contendo os antifúngicos diluídos foram embaladas, identificadas e congeladas à -70°C. Na hora do teste, as placas foram descongeladas e adicionadas dos inóculos de leveduras. Dois controles de qualidade foram realizados em cada teste: 1-controle positivo ou de crescimento, preparado somente com inóculo em meio de cultura, sem adição de antifúngico; 2-Controle-negativo ou de esterilidade, realizado com meio de cultura, duas cepas-padrão de referência: *Candida krusei* (ATCC 6852),

resistente a fluconazol e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), sensível a fluconazol, cujos valores de CIM para diversos antifúngicos são conhecidos e estão publicados nos documentos de referência.

Adicionados os inóculos e preparados os controles de qualidade, foi iniciada a reação de inibição que teve tempo de incubação de 48h em temperatura de 35°. A sensibilidade aos azóis foi baseada na análise da CIM dos antifúngicos sobre o crescimento das leveduras. Os resultados foram analisados a olho-nú, segundo graus de inibição definidos em cruzeiros, variando de zero a 4 cruzeiros e também foram expressos em densidade ótica (d.o.) e registrados em fita impressa, diretamente do espectrofotômetro para confirmação, todas as amostras foram realizadas em duplicata.

Tabela 2 Interpretação dos valores de concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos de acordo com o documento M27 S4E (CLSI, 2012), Pfaller et.al. 2012 e Nolte et. al. 1997.

Antifúngico	Fonte	Sensível	S-DD**/Intermediário	Resistente
		CIM (mg/L)	CIM (mg/L)	CIM (mg/L)
Fluconazol	CLSI*	≤ 16	32	≥ 64
Itraconazol	CLSI	≤ 0.125	0.25-0.5	≥ 1
Voriconazol	Pfaller et.al. 2012	-	-	> 0,5
Anfotericina B	Nolte et. al. 1997	-	-	≥ 2
Caspofungina	CLSI	≤ 0,12	0,25	≥ 0,5

*CLSI, *Clinical Laboratory Standard Institute*; **S-DD, sensibilidade dependente da dose

A sensibilidade das amostras aos antifúngicos foram analisadas conforme tabela 2.

3.5 Avaliação do poder fungicida de anfotericina B por curvas de morte

O método de curvas de morte foi desenvolvido segundo descrito em Klepser *et al.* (1998). De modo resumido, os isolados foram submetidos à morte celular por exposição a concentração final de 1mg/L de anfotericina B por períodos de tempos pré-definidos. Inicialmente, um inóculo (cultura de 24 h) de cada levedura, com turbidez da escala de 0,5 Mc Farland foi diluído 1:10 em meio RPMI (pH 7,0 em tampão MOPS) e incubado a 35°C. Um tubo-controle (*C. glabrata* ATCC 90030), sem adição do fármaco, foi mantido nas mesmas condições.

Após incubação a 35°C, sob agitação a 150 rpm, e em períodos pré-determinados (0, 4h, 8h, 12, 24 e 48 h), alíquotas de 100µL foram removidas do tubo contendo o antifúngico e do tubo-controle. Cada alíquota foi diluída a 1:10 em água destilada estéril e, a partir dessa suspensão, uma nova alíquota de 30 µL foi semeada na superfície do meio ágar batata distribuída em placas de Petri. Após 24 h sob temperatura de 35°C, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias nas placas inoculadas com as suspensões. Quando a contagem de colônias foi inferior a 1.000 UFC/mL uma alíquota de 30µL foi retirada da suspensão, antes da diluição e semeada em nova placa de Petri contendo ágar batata, para nova contagem. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e foi aceito o valor com a maior contagem de colônias.

A redução de 99,9% na contagem de células viáveis, quando comparada à obtida no tempo zero de cada inóculo foi considerado o ponto final do teste para emissão dos resultados, em unidades denominadas *time kill curves* (TKC).

4 Resultados

4.1 Análise molecular do complexo *C. glabrata*

Foram reanalisadas as características fenotípicas dos setenta e cinco isolados de candidemia e 100% deles apresentaram características fenotípicas de *C. glabrata*.

Estes isolados foram submetidos à análise molecular pela técnica de reação em cadeia da polimerase com par de *primers* específicos, foi validada pela amplificação correta das cepas padrão (*C. glabrata* ATCC 90030, *C. nivarensis* ATCC 9983, *C. bracarensis* ATCC 10154),

Dentre todos os isolados analisados, não foram encontrados aqueles pertencentes as duas espécies correlatas a *C. nivarensis* com peso molecular de 293 pb e *C. bracarensis* peso molecular de 223 pb. Todos os isolados produziram bandas na faixa de 423 pb indicando a presença da espécie *C. glabrata*.

As Figuras 2, 3, 4 e 5 mostram os resultados obtidos na análise molecular dos 75 isolados e cepas-padrão.

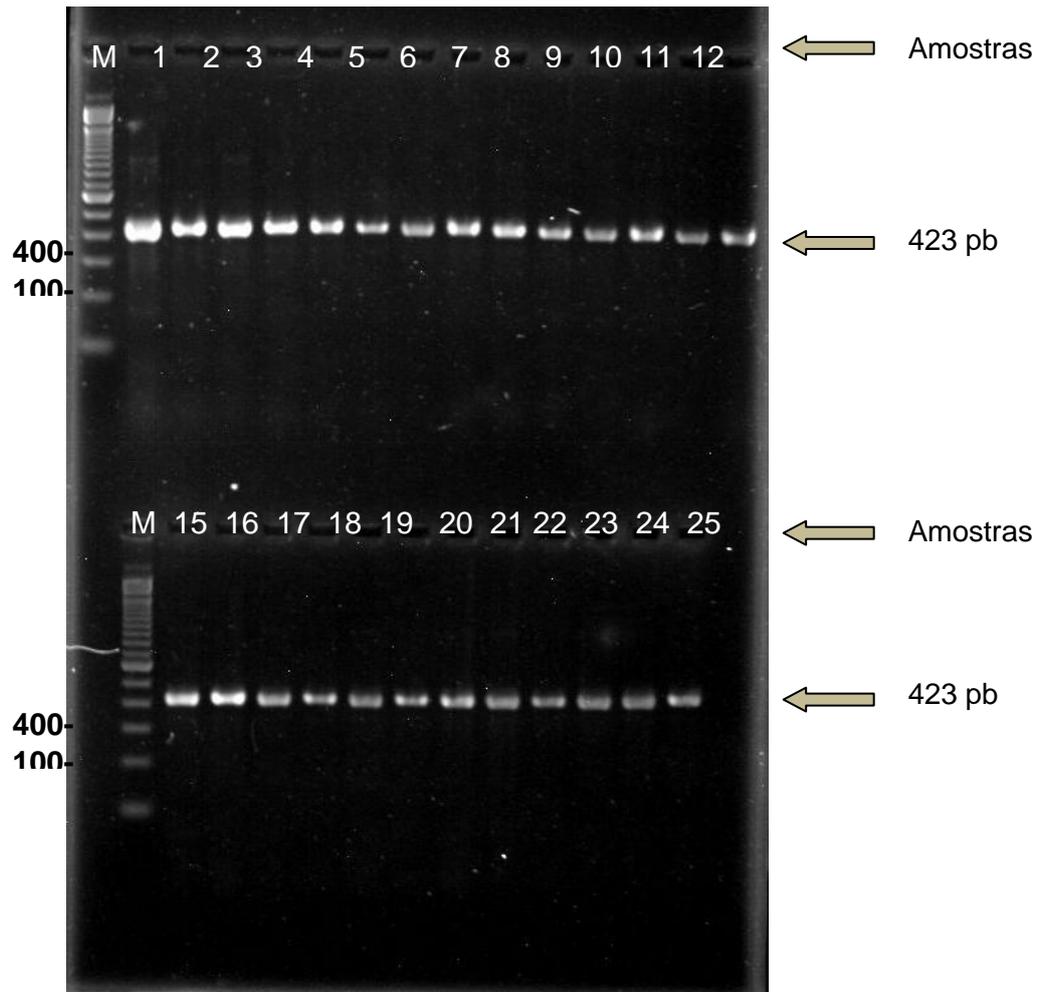


Figura 2 Ilustração de gel de agarose, indicando banda em 423 pb característica de *C. glabrata*: M - padrão de peso molecular de 100 pb; linhas 1 a 25 isolados de *C. glabrata*; com bandas características em 423 pb.

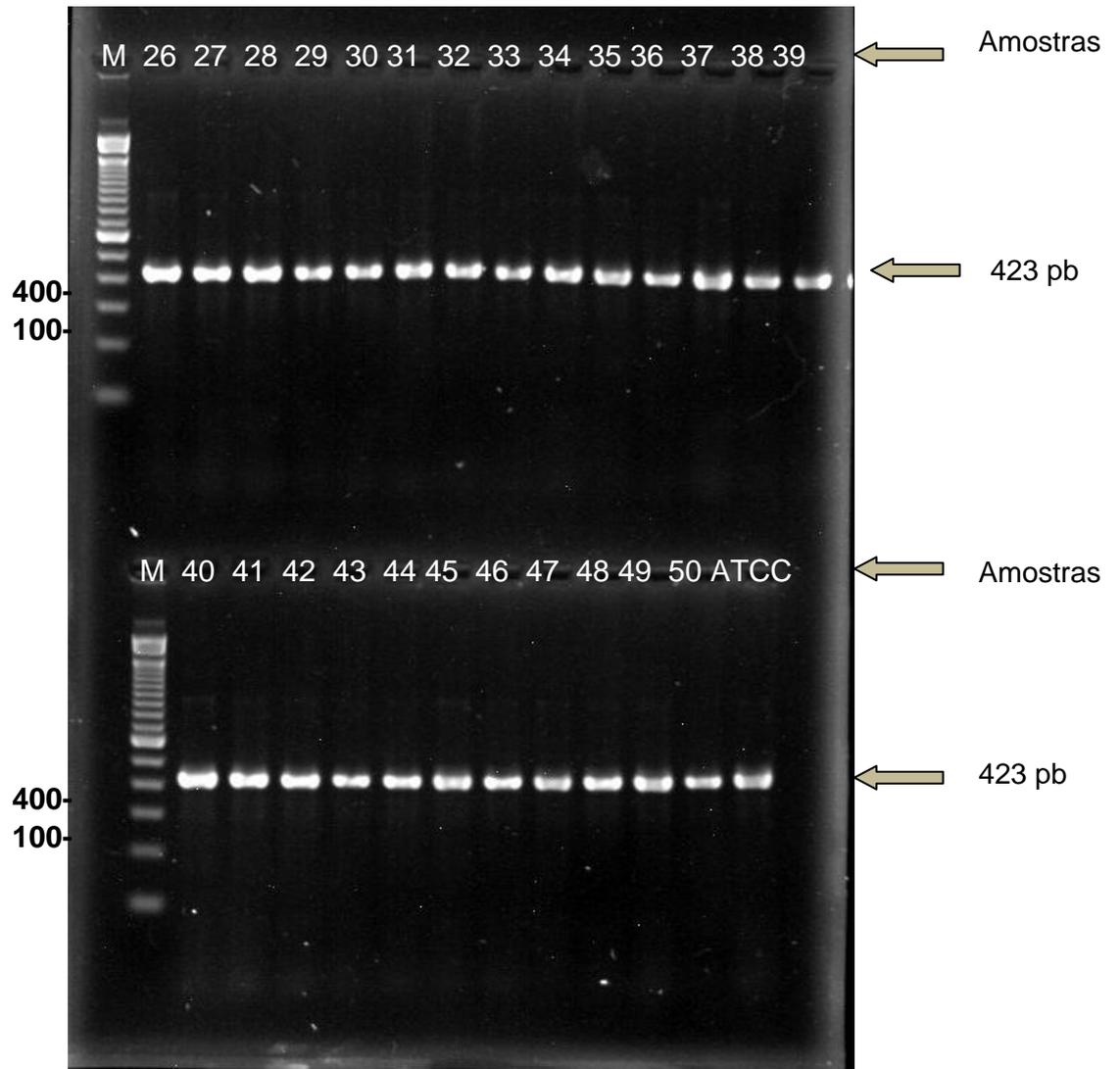


Figura 3 Ilustração de gel de agarose, indicando banda em 423 pb característica de *C. glabrata*: M - padrão de peso molecular de 100 pb; linhas 26 a 50 isolados de *C. glabrata*; com bandas características em 423 pb; *C. glabrata* ATCC 90030.

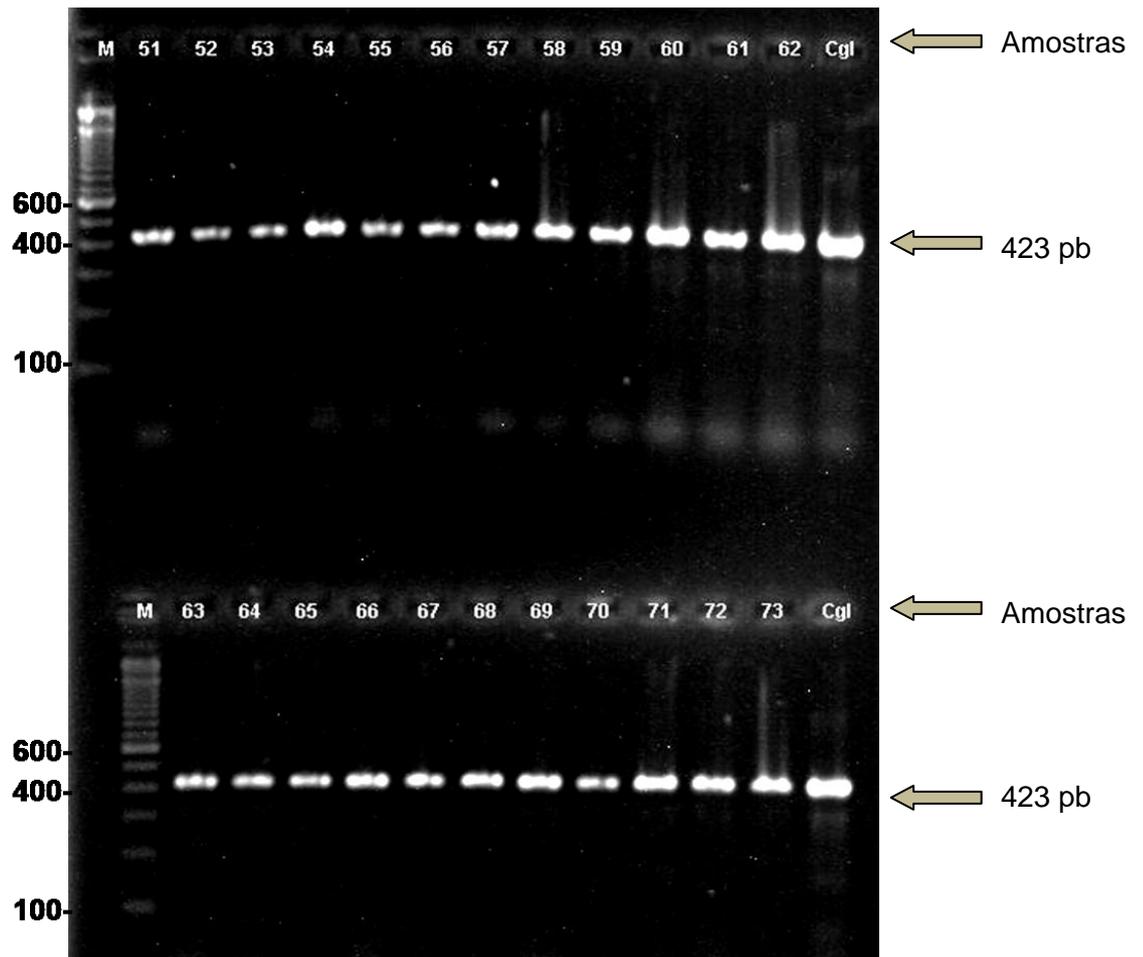


Figura 4 Ilustração de gel de agarose, indicando banda em 423 pb característica de *C. glabrata*: M - padrão de peso molecular de 100 pb; linhas 51 a 73 isolados de *C. glabrata*; com bandas características em 423 pb; *C. glabrata* ATCC 90030.

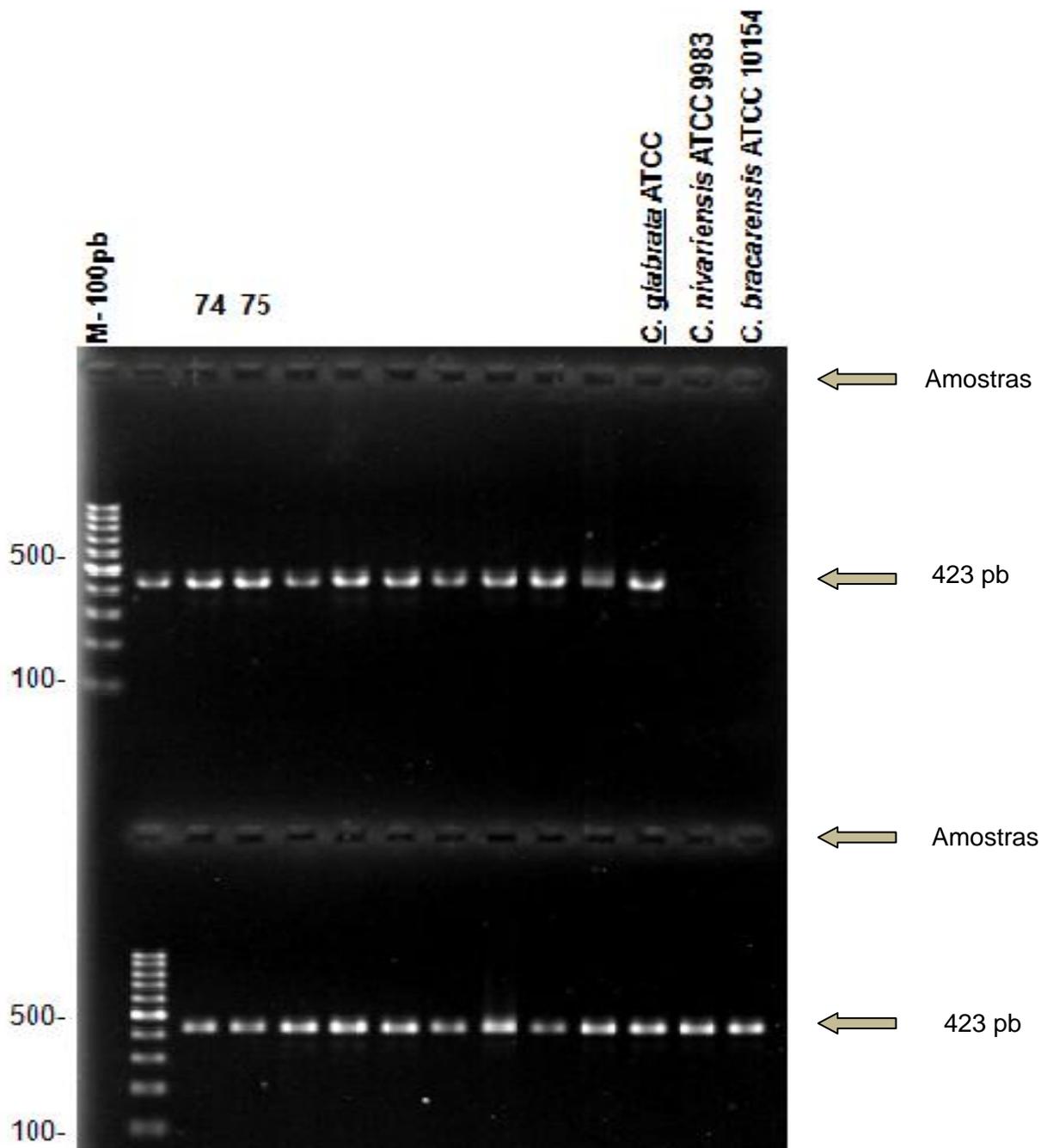


Figura 5 Ilustração de gel de agarose, indicando banda em 423 pb característica de *C. glabrata*: M - padrão de peso molecular de 100 pb; linhas 74 e 75 isolados de *C. glabrata*; com bandas características em 423 pb; *C. glabrata* ATCC 90030; *C. bracarensis* ATCC 10154; *C. nivariensis* ATCC 9983.

4.2 Investigação de fenótipos de resistência aos antifúngicos

O perfil de sensibilidade dos 75 isolados de *C. glabrata* foi avaliado frente aos antifúngicos: fluconazol, itraconazol, voriconazol, caspofungina e anfotericina B. (Apêndice 1, 2 e 3).

Nenhuma cepa apresentou resistência ao fluconazol e 64% (48) dos isolados foram sensíveis a este antifúngico na concentração de 8 mg/L, Com voriconazol 2.6 % (2) dos isolados apresentaram resistência e 68% foram sensíveis a este antifúngico na concentração a 0,25 mg/L.

Na Tabela 3 mostra que a maior frequência foram 8 mg/L para fluconazol, 0,5 mg/L para itraconazol, 0,25 mg/L para voriconazol, 0,25 mg/L para caspofungina e 0,5 mg/L para anfotericina B (Figura 5). As concentrações modais para esses fármacos foram: 8 mg/L para fluconazol, 0,5 mg/L para itraconazol, 0,25 para voriconazol, 0,25 para caspofungina e 0,5 para anfotericina B.

Em relação ao itraconazol 18,6% (14) dos isolados apresentaram resistência.

Para caspofungina, 6 isolados estiveram no limite máximo (0,5 mg/L) e (58,6 %) foram inibidos na concentração a 0,25 mg/L.

Todos os isolados foram inibidos em concentrações inferiores a 1mg/L de anfotericina B.

Com base nos resultados de CIM foram calculadas: concentrações CIM₅₀ e CIM₉₀, respectivamente, concentrações que inibe o crescimento de 50% e 90% dos isolados respectivamente (Tabela 4). Os valores para fluconazol foram, respectivamente: 4 mg/L a 16 mg/L, 8 mg/L e 16 mg/L; itraconazol 0,25 mg/L a 2 mg/L, 0,5 mg/L e 1 mg/L; voriconazol 0,125 mg/L a 1 mg/L, 0,25 mg/L e 0,5 mg/L; caspofungina 0,03 mg/L a 0,5 mg/L, 0,25 mg/L e 0,5 mg/L e anfotericina B 0,125 mg/L a 1 mg/L, 0,5 mg/L e 1 mg/L.

A interpretação dos dados de CIM, segundo os pontos de corte adotados, permitiu definir que não houve resistência para anfotericina B e fluconazol. Para

casposfungina foram encontrados 6 isolados no limite do ponto de corte (0,5 mg/L), 44 intermediários e 25 sensíveis.

Para o voriconazol dois isolados resistentes e itraconazol 14 resistentes, 60 isolados sensibilidade-dose dependente e 1 sensível (Tabela 1).

Tabela 3 Distribuição dos 75 isolados de *C. glabrata* conforme a concentração inibitória mínima (CIM, mg/L) dos-fármacos: fluconazol, Itraconazol, voriconazol, casposfungina e anfotericina B.

CIM (mg/L)	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	≥32
Antifúngico												
Fluconazol	ND*	ND	0	0	0	0	0	0	13	48	14	0
Itraconazol	0	0	0	1	13	47	13	1	0	0	ND	ND
Voriconazol	0	0	0	9	51	13	2	0	0	0	ND	ND
Casposfungina	0	7	13	5	44	6	0	0	0	0	ND	ND
Anfotericina B	0	0	0	1	10	40	24	0	0	0	ND	ND

*ND, não determinado

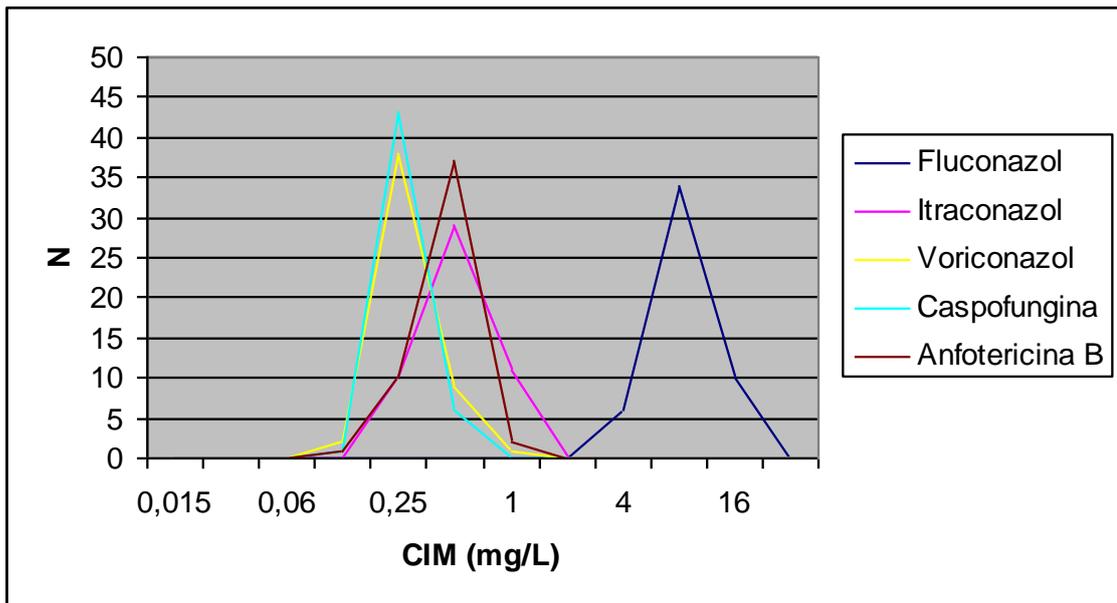


Figura 6 Concentração inibitória mínima (CIM, mg/L) dos 75 isolados de *C. glabrata*, frente aos antifúngicos fluconazol, itraconazol, voriconazol, caspofungina e anfotericina B

Tabela 4 Concentração inibitória mínima (MIC, mg/L 50% e 90%), dos antifúngicos frente a 75 isolados de *Candida glabrata*

Antifúngico	Intervalo de Concentrações (mg/L)	CIM (mg/L)	
		CIM ₅₀ *	CIM ₉₀ **
Fluconazol	4-16	8	16
Itraconazol	0.25-2	0.5	1
Voriconazol	0, 125-1	0,25	0,5
Caspofungina	0.03-0.5	0,25	0,5
Anfotericina B	0.125-1	0,5	1

*CIM50= Concentração inibitória mínima capaz de inibir 50 % dos isolados

**CIM90= Concentração inibitória mínima capaz de inibir 90 % dos isolados

3.5 Avaliação do poder fungicida de anfotericina B por curvas de morte

O perfil da ação fungicida da anfotericina B frente a 75 isolados de *C. glabrata* por método de Curvas de morte é apresentada na Figura 6 e Apêndice 4.

Dos 75 isolados, 72 (96%) morreram antes das 24h, sendo que 7,5 % morreram em 4 h, 70,6 % morreram em 8 h, 8 % em 12 h e 9,9 % dos isolados em 24h,

Dois isolados permaneceram viáveis. Sendo que dos 3 isolados, 2 deles não sofreram a ação fungicida da anfotericina B dentro das condições experimentais, sendo uma com re-crescimento e uma morreu apenas no tempo 48h.

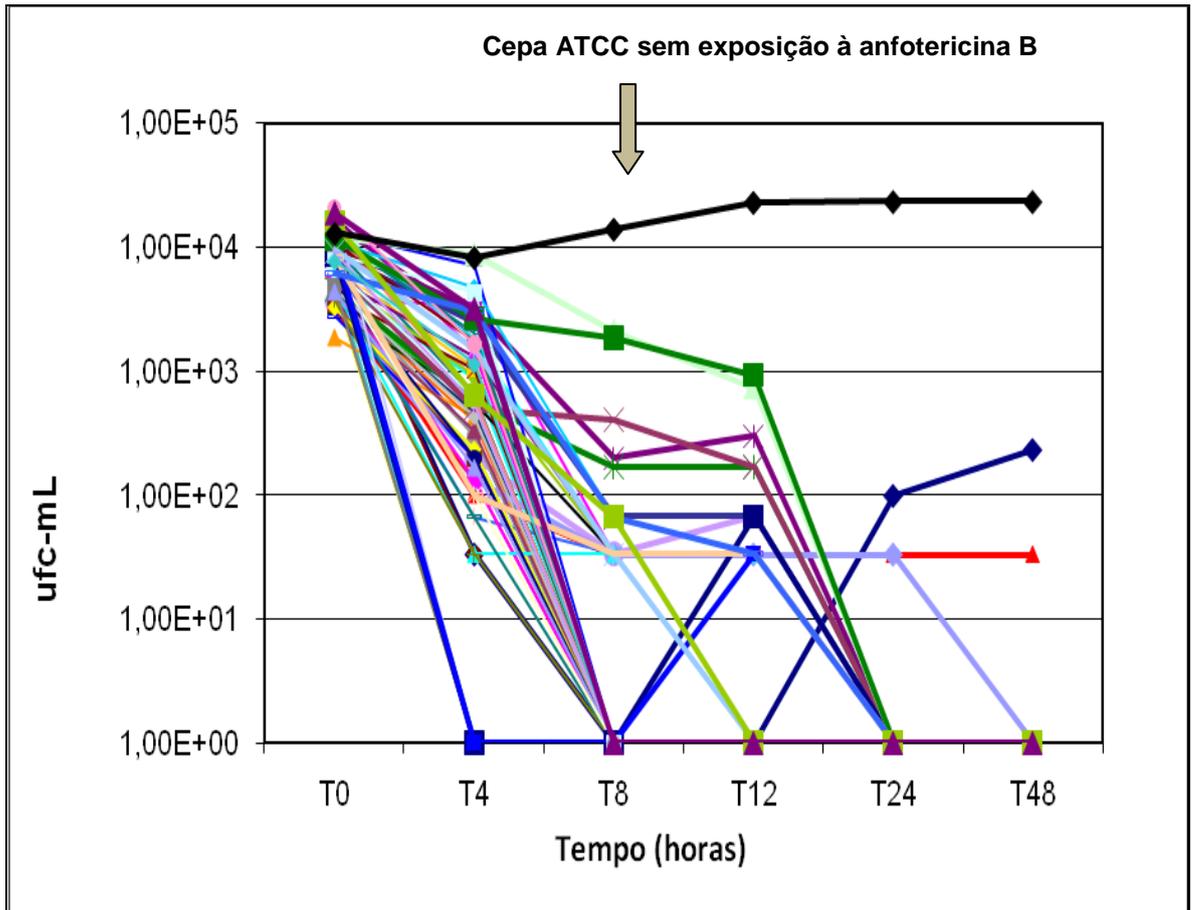


Figura 7 Ação fungicida da anfotericina B (1 mg/L) sobre 75 isolados clínicos de *C. glabrata*, por método de curva de morte. Linha preta: *C. glabrata* ATCC 90030 sem exposição à anfotericina B.

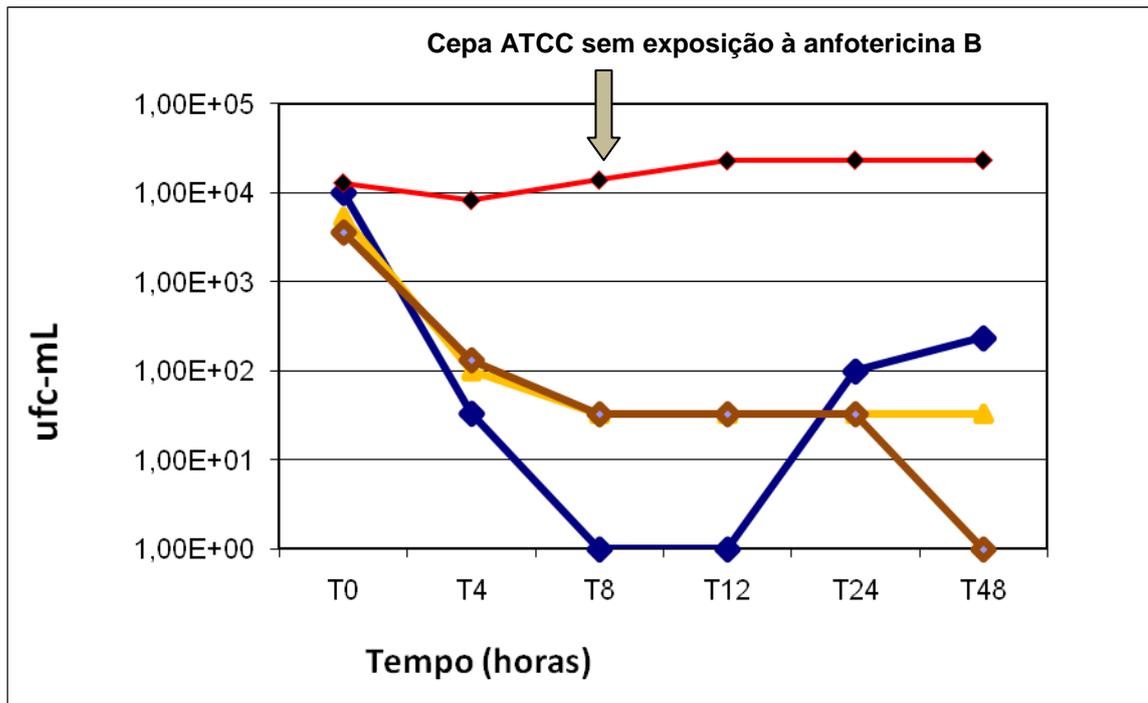


Figura 8 Ação fungicida de anfotericina B (1 mg/L) sobre 3 isolados de *C. glabrata* por método de curvas de morte. Linha vermelha: *C. glabrata* ATCC 90030 sem exposição à anfotericina B.

5 Discussão

Com o aumento da incidência de doenças que resultam em comprometimento imunológico, aumento do uso de agente imunossupressivos, quimioterapias e pacientes infectados com HIV ocorreu substancial incremento no numero de infecções fungicas oportunistas, durante a década de 1980 e 1990 (Trick et al., 2002).

C. glabrata está envolvida em episódios graves de candidemia e quadros vaginais recorrentes, além de ser considerada como um importante agente emergente de infecção em pacientes idosos hospitalizados (Pfaller & Messer, 2007; Colombo et al., 2006; Horn et al., 2009). Das espécies não- *C. albicans*, *C. glabrata* é considerada uma importante causa de fungemia em UTI e tem emergido como importante espécie oportunista pelo alto potencial de resistência adquirida que apresenta (Pfaller et al., 2004). Acredita-se que a prevalência desta espécie se dê em decorrência de diferentes fatores, incluindo características geográficas, idade dos pacientes e características da população estudada (Pfaller et al. 2005). Ruan et. al. (2008) demonstraram que *C. glabrata* foi responsável por 10 a 30 % dos episódios de candidemias no período de 2000 a 2005. No mesmo estudo, a incidência de fungemia por *C. glabrata* foi de 1,3 para cada 1000 pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva e sua incidência vem aumentando progressivamente, associada ao uso indiscriminado de fluconazol. Na América do Norte e Europa, constitui a segunda, espécie de *Candida* mais isolada de hemoculturas (Diekema; Pfaller et al., 2002); (Abi-Said et al., 1997; Pfaller; Diekema, 2002; Pfaller et al., 2003). A taxa de mortalidade associada a esta espécie é alta (10% a 73%) (Colombo et al., 1999; Krcmery; Barnes, 2002). A profilaxia com antifúngicos azolicos reduziu drasticamente a tava de mortalidade por infecções fungicas, porém essa pratica não previne infecções por espécies como *C. glabrata* (Mann et al. 2009). Portanto, o tratamento adequado é o fator primordial para melhor evolução clínica.

No Brasil a incidência desta espécie e menor, se comparada com outros países, Colombo et al. (2006) demonstrou que *C. glabrata* ocupa o quinto lugar (4,9%) entre os agentes causadores de candidemia. Acredita-se que a

prevalência desta espécie se dê em decorrência de diferentes fatores, incluindo características geográficas, idade dos pacientes e características da população estudada (Pfaller et al., 2005). A *Infectious Diseases Society of America* atualizou as orientações para o tratamento de candidemias e infecções invasivas por *Candida* spp. As normas para o tratamento de infecções invasivas dependem de fatores como: estado do paciente, espécie de *Candida* isolada, padrões de sensibilidade do isolado, exposição primária a antifúngicos, e órgãos envolvidos na infecção (Colombo et al., 2013; Pappas et al., 2009; Garey et al., 2006).

As equinocandinas tem se tornado a classe de escolha para terapia primária em infecções disseminada por *C. glabrata* e *C. krusei*, isolados resistentes ao fluconazol e candidiase invasiva, devido a sua baixa toxicidade, e ampla atividade (Pfaller et al., 2002).

Essas considerações indicam a importância clínica de *C. glabrata* que, por isso, justifica ser melhor investigada. Além disso, a distribuição das novas espécies *C. bracarensis* e *C. nivariensis*, fenotipicamente, semelhantes a *C. glabrata* não é conhecida em nosso país, assim como o perfil de sensibilidade aos antifúngicos empregados para o tratamento das infecções por leveduras.

A escolha da terapia antifúngica mais adequada para tratar os pacientes com candidemia, devida à *C. glabrata*, depende do conhecimento do perfil epidemiológico da cepa infectante e do seu perfil de sensibilidade. De acordo com a região a ser estudada, *C. glabrata* apresenta variação nesse perfil e, portanto, o monitoramento contínuo é de grande importância para auxiliar na conduta profilática ou empírica dos casos de candidemia por essa espécie (Basseti et al., 2006). Estudos sobre o perfil de sensibilidade e o perfil epidemiológico de *C. glabrata* no mundo tem aumentando progressivamente, demonstrando a importância de se estudar melhor essa espécie.

Este estudo analisou um conjunto de 75 cepas armazenadas (2007 a 2013) em coleção de centro de referência, com características fenotípicas de *C. glabrata*. A análise molecular, por meio da reação em cadeia da polimerase com *primers espécie-específicos*, foi realizada para identificação genotípica de modo a identificar possível ocorrência das espécies correlatas, i.e, *C. nivariensis* e *C.*

bracarensis, No entanto nenhuma cepa foi re-classificada como *C. nivarensis* ou *C. bracarensis*, resultado que esta de acordo com o maior estudo global realizado por Lockhart et al. (2009). Esses autores analisaram 1.598 cepas, fenotipicamente, identificadas como *C. glabrata* (2001 e 2006) abrangendo 98 hospitais, situados em 28 cidades de 6 continentes. O estudo indicou que essas duas novas espécies representaram porcentagem de apenas 0,2%, a qual se refere a uma cepa de *C. nivarensis* e duas de *C. bracarensis* e representa valor mínimo se comparado ao de isolados classificados como *C. glabrata*.

Em um estudo mais recente realizado na Itália, os autores analisaram total de 1000 cepas identificadas como *C. glabrata*, coletadas entre 2009-2011 de 14 regiões italianas e 18 centros médicos. Os resultados mostraram que nenhuma cepa do complexo diferente de *C. glabrata* foi encontrada, demonstrando a raridade da mesma e corroborando com os dados encontrados nesta pesquisa (Esposito et al., 2013)

Por outro lado, maiores taxas foram encontradas em estudos prévios. Um estudo realizado nos Estados Unidos em 2007, com 137 isolados clínicos de *C. glabrata* obtidos de vários sites anatômicos em um centro de unidade de terapia intensiva, avaliou a presença de *C. bracarensis* e *C. nivariensis*. Os resultados indicaram 3 (2,2%) isolados de *C. bracarensis* e nenhum de *C. nivariensis* (BISHOP et al 2008). Outro estudo analisou a ocorrência destas duas novas espécies entre isolados de *C. glabrata* durante período de 2008-2009 em um laboratório de referência em micologia da Espanha. Entre as 143 cepas 3 (2%) foram identificadas como *C. bracarensis* e nenhuma como *C. nivarensis* (Cuenca-Estrella et al., 2011).

Todos esses dados indicam que as novas espécies podem ter distribuição geográfica limitada a determinadas regiões. Desse modo, é importante o monitoramento no espaço e no tempo da ocorrência desses agentes, de modo a verificar tendências e possíveis fatores interferentes nesse comportamento.

Ao lado da vigilância da frequência de novas espécies é fundamental investigar a emergência de cepas resistentes a antifúngicos nesses agentes. Em outro estudo, Borman et al. (2008) analisaram 16 cepas de *C. nivarensis*, obtidas

entre 2005 e 2006 na Inglaterra, de vários sítios anatômicos de casos internados em 12 hospitais diferentes e observaram multiresistência nessa espécie.

A sensibilidade ao fluconazol, antifúngico da classe dos azóis, amplamente usado na clínica para casos de candidemia, foi alta para todas as cepas de *C. glabrata* analisadas neste estudo. Em comparação a estudo prévio, realizado por Pereira et al. (2009), em que foram analisados 50 casos de fungemia de hospital no estado de São Paulo entre 2004 e 2008, os achados são equivalentes, pois os autores observaram alta sensibilidade (CIM < 4 mg/L) nos 2 únicos isolados de *C. glabrata*.

De outro modo, a maior parte dos dados ressalta a presença de cepas resistentes. Chama a atenção o estudo na Dinamarca, de Arendrup et al. (2005), em que foram analisados 303 casos de fungemia, no qual *C. glabrata* correspondeu a 20% dos casos com resistência (CIM > 64 mg/L) em 11 (3,6%) cepas. Outro estudo de Malani et al. (2005), realizado entre 1995 e 2002 nos Estados Unidos, demonstrou em 103 isolados de *C. glabrata*, 60% de resistência ao fluconazol (MIC > 32 mg/L).

Dados do programa internacional (SENTRY) publicado por Pfaller et al. (2004), em que foram estudados isolados dos Estados Unidos (n=331), América Latina (n=58), Europa (n=135) e Ásia-Costa do Pacífico (n=55) informam que nos Estados Unidos a resistência (10,3%) foi maior do que na Europa (7,2%). Interessante que, nesse mesmo estudo, entre os isolados da América Latina, apenas 2 (3,5%) apresentaram resistência (CIM > 64 mg/L), caracterizando taxa baixa. Os grandes programas de monitoramento de resistência são relevantes e um exemplo disso é a publicação dos dados do SENTRY de 2009 que mostram, de modo curioso, apenas 2,5 % dentre 159 cepas de *C. glabrata*, com perfil de resistência ao fluconazol (Pfaller et al., 2010). Em infecções sanguíneas por *C. glabrata*, a resistência ao fluconazol é presente em aproximadamente 10 a 15 % dos casos, no entanto, há relatos sugerindo que a pressão seletiva do fármaco não seja o único fator responsável pela atual prevalência de *C. glabrata* em candidemias; a exposição desta espécie a subdoses de fluconazol pode resultar em resistência adquirida (Pfaller et al., 2002).

Se analisados os valores de MIC₅₀ e MIC₉₀, para fluconazol, encontrados neste estudo, com aqueles descritos em estudos anteriormente publicados, nota-se que são menores que os de Pfaller *et al.* (2004) e Messer *et al.*, (2009), que encontraram respectivamente valores de 8mg/L e 64 mg/L. No entanto, os valores foram maiores do que os descritos na última publicação do Programa *SENTRY*, em que os valores foram de 2 mg/L e 8 mg/L (Pfaller et al., 2010).

O perfil de sensibilidade ao antifúngico itraconazol indicou alto valor de resistência, mas inferior ao encontrado no estudo (83 %) de Malani *et al.* (2005). Em 2002, Safdar *et al.* analisaram 347 cepas de *C. glabrata* e verificaram valor um pouco inferior de resistência (15,2%). Por outro lado, o programa *SENTRY*, com dados de 2009, demonstrou que, entre os 159 isolados de *C. glabrata*, a taxa foi maior (39 %) de resistência ao itraconazol (Pfaller et al., 2010). No mesmo estudo os valores de MIC₅₀ e MIC₉₀ foram semelhantes ao descritos neste estudo, 0,5 mg/L e 2 mg/L, e menores em relação ao programa *SENTRY*, 1 mg/L e 2 mg/L, (Messer et al., 2009)

Foram encontrados 80% (60/75) dos isolados na categoria de sensibilidade dose-dependente ao itraconazol (CIM 0,25 mg/L ou CIM de 0,5 mg/L), Essa taxa é maior ao descrito (43%) em 148 cepas por, Safdar *et al.* (2002), confirmando perfil de resistência ao itraconazol.

Para voriconazol, a comparação de resultados deste estudo com dados de literatura mundial é mais difícil, visto que os valores adotados para pontos de corte para definir resistência ou *cut-off* epidemiológico, estão ainda em discussão. Os dados brutos dos estudos não estão disponíveis nas publicações, de modo que a análise é difícil. Se levarmos em conta o valor de CIM > 0,125 mg/L, Arendrup et al. (2005) encontraram 11 (3,6%) cepas resistentes de *C. glabrata*.

Ressalta-se que em outros estudos foram adotados valores mais altos para definir resistência (CIM > 2mg/L), como o de Pfaller et al. (2010), indicando que entre 159 isolados, somente 2,5% apresentaram resistência. Malani et al. (2005) também usaram o mesmo critério de ponto de corte e observaram a mais alta taxa de resistência (44%) em cepas de *C. glabrata*.

A resposta clínica ao voriconazol, em casos de infecção por *C. glabrata* é, em geral, baixa e a ausência de correlação entre evolução clínica e resultado de CIM, não permitem determinar *breakpoint* segundo o método de CLSI, recomendando-se apenas o uso de *cut-off* epidemiológico. Os valores de MIC₅₀ e MIC₉₀ foram menor que os descritos por Malani et al. (2005), em que foram descritos valores de 0,5 mg/L e 2 mg/L, porém semelhantes ao estudo realizado por Pfaller et al. (2010), em que foram 0,12 mg/L e 0,5 mg/L.

A sensibilidade dos isolados de *C. glabrata* à caspofungina nesse estudo foi alta, com apenas seis isolados no limite superior de ponto de corte proposto (CIM 0,5 mg/ L). Pfaller et al., (2004) analisaram 604 cepas de *C. glabrata* e constataram que todas elas foram sensíveis (CIM < 0,5 mg/L). Porém, o mesmo grupo em 2010, analisou 159 cepas e verificaram que 2,5 % das cepas apresentaram resistência à caspofungina (Pfaller et al. 2010).

Em outro estudo realizado por Jung et al. (2010) verificaram que, entre 72 cepas de *C. glabrata*, nenhuma foi resistente (CIM >5 mg/L). Os valores de MIC₅₀ e MIC₉₀ apresentados neste estudo para caspofungina foram maiores do que os valores apresentados por Jung et al. (2010) em que foram 0,06 mg/L e 0,125 mg/L e semelhantes ao estudo realizado por Pfaller et al. (2010), em que se apresentaram 0,25 mg/L e 0,5 mg/L.

Entretanto, recentemente tornou-se evidente que, clinicamente, infecções por *Candida* envolvendo cepas com mutações FKS1 ou FKS2 não possuem necessariamente CIM acima do ponto de corte (Arendrup et al., 2009; Castanheira et al., 2014; Thompson et al., 2008). Além disso, estudos cinéticos do complexo enzimático glucana sintetase sugerem que um menor ponto de corte parece ser mais sensível na detecção daqueles isolados com mutações (Garcia-Effron et al., 2009). Estas observações colocam em questão a habilidade dos atuais pontos de corte em identificar com segurança, isolados que possuem mecanismo de resistência, associados a falhas terapêuticas (Garcia-Effron et al., 2008).

A anfotericina B é recomendada em geral como terapia primária em infecções graves causadas por *C. glabrata*. Entretanto, vem se tornando evidente que este agente não é efetivo contra todas as espécies de *Candida*, e

altas doses de anfotericina B podem ser requeridas para um tratamento eficiente (Kremery & Barnes, 2002).

Em relação à anfotericina B, o perfil de sensibilidade encontrado neste estudo demonstrou alta sensibilidade (CIM < 1 mg/L), com 24 (32 %) cepas no limite superior de ponto de corte proposto (CIM, 1 mg/L). Dados compatíveis com a sensibilidade relatada no estudo de Messer *et al.* (2009) pelo Programa *SENTRY*, com 202 cepas de *C. glabrata*, em que todas foram sensíveis (CIM <1 mg/L) à anfotericina B.

Jung *et al.* (2010) analisaram 72 cepas de *C. glabrata* e observaram sensibilidade total à anfotericina B, confirmando a razão do seu papel como fármaco padrão-ouro para candidemia. Em relação aos valores encontrados neste estudo de MIC₅₀ e MIC₉₀, estes foram menores do que os descritos por Messer *et al.* (2009) sendo 1 mg/L e 1 mg/L respectivamente, ou Pfaller *et al.* (2004) sendo 1 mg/L e 2 mg/L, respectivamente. A metodologia dada pelo protocolo M27-A3 do CLSI não identifica com segurança isolados resistentes à anfotericina B e variações desta metodologia usando diferentes meios de cultura e determinação de concentrações fungicidas mínimas parecem melhorar a detecção de isolados resistentes (Diekema *et al.*, 2002).

No entanto, todos os estudos que empregam a determinação de CIM como o método de referência, avalia apenas o poder inibitório do fármaco, sendo que um método para demonstrar a ação fungicida da anfotericina B, de modo dinâmico ao longo do tempo de exposição, poderia ser mais adequado, desde que corresponde ao efeito real deste medicamento. Além disso, as curvas de morte talvez sejam mais acuradas do que a determinação da concentração fungicida mínima (MFC), que avalia a ação fungistática e fungicida do fármaco.

Um dos aspectos já observados é a relação entre atividade fungicida da anfotericina B, por curva de morte, e atividade inibitória mínima por microdiluição, ou seja, a proporção entre a dose fungicida e a inibitória. Alguns estudos indicam a existência de cepas que necessitam de altas doses, até 16 vezes maior do que o valor do CIM, para serem inativadas (SOCZO *et al.* 2008; SZABO *et al.* 2008).

Relatos recentes sugerem que uma proporção crescente de *C. glabrata* pode apresentar resistência *in vitro* à anfotericina B (DIEKEMA et al. 2002), justificando a busca de métodos alternativos ao de referência, para esse monitoramento. Cantón *et al.* (2004) relataram, no único estudo publicado com isolados de *C. glabrata*, que a média (16 h) de tempo de exposição ao polieno, necessária para inibir 99,9% (*endpoint* fungicida) das colônias) era superior à observada para *C. albicans* (2 h), mas inferior àquela de *C. parapsilosis* (>24h), demonstrando a sensibilidade ao efeito fungicida nas distintas espécies e valorizando o papel do método de curvas de morte para avaliar eficácia de anfotericina B.

De modo inédito no Brasil, o teste de curvas de morte foi usado para *C. glabrata* e, pode demonstrar a existência de cepas com menor suscetibilidade à anfotericina B, que não foram identificadas no teste de referência por microdiluição. Quase a totalidade das cepas (96%) morreu antes das primeiras 24h de exposição ao fármaco, sendo que, pequena proporção (7,5 %) o foi às 4 h, seguida de mais 70,6 % às 8 h, mais 8% das cepas às 12 h e ao final desse período, mais 9,9% do grupo havia morrido. A ação fungicida de 1 mg/L de anfotericina B já foi observada nas primeiras 4 h de exposição, indicando a forte atividade do polieno. Por outro lado, pode ser identificado duas (2,6%) cepas que nunca sofreram efeito dação fungicida de 1 mg/L do polieno. As curvas de morte com todos os isolados avaliou o efeito letal de 1 mg/L de anfotericina B. Este valor foi escolhido por representar a dose sérica máxima do polieno no organismo humano, após dose convencional. Interessante que, os valores de CIM de anfotericina B para estas 2 cepas, determinados por método de referência de microdiluição, foram baixos (CIM 0,5 mg/L e 0,25 mg/L). Portanto, não foi observada relação entre CIM e tempo fungicida, sendo encontrado tempo máximo de morte (48h) para um isolado de baixo CIM. Por esses valores, verifica-se que o efeito fungicida para essas duas cepas seria obtido apenas com doses maiores do que a indicada pelo CIM. Tomando-se em conta que a concentração de 1 mg/L para anfotericina B, dificilmente, é obtida na corrente sanguínea de pacientes sob tratamento (Pappas *et al.* 2009), o dado inédito

encontrado neste estudo pode ter implicações clínicas, a serem investigados em futuros estudos clínicos.

A interpretação clínica para a presença de células viáveis, mesmo após exposição a fármaco polieno fungicida ainda não é conhecida, o mesmo pode-se dizer para o fato em si. Uma das hipóteses é que o isolado retomou o crescimento pela presença de algumas (0,1%) células ainda viáveis, desde que a metodologia de curva de morte tem *endpoint* em 99,9% de redução da concentração inicial. Outra hipótese é a desproporção entre o polieno, cuja concentração é fixa, e o número crescente de células de leveduras decorrentes do contínuo crescimento microbiano. Por fim, como já descrito em outros estudos, esses isolados podem ser, de fato, tolerantes à anfotericina B, confirmando a existência de cepas menos sensíveis à anfotericina B em isolados clínicos de *C. glabrata*.

Este estudo confirmou o que a maioria dos autores alertam (Soczo *et al.* 2008; Szabo *et al.* 2008) afirmam que para anfotericina B, os testes de referencia “*in vitro*” não são totalmente adequados e novas metodologias devem ser empregadas para definir um método com alta sensibilidade para determinar cepas resistentes ao fármaco.

6 Conclusões

Diante dos resultados observados e nas condições em que foi conduzido o presente experimento, pode-se concluir que:

- As espécies correlatas à *C. glabrata*- *C. bracarensis* e *C. nivariensis*- não foram detectadas em isolados de hemocultura obtidos de coleção estadual de referência;
- O perfil de sensibilidade, a diferentes fármacos azólicos, de isolados clínicos de *C. glabrata* não foi homogêneo, mas dependeu do isolado;
- Em contraposição ao descrito na literatura internacional, e em concordância a dados nacionais, não foi encontrada resistência *in vitro* ao fluconazol;
- Itraconazol foi o fármaco azólico menos eficaz (18% resistência) isolados resistentes, seguido de voriconazol, que também não teve bom desempenho frente aos isolados de *C. glabrata*;
- Seis isolados apresentaram resistência a caspofungina;
- Anfotericina B foi eficaz para inibir isolados de *C. glabrata* em concordância a estudos prévios, mas a avaliação do seu poder fungicida indicou a presença de 2,6% (2) cepas tolerantes à ação fungicida do polieno, ressaltando a necessidade de estudos de correlação clínico-laboratorial para avaliação da importância médica deste achado.
- O teste de curvas de morte foi bastante eficaz para demonstrar a ação de anfotericina B diferenciada entre cepas de mesma espécie, ao contrário do teste de CIM que agrupou todas as cepas dentro da mesma classe de sensibilidade à ação inibitória do fármaco.

7 Referências bibliográficas

Abi Said, D., and E. Anaissie. Epidemiology of non-albicans *Candida* spp. *Baillieres Clin. Infect. Dis.* 1998; 7:1131–1133.

Abruzzo GK, Gill CJ & Flattery AM. - Efficacy of the echinocandin caspofungin against disseminated aspergillosis e candidiasis in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2000; 42: 2310-2318.

Alcoba-Florez, J., S. Méndez-Alvarez, J. Cano, J. Guarro, E. Pérez-Roth, and M. del Pilar Arevalo. Phenotypic and molecular characterization of *Candida nivariensis*. nov., a possible new opportunistic fungus. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43:4107–4111.

Antunes AG, Pasqualotto AC, Diaz MC, D azevedo PA, Severo LC. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 2004; 46: 239-41.

Anvisa. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Detecção e identificação de fungos de importância médica. In: Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde. Brasília, 2013; 47p.

Arendrup MC, Fursted K, Gahrn-Hansen B et al. Seminal surveillance of fungemia in Denmark: notably high rates of fungemia and numbers of isolates with reduced azoles susceptibility. *J Clin Microbiol* 2005; 50:3496-8.

Arendrup MC, Garcia-Effron, G, Buzina W, Mortensen KL, Reiter N, Lundin C, Jensen HE, Lass-Flörl C, Perlin DS, Bruun B. Breakthrough *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* Double infection during caspofungin treatment: laboratory characteristics and implication for susceptibility testing. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 2009.,53 1185-1193.

- Barberino MG, Silva N, Rebouças C, Barreiro K, Alcantara AP, Netto EM, et al. Evaluation of blood stream infections by *Candida* in three tertiary hospitals in Salvador, Brazil: a case-control study. *Braz J Infect Dis*, 2006; 10: 36-40.
- Barns, S. M., D. J. Lane, M. L. Sogin, C. Bibeau, and W. G. Weisburg. Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. *J Bacteriol* 1991.173:2250-2255.
- Barry AL, Pfaller MA, Brown SD, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Knapp C. Quality control limits for broth microdilution susceptibility tests of ten antifungal agents. *J. Clin. Microbiol* 2000; 38:3457-3459.
- Bassetti M, Righi E, Cpsta A, Fasce R, Molinari MP, Rosso R, Pallavacini FB and Viscoli C. Epidemiological trends in candidemia in intensive care. *BMC Infect Dis* 2006. 6: 21.
- Ben-Ami, R., R. E. Lewis, and D. P. Kontoyiannis.. Immunocompromised hosts: immunopharmacology of modern antifungals. *Clin Infect Dis*. 2008.47:226-235.
- Bishop JA, Chase N, Magill SS, Kurtzman CP, Fiandaca MJ, Merz WG. *Candida bracarensis* Detected among Isolates of *Candida glabrata* by Peptide Nucleic Acid Fluorescence In Situ Hybridization: Susceptibility Data and Documentation of Presumed Infection. *J Clin Microbiol* 2007; 2: 443–446.
- Borman AM, Petch R, Cristopher JL, Palmer MD, Bridge PD, Johnson EM. *Candida nivariensis*, an Emerging Pathogenic Fungus with Multidrug Resistance to Antifungal Agents. *J. Clin. Microbiol*. 2008; 4: 933–938.
- Branch, R. A.. Prevention of amphotericin B-induced renal impairment. A review on the use of sodium supplementation. *Arch Intern Med*. 1988.148:2389-2394.

Branchini ML, Pfaller MA, Rhine-Charberg J, Frempong T, Isenberg HD. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol 1994; 32: 452–456.

Brion LP; Uko SE; Goldma DL. Risk of resistance associated with fluconazole prophylaxis: Systematic review. J.Infect. 2007; 54: 521-529 .

Castanheira M, Woosley LN, Messer SA, Diekema DJ, Jones RN, Pfaller MA. Frequency of fks Mutations among *Candida glabrata* Isolates from a 10-Year Global Collection of Bloodstream Infection Isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 2014;58(1):577-80.

Castano, I., S. J. Pan, M. Zupancic, C. Hennequin, B. Dujon, and B. P.Cormack.. Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. Mol Microbiol. 2005.55:1246-1258.

Correia, A., P. Sampaio, S. James, and C. Pais. *Candida bracarensis* sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to *Candida glabrata*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006; 56:313–317.

Chang MR, Carvalho NC, Oliveira AL, Moncada PM, Moraes BA, Asensi MD. Surveillance of pediatric infections in a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. Braz J Infect Dis 2003;7: 149-60.

Chang MR, Correia FP, Costa LC, Xavier PC, Palhares DB, Taira DL, et al. *Candida* bloodstream infection: data from a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2008; 50: .265-8.

Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouer SA, Arthingtonskaggs B, Da Matta DA, Warnock D et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. J Clin Microbiol, 2006; 44:2816-23.

Colombo AL, Guimaraes T, Silva LR, De Almeida LP, Cunha AK, Rady P, et al. Prospective observational study of candidemia in Sao Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2007; 28: 570-6.

Colombo AL, Nakagawa Z, Valderataro F, Branchini ML, Kussano EJ, Nucci M. Susceptibility profile of 200 bloodstream isolates of *Candida* spp. collected from Brazilian tertiary care hospitals. *Med Mycol* 2003; 41: 235-9.

Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouer SA, Arthingtonskaggs B, Da Matta DA, Warnock D et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol*, 2006; 44: 2816-23.

Colombo AL, Thompson L, Graybill JR. The north and south of candidemia: Issues for Latin America. *Drugs Today (Barc)*, 2008 ; 44: 1-34.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard M27-A3, 3 ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. Clinical and Laboratory Standards Institute (2008).

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard M27-S4, 4 ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. Clinical and Laboratory Standards Institute (2012).

Costa SF, Marinho I, Araujo EA, Manrique AE, Medeiros EA, Levin AS. Nosocomial fungaemia: a 2-year prospective study. *J Hosp Infect* 2000; 45: 69-72.

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

Cuenca-Estrella M, Rodero L, Garcia-Effron G, Rodriguez-Tudela JL. Antifungal susceptibilities of *Candida* spp. isolated from blood in Spain and Argentina, 1996 - 1999. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 49: 981 – 7.

Csank, C., and K. Haynes. *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. *FEMS Microbiol Lett.* 2000. 189:115-120.

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

Dayane C. Silva, Marilena A. Martins, Maria Walderez Szeszs, Lucas X. Bonfietti, Dulcilena Matos, Marcia S.C. Melhem. Susceptibility to antifungal agents and genotypes of Brazilian clinical and environmental *Cryptococcus gattii* strains. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2012.332–339.

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

Esposito MC, Prigitano A, Romeo O, Criseo G, Trovato L, Tullio V, Fadda ME, Tortorano AM and FIMUA Working Group. Looking for *Candida nivariensis* and *C. bracarensis* among a large Italian collection of *C. glabrata* isolates: results of the FIMUA working group. Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy. *Mycoses* 2013;(56-3)394-396.

Fournier P, Schwebel C, Maubon D, Vesin A, Lebeau B, Foroni L, Hamidfar-Roy R, Cornet M, Timsit JF, Pelloux H. Antifungal use influences *Candida* species distribution and susceptibility in the intensive care unit. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66.

Franca JC, Ribeiro CE, Queiroz-Telles F. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: incidence, frequency of different species, risk factors and antifungal susceptibility. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008; 41:23-8.

Galban B, Mariscal F. Epidemiology of candidemia in ICU. *Rev Iberoam Micol* 2006; 23:12-5.

Garcia-Effron G, Lee S, Park S, Cleary JD, Perlin DS. Effect of *Candida glabrata* FKS1 and FKS2 mutations on echinocandin sensitivity and kinetics of 1,3-beta-D-glucan synthase: implication for the existing susceptibility breakpoint. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53:3690-9.

Garcia-Effron G, Kontoyiannis D, Lewis RE, Perlin DS. Caspofungin resistant *Candida tropicalis* strains causing breakthrough fungemia in patients at high risk for hematologic malignancies. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2008. 52:4181-4183.

Garey KW, Rege M, Pai MP, Mingo DE, Suda KJ, Turpin RS, Bearden DT. Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. *Clin. Infect. Dis.*, 2006. 25-31.

Giannini MJS, Melhem MSC. Infecções Fúngicas. In: Ferreira AW, Avila SLM, Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000, cap.33, p.334-403.

Godoy P, Tiraboschi, IN, Severo LC, Bustamante B, Calvo B, Almeida LP, et al. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp.

bloodstream isolates from Latin American hospitals. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2003; 98: 401-5.

Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, Lyon GM, Arthingtonskaggs BA, Mirza SA, et al. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. J Clin Microbiol 2004; 2: 519-27.

Hinrichsen SL, Falcao E, Vilela TA, Colombo AL, Nucci M, Moura L, et al. Candidemia in a tertiary hospital in northeastern Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2007; 41: 394-8.

Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. Clin Infect Dis 2009; 48: 1695-703.

Hospenthal DR, Murray CK, Rinaldi MG. The role of antifungal susceptibility testing in the therapy of candidiasis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2004;48:153-160.

Jung SI, Shin JH, Song JH, Peck KR, Lee K, Kim M, Chang HH and Moon CS. Multicenter surveillance of species distribution and antifungal susceptibilities of *Candida* bloodstream isolates in South Korea. Medical Mycology 2010; 48:4, 669-674.

Krcmery V, Barnes AJ. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. J Hosp Infect 2002; 50:243-60.

Klepser ME, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME, Pfaller MA. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: Proposal for Standardized Methods. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1998; 1207-1212.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Hein-Vaccari EM, Melo NT. Tratado de Micologia Médica. 9ª. ed. São Paulo: Sarvier; 2002.

Larone, Davise H. Medically important fungi: a guide to identification. Washington, DC: ASM Press. 2011.

Lockhart SR, Messer SA, Gherna M, Bishop já, Merz WG, Pfaller MA. Identification of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in a Large Global Collection of *Candida glabrata* Isolates: Comparison to the Literature. J. Clin. Microbiol. 2009; 3: 1216–1217.

Lockart SR, Joly S, Vargas K, Swails-Wenger J, Enger L, Soll DR. Natural defenses against colonization breakdown in the oral cavities of the elderly. J.Dental Res 1999; 78:857-858.

Lin MY, Carmeli Y, Zumsteg J, Flores EL, Tolentino J, Sreeramoju P. Prior antimicrobial therapy and risk for hospital-acquired *Candida glabrata* and *Candida krusei* fungemia: a case-case-control study. Antimicrob Agents Chemother, 2005;49: 4555-60.

Malani A, Hmoud J, Chiu L, Carver PL, Bielaczyc A, Kauffman CA. *Candida glabrata* Fungemia: Experience in a Tertiary Care Center. Clin Infect Dis. 2005; 41(7): 975-981.

Mann PA, Mcnicholas PM, Chau AS, Patel R, Mendrick C, Ullmann AJ, Cornely OA, Patino H, Black TA. Impact of antifungal prophylaxis on colonization and azole susceptibility of *Candida* species. Antimicrob. Agents Chemother. 2009. 5026-5034.

Matta DA, Machado AM, Azevedo AC, Kusano EJ, Travassos NF, Salomao R et al. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal

drugs: results of a multicenter study conducted in Sao Paulo, Brazil, *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007;57 : 399-404.

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

Messer SA, Moet GJ, Kirby JT, Jones RN Activity of contemporary antifungal agents, including the novel echinocandin anidulafungin, tested against *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and *Aspergillus* spp.: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006 to 2007). *J Clin Microbiol.*2009 47:1942–1946.

Moretti ML, Trabasso P , Lyra L , Fagnani R , Resende MR , De Oliveira LG, Schreiber AG. Is the incidence of candidemia caused by *Candida glabrata* increasing in Brazil? Five-year surveillance of *Candida* blood stream infection in a university reference hospital in southeast Brazil. Internal Medicine Department and Clinical Pathology Department, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas. *Medical Mycology* .2013, 51, 225–230.

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

NCCLS-NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS(NCCLS) – Clinical and Laboratory Standards Intitute (CLSI). Quality Control Minimal Inhibitory Concentration (MIC) Limits for Broth Microdilution and MIC Interpretive Breakpoints; Informational Supplement - Second Edition. Document M 27-S2, 2006.

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

Nucci M, Silveira MI, Spector N, Silveira F, Velasco E, Martins CA, et al. Fungemia in cancer patients in Brazil: predominance of non-*albicans* species. *Mycopathologia*, 1998;141: 65-8.

Nunes MO. Epidemiologia de candidemias e perfil de susceptibilidade das leveduras do gênero *Candida* em Hospital Universitário de Mato Grosso do Sul. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 2009.

Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Pappas PG, Hamill RJ, Larsen RA, Horowitz H et al. J. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3149-54.

Passos XS, Costa CR, Araujo CR, Nascimento ES, Souza LK, Fernandes Ode F, et al. Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* spp. bloodstream isolates from a Brazilian tertiary care hospital. *Mycopathologia* 2007; 163: 145-51.

Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 503–535.

Pereira GH, Müller PR, Szeszs MW, Levin AS, Melhem MSC. Five-year evaluation of bloodstream yeast infection in a tertiary hospital: The predominance of non-*C. albicans Candida* species. *Medical Mycol* (online) 2010; 1: 1-4.

Purisco SU, Martins MA, Szeszs MW, Castro e Silva DM, Pukinskas SR, Bonfietti LX, Baez AA, Melhem MS. Comparison of the broth microdilution (BMD) method of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and the Clinical Laboratory Standards Institute BMD method for non-*Candida albicans* and non-*C. tropicalis* bloodstream isolates from eleven tertiary hospitals in São Paulo state, Brazil. FEMS Yeast Res. 2012 ;12(8):890-6.

Pfaller, M. A., L. Boyken, R. J. Hollis, J. Kroeger, S. A. Messer, S. Tendolkar, and D. J. Diekema.. In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. J Clin Microbiol 2008.46:150-156.

Pfaller MA, Castanheira M, Shawn A, Messer, Moet GJ, Jones RN, Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus fumigatus*: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiologic cutoff values to characterize resistance in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2009). Diagnostic Microbiology & Infectious Disease - January 2011 (Vol. 69, Issue 1, Pages 45-50, DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2010; 08.013).

Pfaller MA, Diekema DJ. Progress in Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* spp. by Use of Clinical and Laboratory Standards Institute Broth Microdilution Methods, 2010 to 2012. J. Clin. Microbiol. September 2012 .50. 9 2846-2856

Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev, 2007; 20:133-63.

Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. J Clin Microbiol 2007; 45: 1735–1745.

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: S11–23.

Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Messer SA, Hollis RJ. Trend in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patient with bloodstream infection: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 to 2000. J. Clin. Microbiol. 2002; 852-856.

Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ. In vitro activities of anidulafungin against more than 2,500 clinical isolates of *Candida* spp.. Including 315 isolates resistant to fluconazole. J.Clin. Microbiol. 2005. 43:5425-5427.

Pfaller MA, Jones RN, Doern GV et al. - For the SENTRY Participant Group (Europe). International surveillance of blood stream infections due to *Candida* species in the European SENTRY Program: Species distribution and antifungal susceptibility including the investigational triazole and echinocandin agents. Diagn Microbiol Infect Dis. 1999;35:19-25.

Rex, J. H., M. A. Pfaller, J. N. Galgiani, M. S. Bartlett, A. Espinel-Ingroff, M. A. Ghannoum, M. Lancaster, F. C. Odds, M. G. Rinaldi, T. J. Walsh, and A. L. Barry for the subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. Clin. Infect. Dis. 1997; 24:235–247.

Richter SS, Galask RP, Messer SA, Hollis RJ, Diekema DJ, Pfaller MA Antifungal susceptibilities of *Candida* Species Causing Vulvovaginitis and Epidemiology of Recurrent Cases. J Clin Microbiol. 2005; 43: 2155-2162.

Rodero L, Cordoba S, Cahn P, Hoehenfellner F, Davel G, Canteros C et al. In vitro susceptibility studies of *Cryptococcus neoformans* isolated from patients with no clinical response to amphotericin B therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2000, 45, 239-242.

Romeo O, Scordino F, Pernice I, Passo C, Criseo G. A multiplex PCR protocol for rapid identification of *Candida glabrata* and its phylogenetically related species *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis*. *J Microbiol Methods*. 2009; 79: 117-120.

Ruan SY, Lee LN, Jerng JS, Yu CJ, Hsueh PR. *Candida glabrata* fungemia in intensive care units. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008; 14: 136-140.

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

Safdar, A., V. Chaturvedi, B. S. Knoll, D. H. Larone, D. S. Perlin, and D. Armstrong.. Prospective, multicenter surveillance study of *Candida glabrata*: Fluconazole and itraconazole susceptibility profiles in bloodstream, invasive, and colonizing strains and differences between isolates from three urban teaching hospitals in New York City (*Candida* Susceptibility Trends Study, 1998 to 1999). *Antimicrob. Agents Chemother*. 2002. 46:3268-3272

Sambrook J, Maniats T, Fritsch EF. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory ed, v.2,1 a. ed. 1989.

Sandven, P., L. Bevanger, A. Digranes, P. Gaustad, H. H. Haukland, and M. Steinbakk. Constant low rate of fungemia in Norway, 1991 to 1996. The Norwegian Yeast Study Group. *J. Clin. Microbiol*. 1998. 36:3455–3459.

Sanglard, D., and F. C. Odds. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: Molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect. Dis.* 2002; 2:73–85.

Sobel JD, Zervos M, Reed BD, Hooton T, Soper D, Nyirjesy P, et al Fluconazole Susceptibility of Vaginal Isolates Obtained from Women with Complicated *Candida* Vaginitis: Clinical Implications. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 34-38.

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

Sóczó G, Kardos G, McNicholas PM, Balogh E, Gergely L, Varga I, Kelentey B, Majoros L. Correlation of posaconazole minimum fungicidal concentration and time kill test against nine *Candida* species. *J Antimicrob Chemother* 2007. 60(5):1004-9.

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

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

Tavanti A, Davidson AD, Fordyce MJ, Gow AV, Maide Odds FC. Population structure and properties of *Candida albicans*, as determined by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 2005;43: 5601-5613.

Thompson GR, Wiederhold NP, Vallor AC, Villareal NC, Lewis JS, Patterson TF. Development of caspofungin resistance following prolonged therapy for invasive candidiasis secondary to *Candida glabrata* infections. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2008. 52:3783-3785.

Tscherner M., Schwarzmüller T., Kuchler K. Pathogenesis and Antifungal Drug Resistance of the Human Fungal Pathogen *Candida glabrata*. *Pharmaceuticals*. 2011; 4(1):169-186.

Tortorano, A.M.; Kibbler, C.; Peman, J.; Bernhardt, H.; Klingspor, L.; Grillot, R. Candidemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2006; 27, 359-366.

Trick, W. E., S. K. Fridkin, J. R. Edwards, R. A. Hajjeh, and R. P. Gaynes. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989–1999. *Clin. Infect. Dis.* 2002; 35:627–630.

Viudes A, Peman J, Canton E, Ubeda P, Lopez-Ribot JL, Gobernado M. Candidemia at a tertiary-care hospital: epidemiology, treatment, clinical outcome and risk factors for death. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2002; 21:767-74.

Wahyuningsih R, Sahbandar IN, Theelen B, Hagen F, Poot G, Meis JF. *Candida nivariensis* Isolated from an Indonesian Human Immunodeficiency Virus-Infected Patient Suffering from Oropharyngeal Candidiasis. *J Clin Microbiol* 2008; 388–391.

Wingard, J. R. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin. Infect. Dis.* 1995; 20:115–125

Wong, S., G. Butler, and K. H. Wolfe. Gene order evolution and paleopolyploidy in hemiascomycete yeasts. *Proc Natl Acad Sci.* 2002. 99:9272-9277.

Zardo V, Mezzari A. Os antifúngicos nas infecções por *Candida sp.* Newslab, 2004; 63: 136-146.

Apêndice 1 – Sensibilidade a antifúngicos de 26 (1-26) isolados de *Candida glabrata*

Nº Isolado	Identificação	MIC FCZ*	MIC ITZ**	MIC VCZ***	MIC AMB****	MIC CASPO*****
1	<i>C. glabrata</i>	8	0,25	0,25	0,5	0,25
2	<i>C. glabrata</i>	8	1	0,25	0,5	0,25
3	<i>C. glabrata</i>	8	0,5	0,25	0,5	0,25
4	<i>C. glabrata</i>	8	0,5	0,25	0,5	0,25
5	<i>C. glabrata</i>	16	1	0,5	0,5	0,25
6	<i>C. glabrata</i>	16	1	0,5	0,5	0,25
7	<i>C. glabrata</i>	8	1	0,25	0,5	0,25
8	<i>C. glabrata</i>	16	0,25	0,25	0,25	0,25
9	<i>C. glabrata</i>	8	0,25	0,12	1	0,5
10	<i>C. glabrata</i>	8	1	0,25	0,5	0,25
11	<i>C. glabrata</i>	8	0,5	0,25	0,25	0,25
12	<i>C. glabrata</i>	16	0,5	0,5	0,25	0,25
13	<i>C. glabrata</i>	8	1	0,5	0,12	0,25
14	<i>C. glabrata</i>	16	0,5	0,5	0,5	0,25
15	<i>C. glabrata</i>	8	0,5	0,5	0,5	0,5
16	<i>C. glabrata</i>	8	1	0,25	0,5	0,25
17	<i>C. glabrata</i>	16	0,5	0,25	0,25	0,25
18	<i>C. glabrata</i>	8	0,25	0,25	0,25	0,25
19	<i>C. glabrata</i>	8	0,5	0,25	0,25	0,25
20	<i>C. glabrata</i>	8	0,25	0,25	0,25	0,5
21	<i>C. glabrata</i>	8	0,5	0,25	0,5	0,25
22	<i>C. glabrata</i>	8	0,5	0,5	0,5	0,25
23	<i>C. glabrata</i>	4	0,25	0,25	0,25	0,25
24	<i>C. glabrata</i>	4	0,25	0,25	0,5	0,25
25	<i>C. glabrata</i>	4	0,25	0,25	0,5	0,25
26	<i>C. glabrata</i>	8	0,5	0,25	0,25	0,25
Cepa Padrão	<i>C. krusei</i>	16	0,12	0,25	0,5	2
Cepa Padrão	<i>C. parapsilosis</i>	2	0,12	0,06	0,25	2

*FCZ, Fluconazol

** ITZ, Itraconazol

*** VCZ, Voriconazol

**** AMB, Anfotericina B

***** Caspo, Caspofungina

Apêndice 2 – Sensibilidade a antifúngicos de 24 (27-50) isolados de *Candida glabrata*

Nº Isolado	Identificação	MIC FCZ	MIC ITZ	MIC VCZ	MIC AMB	MIC CASPO
27	<i>C.glabrata</i>	4	0,5	0,25	0,25	0,25
28	<i>C.glabrata</i>	8	1	0,25	0,5	0,25
29	<i>C.glabrata</i>	4	1	0,12	0,25	0,25
30	<i>C.glabrata</i>	8	0,5	0,5	0,5	0,25
31	<i>C.glabrata</i>	4	0,5	0,25	0,5	0,25
32	<i>C.glabrata</i>	8	0,5	0,25	0,5	0,25
33	<i>C.glabrata</i>	8	0,5	0,25	0,5	0,25
34	<i>C.glabrata</i>	8	0,5	0,25	0,5	0,25
35	<i>C.glabrata</i>	8	0,25	0,25	0,5	0,25
36	<i>C.glabrata</i>	16	0,5	1	0,5	0,25
37	<i>C.glabrata</i>	8	0,5	0,25	0,2	0,12
38	<i>C.glabrata</i>	16	0,5	0,5	0,5	0,25
39	<i>C.glabrata</i>	8	0,5	0,25	1	0,25
40	<i>C.glabrata</i>	8	0,5	0,25	0,5	0,25
41	<i>C.glabrata</i>	8	0,25	0,25	0,5	0,25
42	<i>C.glabrata</i>	8	0,5	0,25	0,5	0,25
43	<i>C.glabrata</i>	16	1	0,25	0,5	0,5
44	<i>C.glabrata</i>	8	0,5	0,25	0,5	0,25
45	<i>c.glabrata</i>	8	0,5	0,25	0,5	0,5
46	<i>c.glabrata</i>	8	0,5	0,25	0,5	0,25
47	<i>c.glabrata</i>	8	1	0,25	0,5	0,5
48	<i>c.glabrata</i>	8	0,5	0,25	0,5	0,25
49	<i>c.glabrata</i>	8	0,5	0,25	0,5	0,25
50	<i>c.glabrata</i>	8	0,5	0,25	0,5	0,25
Cepa Padrão	<i>c.krusei</i>	16	0,5	0,25	0,5	1
Cepa Padrão	<i>C.parapsilosis</i>	2	0,06	0,03	0,5	2

Apêndice 3 – Sensibilidade a antifúngicos de 25 (51-75) isolados de *Candida glabrata*

Nº Isolado	Identificação	MIC FCZ	MIC ITZ	MIC VCZ	MIC AMB	MIC CASPO
51	<i>C. glabrata</i>	8	0,5	0,25	1	0,06
52	<i>C. glabrata</i>	8	0,5	0,25	1	0,06
53	<i>C. glabrata</i>	8	0,25	0,25	1	0,06
54	<i>C. glabrata</i>	8	0,5	0,25	1	0,03
55	<i>C. glabrata</i>	4	0,12	0,12	1	0,06
56	<i>C. glabrata</i>	4	0,5	0,12	0,5	0,06
57	<i>C. glabrata</i>	4	0,5	0,12	1	0,06
58	<i>C. glabrata</i>	8	0,5	0,25	1	0,06
59	<i>C. glabrata</i>	8	0,5	0,25	1	0,12
60	<i>C. glabrata</i>	4	0,5	0,25	1	0,25
61	<i>C. glabrata</i>	4	0,25	0,12	1	0,12
62	<i>C. glabrata</i>	16	0,5	0,5	1	0,03
63	<i>C. glabrata</i>	8	0,5	0,25	1	0,03
64	<i>C. glabrata</i>	4	0,25	0,12	1	0,06
65	<i>C. glabrata</i>	8	0,5	0,12	1	0,06
66	<i>C. glabrata</i>	8	0,5	0,25	1	0,06
67	<i>C. glabrata</i>	8	0,5	0,25	1	0,06
68	<i>C. glabrata</i>	4	0,5	0,12	1	0,03
69	<i>C. glabrata</i>	8	0,5	0,25	1	0,03
70	<i>C. glabrata</i>	16	0,5	0,5	1	0,12
71	<i>C. glabrata</i>	8	1	0,5	0,5	0,06
72	<i>C. glabrata</i>	8	0,5	0,25	1	0,03
73	<i>C. glabrata</i>	16	2	1	0,5	0,06
74	<i>C. glabrata</i>	16	0,5	0,5	1	0,12
75	<i>C. glabrata</i>	16	1	0,25	1	0,12
Cepa Padrão	<i>C. krusei</i>	32	0,25	0,25	1	0,12
Cepa Padrão	<i>C. parapsilosis</i>	2	0,12	0,06	1	156

Apêndice 4 – Contagem de unidades formadoras de colônias, por mL, na metodologia de curvas de morte para 75 isolados de *Candida glabrata* frente à anfotericina B

Isolados	T0*	T4**	T8***	T12****	T24*****	T48*****
1	9990	33,3	0	0	99,9	233,1
2	3762,6	3396,6	33,3	33,3	0	0
3	4329	0	0	0	0	0
4	5261,4	865,8	0	0	0	0
5	7990	3096,9	199,8	299,7	0	0
6	8558,1	33,3	33,3	33,3	0	0
7	6923,4	632,7	0	0	0	0
8	5894,1	299,7	0	0	0	0
9	7692,3	0	0	0	0	0
10	5328	233,1	0	0	0	0
11	7225,1	0	0	0	0	0
12	5361,3	99,9	33,3	33,3	33,3	33,3
13	3663	566,1	33,3	0	0	0
14	4662	432,9	0	0	0	0
15	3596,4	199,8	33,3	66,6	0	0
16	4728,6	66,6	0	0	0	0
17	5328	66,6	0	0	0	0
18	5627,7	0	0	0	0	0
19	5561,1	899,1	33,3	0	0	0
20	6993	1065,6	0	0	0	0
21	1872	432,9	0	0	0	0
22	4229,1	399,6	0	0	0	0
23	4662	0	0	0	0	0
24	4595,4	299,7	0	0	0	0
25	4162,5	466,2	0	0	0	0
26	3130,2	233,1	0	0	0	0
27	2997	632,7	0	0	0	0
28	3618	133,2	33,3	33,3	33,3	0
29	3463,2	199,8	0	0	0	0
30	3663	333	0	0	0	0

31	8624,7	2464	66,6	66,6	0	0
32	4229,1	566,1	33,3	33,3	0	0
33	6726,6	1365,3	0	0	0	0
34	3063,6	133,2	0	0	0	0
35	4229,1	566,1	0	0	0	0
36	2763,9	199,8	0	0	0	0
37	3230,1	233,1	0	0	0	0
38	5427,9	133,2	0	0	0	0
39	4695,3	33,3	33,3	33,3	0	0
40	4029,3	1032,3	0	0	0	0
41	4562,1	566,1	166,5	166,5	0	0
42	4961,7	199,8	0	0	0	0
43	3762,9	33,3	0	0	0	0
44	5561,1	1298,7	33,3	33,3	0	0
45	4761,9	66,6	0	0	0	0
46	4628,7	432,9	0	0	0	0
47	4695,3	0	0	0	0	0
48	4362,3	166,5	0	0	0	0
49	6893,1	499,5	399,6	166,5	0	0
50	6693,3	99,9	0	0	0	0
51	6660	599,4	0	0	0	0
52	7049,6	1798,2	0	0	0	0
53	5519,8	599,4	0	0	0	0
54	6490,5	0	0	0	0	0
55	7714,6	0	0	0	0	0
56	7658	0	0	66,6	0	0
57	7412,9	1431,9	0	0	0	0
58	5323	0	0	33,3	0	0
59	8752,9	1798,2	33,3	0	0	0
60	9685,3	2597,4	0	0	0	0
61	7656	1731,6	0	0	0	0
62	8054,6	2031,3	0	0	0	0
63	9320	7226,1	0	0	0	0

64	7989	4662	66,6	0	0	0
65	8658	4295,7	0	0	0	0
66	9988	8658	2097,9	732,6	0	0
67	7754,9	2664	1864,8	932,4	0	0
68	8390,6	1498,5	33,3	0	0	0
69	7313	1631,7	0	0	0	0
70	8957,7	532,8	0	0	0	0
71	8225,1	99,9	33,3	33,3	0	0
72	6127,2	3063,6	66,6	33,3	0	0
73	7659	1132,2	0	0	0	0
74	5717,6	632,7	66,6	0	0	0
75	8781,2	3163,5	0	0	0	0
C+	9953,7	8291,7	13986	22977	23310	23310

* **T0**, Tempo zero; ** **T4**, Tempo quatro; *** **T8**, Tempo oito; **** **T12**, Tempo doze; ***** **T24**, Tempo 24; ***** **T48**, Tempo 48



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Comitê de Ética em Pesquisa - CEPIAL

Av. Dr. Arnaldo, 355 – Sala 90 - Cerqueira César - 01246-902

Fone: 3068-2859 e-mail: cepi@ial.sp.gov.br



São Paulo, 03 de fevereiro de 2014.

Protocolo: 001/2014

Projeto de Pesquisa: “Avaliação da resistência a antifúngicos em isolados clínicos de *Candida glabrata* e espécies correlatas”

Pesquisador Responsável: Márcia de Souza Carvalho Melhem

Instituição: Instituto Adolfo Lutz

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL analisou e acatou a alteração do título do projeto de pesquisa, aprovado em reunião ordinária de outubro de 2010, para “Caracterização do complexo *Candida glabrata* em isolados de hemocultura e avaliação da sensibilidade a antifúngicos”, de acordo com solicitação da banca do Exame Geral de Qualificação de Dissertação de Mestrado do Programa de Pós Graduação/CCD/SES/SP de Hussein Ali Zein.

Em conformidade com a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, o pesquisador responsável deverá cumprir o item transcrito integralmente a seguir.

IX - Do pesquisador responsável

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa; b) elaborar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; c) desenvolver o projeto conforme delineado; d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento; f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa; g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios deverão ser adicionados ao protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil para análise do CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Luz Marina Trujillo

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

1ª via – coordenador

2ª via - CEPIAL

LMT/dvmp