

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS  
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS  
INFECCIOSAS

MARIA HELENA GALDINO FIGUEIREDO DE CARVALHO

**DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AOS  
FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS DE AMOSTRAS DO  
COMPLEXO DE ESPÉCIES DE *Candida parapsilosis*  
ISOLADAS DE PACIENTES COM FUNGEMIA**

Rio de Janeiro

2012

**DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AOS  
FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS DE AMOSTRAS DO  
COMPLEXO DE ESPÉCIES DE *Candida parapsilosis*  
ISOLADAS DE PACIENTES COM FUNGEMIA**

MARIA HELENA GALDINO FIGUEIREDO DE CARVALHO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosely Maria Zancopé Oliveira.

Co-orientador: Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> Rodrigo de Almeida Paes

Rio de Janeiro

2012

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

C331 Carvalho, Maria Helena Galdino Figueiredo de

Determinação da susceptibilidade aos fármacos antifúngicos de amostras do complexo de espécies de *Candida parapsilosis* isoladas de pacientes com fungemia / Maria Helena Galdino Figueiredo de Carvalho. – Rio de Janeiro, 2012.  
xv,92 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2012.

Bibliografia: f. 58-79

1. Antifúngicos. 2. *Candida metapsilosis*. 3. *Candida orthopsilosis*. 4. *Candida parapsilosis stricto sensu*. 5. Fungemia. I. Título.

CDD 616.969

Dedico este trabalho

A meus queridos pais José de Figueiredo (*in memoriam*) e Francisca Galdino  
pelo amor incondicional, dedicação, incentivo e por todos os ensinamentos.

A meu amado esposo Eduardo Rampasso de Carvalho,  
pelo amor, paciência, carinho e compreensão.

A minhas lindas filhinhas Juliana e Luiza,  
pelos sorrisos constantes que iluminam a minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha admirada orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosely Maria Zancopé Oliveira pela oportunidade, confiança e carinho.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Paes pela amizade, atenção e constante apoio.

Ao Prof. Dr. Mauro de Medeiros Muniz que acompanhou a evolução deste trabalho durante os dois anos de mestrado. Obrigada por todas as suas críticas e sugestões.

À minha revisora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Helena Simões Villas Bôas pelas dicas e correções.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Raquel de Vasconcellos Carvalhães de Oliveira pela colaboração na análise estatística.

À plataforma de sequenciamento gênomico de DNA PDTIS/ Fiocruz pela execução do sequenciamento de duas amostras envolvidas neste estudo.

Ao meu amigo Leonardo Silva Barbedo que participou e contribuiu muito para a realização deste trabalho. Obrigada pela sua disponibilidade, dedicação e ajuda.

Ao meu amigo Fábio Brito dos Santos que me incentivou a fazer o curso de mestrado e me ensinou a trabalhar com testes de susceptibilidade aos antifúngicos.

À minha amiga Rosani dos Santos Reis pelo carinho e ensinamentos na área de micologia.

À minha amiga Monica dos Santos Elias por me ouvir e pelo seu bom humor sempre presente.

À minha amiga Bernardina Pernarietta Morales pela atenção e incentivo.

Às minhas amigas Camila Ferreira Ribeiro, Gabriela Souza de Castro e Marcela de Oliveira Sá pelo excelente trabalho em equipe.

A todos os colegas e amigos do laboratório de imunodiagnóstico Cláudia Vera Pizzini, Manoel Marques Evangelista de Oliveira, Marcos de Abreu Almeida, Fernando Almeida da Silva, Carolina Nascimento de Sousa, Victor Fernandes Tatagiba e Luã Cardoso sempre atenciosos e prestativos.

Aos meus colegas das turmas de Mestrado/ Doutorado e a todos os professores do curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, pelos momentos alegres compartilhados.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

“Feliz aquele que transfere  
o que sabe  
e aprende o que ensina.”

Cora Coralina  
(1889-1985)

Figueiredo-Carvalho, M H G. **Determinação da susceptibilidade aos fármacos antifúngicos de amostras do complexo de espécies de *Candida parapsilosis* isoladas de pacientes com fungemia.** Rio de Janeiro, 2012. 107 f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Evandro Chagas.

## RESUMO

Dentre as espécies de *Candida* não-*albicans*, *Candida parapsilosis* vem emergindo como importante patógeno de infecções fúngicas invasivas com disseminação hematogênica nas últimas décadas em diferentes continentes, principalmente, na Europa e na América Latina. *C. parapsilosis* foi considerada por muito tempo um complexo de três grupos distintos nomeados I, II e III. Tavanti *et al* (2005), baseado na tipagem da sequência multilocus (MLST), propôs o reconhecimento dos grupos II e III, como duas novas espécies: *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, respectivamente, mantendo o grupo I como *C. parapsilosis stricto sensu*. Até agora só tem sido possível distinguir essas três espécies por análise molecular. Métodos comerciais para testes de susceptibilidade aos antifúngicos vêm sendo utilizados para avaliar o comportamento de *Candida* spp. frente às drogas de uso clínico, incluindo o Etest<sup>®</sup> e o sistema Vitek<sup>®</sup> 2. Neste trabalho, estes dois métodos foram comparados ao método de referência de microdiluição em caldo pelo CLSI (M27-A3) para determinar a susceptibilidade *in vitro* de isolados clínicos do complexo *psilosis* aos fármacos antifúngicos anfotericina B, fluconazol, voriconazol e itraconazol. Um total de 53 isolados do complexo *psilosis* oriundos de hemoculturas obtidas de pacientes hospitalizados no município do Rio de Janeiro, entre 1998 e 2006, associados a episódios de fungemia, foram analisados. Cinquenta e um isolados foram discriminados pela PCR, utilizando *primers* espécie-específicos, e dois isolados, pelo sequenciamento, sendo caracterizados como *C. parapsilosis stricto sensu* (75,4%), *C. orthopsilosis* (20,8%) e *C. metapsilosis* (3,8%). Os testes de susceptibilidade aos antifúngicos indicaram que a maioria dos isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* foi sensível a todos os fármacos testados. Entretanto, um único isolado de *C. parapsilosis stricto sensu* apresentou uma CIM = 2 µg/mL para a anfotericina B. Três isolados de *C. orthopsilosis* apresentaram CIM entre 2 e 8 µg/mL para o fluconazol pelo Etest<sup>®</sup> e Vitek<sup>®</sup> 2 e CIM entre 0,19 e 0,25 µg/mL para o itraconazol pelo Etest<sup>®</sup>. Os isolados de *C. metapsilosis* foram sensíveis a todos os fármacos testados. A concordância essencial entre Etest<sup>®</sup> ou Vitek<sup>®</sup> 2 com CLSI foi excelente (100%), exceto para o itraconazol (90,9%). Por outro lado, a concordância categórica foi 72,7% para o itraconazol pelo Etest<sup>®</sup> e 100% para os outros fármacos por ambos os métodos. Para anfotericina B, a concordância categórica foi de 100% para o Etest<sup>®</sup> e de 97,5% pelo Vitek<sup>®</sup> 2 em relação ao CLSI. Este estudo reforça a importância dos métodos Etest<sup>®</sup> e Vitek<sup>®</sup> 2 que podem ser empregados nos laboratórios rotineiros de microbiologia clínica para monitorar e detectar diferenças no perfil de susceptibilidade aos antifúngicos dos isolados de *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*.

**Palavras-chave:** 1. Antifúngicos. 2. *C. metapsilosis*; 3. *C. orthopsilosis*. 4. *C. parapsilosis stricto sensu*; 5. Fungemia.

Figueiredo-Carvalho, M H G. **Determination of antifungal susceptibility of samples of *Candida parapsilosis* complex species isolated from patients with fungemia.** Rio de Janeiro, 2012. 107 s. Dissertation [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Evandro Chagas.

## ABSTRACT

Among non-*albicans* *Candida* species, *Candida parapsilosis* has emerged as an important agent of invasive fungal infections, and several cases associated with fungemia have been reported worldwide in last decade, mostly in Europe and Latin America. For many years, *C. parapsilosis* has been characterized as a complex composed of three genetically distinct groups (groups I, II, and III). Tavanti *et al.* (2005) based on multilocus sequence typing (MLST) technique, proposed the recognition of groups II and III as two different species: *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*, respectively, maintaining the group I as *C. parapsilosis sensu stricto*. Up to now only has been possible to distinguish these three species just by molecular analysis. Commercial antifungal susceptibility methods including Etest<sup>®</sup> and Vitek<sup>®</sup> 2 system have been used to test the antifungal susceptibility of *Candida* spp. In this study, these methods were compared to the CLSI broth microdilution (BMD) reference method to determine *in vitro* susceptibility of clinical *C. parapsilosis* complex isolates to amphotericin B, fluconazole, voriconazole, and itraconazole. A total of 53 *C. parapsilosis* complex isolates from blood cultures obtained of patients who were hospitalized in the city of Rio de Janeiro between 1998 and 2006 associated with episodes of fungemia were analysed. Fifty-one isolates were discriminated by PCR using species-specific primers and two isolates by sequencing, being characterized as *C. parapsilosis sensu stricto* (75.4%), *C. orthopsilosis* (20.8%), and *C. metapsilosis* (3.8%). Antifungal susceptibility tests indicated that most of *C. parapsilosis sensu stricto* isolates were susceptible to all tested drugs. However, a single *C. parapsilosis sensu stricto* isolate presented MIC = 2 µg/ml for amphotericin B. Three *C. orthopsilosis* isolates showed MIC between 2-8 µg/ml for fluconazole by Vitek<sup>®</sup> 2 and MIC between 0.19-0.25 µg/ml for itraconazole by Etest<sup>®</sup>. *C. metapsilosis* isolates were susceptible to all tested drugs. The essential agreement between the Etest<sup>®</sup> or Vitek<sup>®</sup> 2 with the CLSI BMD for all drugs was excellent (100%), except for itraconazole (90.9%). The categorical agreement was 72.7% for itraconazole by Etest<sup>®</sup>, 97.5% for amphotericin B by Vitek<sup>®</sup> 2, and 100% for the other drugs by both methods compared with CLSI BMD. This study reinforces the importance of Etest<sup>®</sup> and Vitek<sup>®</sup> 2 methods in routine clinical microbiological laboratories to survey and detect differences in the profile of the antifungal susceptibility of *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* isolates.

**Keywords:** 1. Antifungal; 2. *C. metapsilosis*; 3. *C. orthopsilosis*; 4. *C. parapsilosis sensu stricto*; 5. Fungemia.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Esquema ilustrativo da preparação do inóculo para execução do teste de susceptibilidade aos antifúngicos pelo método Etest <sup>®</sup> .....	26
<b>Figura 2</b> - Esquema ilustrativo da preparação do inóculo para execução do teste de susceptibilidade aos antifúngicos pelo método Vitek <sup>®</sup> 2 (AST Card YS01).....	27
<b>Figura 3</b> - Esquema de diluição da anfotericina B (ANF), voriconazol (VRZ) e itraconazol (ITR) pelo método da microdiluição em caldo pelo CLSI (M27-A3).....	30
<b>Figura 4</b> - Esquema de diluição do fluconazol pelo método da microdiluição em caldo pelo CLSI (M27-A3).....	31
<b>Figura 5</b> - Chromagar <sup>®</sup> <i>Candida</i> de 72 horas a 35°C.....	35
<b>Figura 6</b> - Produtos de PCR com <i>primers</i> espécie-específicos após amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA.....	36

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

- Quadro 1** - *Primers* espécie-específicos utilizados para discriminação molecular do complexo *psilosis* tendo como alvo a região ITS1-5.8S-ITS2 do gene codificador do rDNA..... 24
- Quadro 2** - Classificação dos tipos de erros categóricos comparando o resultado do perfil de susceptibilidade aos antifúngicos obtido pelo método teste em relação ao método de referência..... 32
- Tabela 1** - Caracterização bioquímica de 53 isolados do complexo *psilosis* oriundos de amostras de hemocultura de pacientes com fungemia que estavam internados em três hospitais no município do Rio de Janeiro entre 1998 e 2006..... 35
- Tabela 2** - Distribuição do número de isolados do complexo *psilosis* presente em três hospitais no município do Rio de Janeiro entre 1998 e 2006..... 37
- Tabela 3** - Valores de concentrações inibitórias mínimas, média geométrica e perfil de susceptibilidade aos antifúngicos *in vitro* de isolados do complexo *psilosis* oriundos de pacientes com fungemia que estavam internados em três hospitais no município do Rio de Janeiro entre 1998 e 2006 pelo método Etest<sup>®</sup> ..... 39
- Tabela 4** - Valores de concentrações inibitórias mínimas, média geométrica e perfil de susceptibilidade aos antifúngicos *in vitro* de isolados do complexo *psilosis* oriundos de pacientes com fungemia que estavam internados em três hospitais no município do Rio de Janeiro entre 1998 e 2006 pelo método

	Vitek <sup>®</sup> 2 (AST Card YS01).....	40
<b>Tabela 5 -</b>	Valores de concentrações inibitórias mínimas, média geométrica e perfil de susceptibilidade aos antifúngicos <i>in vitro</i> de isolados do complexo <i>psilosis</i> oriundos de pacientes com fungemia que estavam internados em três hospitais no município do Rio de Janeiro entre 1998 e 2006 pelo método CLSI (M27-A3).....	42
<b>Tabela 6 -</b>	Valores de concentrações inibitórias mínimas, média geométrica e percentual de concordância essencial pelos métodos Etest <sup>®</sup> e Vitek <sup>®</sup> 2 (AST Card YS01) em comparação ao CLSI (M27-A3) de 53 isolados do complexo <i>psilosis</i> oriundos de pacientes com fungemia que estavam internados em três hospitais no município do Rio de Janeiro entre 1998 e 2006.....	44
<b>Tabela 7 -</b>	Coeficiente de correlação intraclasse (CCI) comparando os valores de concentrações inibitórias mínimas obtidos pelo Etest <sup>®</sup> em relação ao método CLSI (M27-A3) de <i>C. parapsilosis stricto sensu</i> e <i>C. orthopsilosis</i> .....	46
<b>Tabela 8 -</b>	Coeficiente de correlação intraclasse (CCI) comparando os valores de concentrações inibitórias mínimas obtidos pelo Vitek <sup>®</sup> 2 (AST Card YS01) em relação ao método CLSI (M27-A3) de <i>C. parapsilosis stricto sensu</i> e <i>C. orthopsilosis</i> .....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5-FC	5-fluocitosina
ABC	- <i>ATP Binding Cassete</i>
ANF	- Anfotericina B
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
ATP	- Adenosina Trifosfato
CC	- Concordância categórica
CCI	- Coeficiente de correlação intraclasse
CDR	- <i>Candida Drug Resistance</i>
CE	- Concordância essencial
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
CLSI	- <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
dATP	- Deoxi-Adenosina Trifosfato
dCTP	- Deoxi-Citosina Trifosfato
dGTP	- Deoxi-Guanidina Trifosfato
DNA	- Ácido Desoxiribonucléico
dNTP	- Deoxi-Nucleotídeo Trifosfato
dTTP	- Deoxi-Timidina Trifosfato
ECV	- <i>Epidemiology cutoff value</i>
EDTA	- <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
Elisa	- <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ERG	- <i>Ergosterol Biosynthetic Enzymes</i>
Fiocruz	- Fundação Oswaldo Cruz
FKS	- <i>Glucan synthase genes</i>
FLU	- Fluconazol
Ipec	- Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
ITR	- Itraconazol

ITS	- <i>Internal Transcribed Spacer</i>
MDR	- <i>Multidrug Resistance</i>
MFS	- <i>Major Facilitators Superfamily</i>
MG	- Média Geométrica
MLST	- <i>Multilocus Sequence Typing</i>
NR	- Não realizado
PCR	- <i>Polimerase Chain Reaction</i>
R	- Resistente
RNA	- Ácido Ribonucléico
RPMI	- <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
S	- Susceptível
SDD	- Susceptível dependente da dose
SPSS	- <i>Statistical Package for the Social Science</i>
TBE	- Tris borato-EDTA
Tris	- Tris (Hidroximetil) Aminometano
UV	- Ultravioleta
V	- Volts
VRZ	- Voriconazol

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1	INFECÇÕES FÚNGICAS INVASIVAS POR <i>Candida</i> SPP.....	01
1.2	<i>Candida parapsilosis</i> .....	03
1.3	COMPLEXO <i>Candida parapsilosis</i> .....	05
1.4	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	07
1.5	FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS.....	11
1.6	MECANISMOS DE AÇÃO E RESISTÊNCIA.....	13
1.7	TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS.....	15
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	18
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	19
3.1	OBJETIVO GERAL.....	19
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	20
4.1	ISOLADOS CLÍNICOS.....	20
4.2	CEPAS DE REFERÊNCIA.....	20
4.3	CONFIRMAÇÃO FENOTÍPICA.....	20
<b>4.3.1</b>	<b>Reisolamento e identificação cromogênica</b> .....	20
<b>4.3.2</b>	<b>Identificação bioquímica</b> .....	21
4.3.2.1	Sistema API <sup>®</sup> 20 C AUX.....	21
4.3.2.3	Sistema Vitek <sup>®</sup> 2 para a identificação de leveduras (YST <i>Card</i> ).....	21
4.4	PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS.....	22
4.5	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	22
<b>4.5.1</b>	<b>Extração do DNA genômico</b> .....	22

4.5.2	PCR com <i>primers</i> espécie-específicos.....	23
4.5.3	Amplificação e Sequenciamento da região D1/D2 do rDNA.....	24
4.6	TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS.....	25
4.6.1	Etest <sup>®</sup> .....	25
4.6.2	Sistema Vitek <sup>®</sup> 2 para teste de susceptibilidade aos antifúngicos (AST Card YS01).....	26
4.6.3	Método da microdiluição em caldo pelo CLSI (M27-A3)..	28
4.7	ANÁLISE DE RESULTADOS.....	32
5	RESULTADOS.....	34
5.1	IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DO COMPLEXO <i>psilosis</i> .....	34
5.1.1	Características macromorfológicas das leveduras.....	34
5.1.2	Identificação bioquímica.....	34
5.1.3	Identificação molecular.....	36
5.2	SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS.....	37
5.2.1	Etest <sup>®</sup> .....	38
5.2.2	Vitek <sup>®</sup> 2.....	39
5.2.3	Microdiluição em caldo pelo CLSI (M27-A3).....	41
5.2.4	Comparação entre os métodos Etest <sup>®</sup> , Vitek <sup>®</sup> e CLSI (M27-A3).....	42
6	DISCUSSÃO.....	48
7	CONCLUSÕES.....	57
	REFERÊNCIAS.....	58
	APÊNDICES.....	80
	APÊNDICE A- Quadro de identificação dos testes fenotípicos e moleculares do complexo <i>psilosis</i> .....	81

APÊNDICE B- Quadro de resultados das CIMs ( $\mu\text{g/mL}$ ) para os testes de susceptibilidade aos antifúngicos.....	84
<b>ANEXOS</b> .....	90
ANEXO A- Intervalo de concentração inibitória mínima para os diferentes fármacos antifúngicos frente às cepas de referência de <i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019) e <i>C. krusei</i> (ATCC 6258).....	91
ANEXO B- Critérios de interpretação para testes de susceptibilidade aos antifúngicos de <i>Candida</i> spp.....	92

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 INFECÇÕES FÚNGICAS INVASIVAS POR *Candida* spp.

Entre as infecções fúngicas invasivas, é importante destacar a relevância clínica dos casos de infecções de corrente sanguínea por *Candida* spp., complicação esta conhecida como candidemia (COLOMBO, 2000). Um episódio de candidemia é definido quando pelo menos uma hemocultura é positiva para espécies de *Candida* cuja amostra de sangue foi obtida de paciente com sinais e sintomas de septicemia (febre, hipotensão, leucocitose) e sem evidências de comprometimento de órgãos internos (ASCIOGLU *et al.*, 2002).

A incidência de infecções hematogênicas por *Candida* spp. em pacientes adultos e pediátricos tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, principalmente em unidades de terapia intensiva e/ou de assistência a pacientes críticos. O aumento na frequência dessas infecções tem sido observado, particularmente, entre pacientes hospitalizados por períodos prolongados e que foram submetidos a antibióticos de amplo espectro, terapia imunossupressora, cateter venoso central, nutrição parenteral e procedimentos médicos invasivos (PFALLER; DIEKEMA, 2007; PÉMAN *et al.*, 2011).

O custo decorrente do atendimento a esses pacientes é elevado, assim como a taxa de mortalidade atribuída à candidemia, sendo esta dependente de uma série de fatores como, por exemplo, a gravidade da doença de base, a espécie de *Candida* envolvida, o tempo para o diagnóstico definitivo e a escolha do agente antifúngico para o tratamento (GUDLAUGSSON *et al.*, 2003; MORGAN *et al.*, 2005b; SMITH *et al.*, 2007; HASSAN *et al.*, 2009).

Infecções hematogênicas causadas por *Candida* spp. podem ser adquiridas por via endógena, pela translocação do patógeno através do trato gastrointestinal, local onde há rica colonização pelo microrganismo em até 70% da população normal, ou via exógena, através do contato das mãos de profissionais de saúde com pacientes portadores de cateteres vasculares em posição central, implante de próteses contaminadas, bem como pela administração parenteral de soluções contaminadas (NUCCI; ANAISSE, 2001; COLOMBO *et al.*, 2003; BRITO *et al.*, 2006; PFALLER; DIEKEMA, 2007).

A epidemiologia da candidemia tem sido estudada nos Estados Unidos, Europa e em alguns países da América do Sul. A distribuição de *Candida* spp. apresenta variações tanto entre países, estados e cidades, bem como entre hospitais. A maioria dos episódios de candidemia é causada por *C. albicans* (PFALLER *et al.*, 2001; PAPPAS *et al.*, 2003; SILVA;

DIAZ; FEBRE, 2004; TORTORANO *et al.*, 2004; 2006; ALMIRANTE *et al.*, 2005; RODERO *et al.*, 2005; COLOMBO *et al.*, 2006; BORG-VON ZEPELIN *et al.*, 2007; PFALLER; DIEKEMA., 2007; HORN *et al.*, 2009; CÓRDOBA *et al.*, 2011). No entanto, infecções oportunistas por espécies de *Candida* não-*albicans* têm sido descritas. As principais espécies de importância médica são: *C. parapsilosis lato sensu*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae* (BODEY *et al.*, 2002; PFALLER; DIEKEMA; MENDEZ, 2006; MEDEIROS *et al.*, 2007; CELEBI *et al.*, 2008). Entretanto, espécies emergentes de *Candida* têm sido isoladas como *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. novyensis*, *C. inconspicua*, *C. haemulonii* entre outras (HAZEN; HOWELL, 2007; KIM *et al.*, 2011).

Na América do Norte e Europa, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* constituem as espécies não-*albicans* mais comumente isoladas. A emergência de *C. glabrata* nos Estados Unidos e em muitos países da Europa têm sido muito bem documentada e entre as espécies não-*albicans* ocupa o segundo lugar, com frequência em torno de 26 a 29% dos casos (DE LUCA *et al.*, 2012; LOCKHART *et al.*, 2012).

O padrão de distribuição de *Candida* spp. na América do Sul se diferencia dos citados em outros países, embora poucos estudos prospectivos tenham sido desenvolvidos neste continente. Em relação às infecções hematogênicas por *Candida* spp. no Brasil, *C. albicans* foi a espécie mais isolada, seguida de *C. tropicalis* e/ou *C. parapsilosis*, sendo *C. glabrata* a espécie menos frequente (COLOMBO *et al.*, 2006; CHANG *et al.*, 2008; GUIMARÃES *et al.*, 2012). Porém, a incidência de *C. glabrata* aumentou significativamente entre 2006 e 2010 (variando de 4,8 a 23,5%) segundo estudo conduzido num hospital universitário de referência na região sudeste do Brasil (MORETTI *et al.*, 2012). No Chile, um estudo retrospectivo realizado em 13 hospitais mostrou que *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foram novamente as espécies mais frequentes entre as não-*albicans*, seguida de *C. glabrata* (SILVA; DIAZ; FEBRE, 2004). Na Argentina, um estudo nacional tendo como foco as leveduras isoladas de fungemia também revelou o mesmo padrão de distribuição de *Candida* spp. No entanto, espécies menos comuns como *C. viswanathii*, *C. haemulonii*, *C. inconspicua* e *C. fermentati* foram isoladas em menor frequência (CÓRDOBA *et al.*, 2011).

A epidemiologia da candidemia varia geograficamente e ressalta a importância e a necessidade de uma vigilância contínua para monitorar a incidência, a distribuição e os perfis de susceptibilidade aos antifúngicos de *Candida* spp. (COLOMBO *et al.*, 2006; CÓRDOBA *et al.*, 2011).

## 1.2 *Candida parapsilosis*

*Candida parapsilosis* foi isolada pela primeira vez, em 1928, por Ashford, a partir de fezes de um paciente com diarreia, em Porto Rico, sendo classificada como uma espécie de *Monilia* que era incapaz de fermentar maltose (ASHFORD *et al.*, 1928). A espécie foi nomeada *Monilia parapsilosis* para diferenciar de outra espécie, *Monilia psilosis*, hoje conhecida como *C. albicans*. Embora inicialmente considerada não patogênica, em 1940, *C. parapsilosis* foi identificada como o agente responsável por um caso fatal de endocardite, em um paciente usuário de droga intravenosa (JOACHIM; POLAYES, 1940).

*C. parapsilosis* é uma levedura ubíqua no meio ambiente, podendo ser isolada não só de solo, ambientes marinhos e plantas, mas também de superfícies mucosas de humanos e demais mamíferos (LUPETTI *et al.*, 2002). Possui a capacidade de colonizar a pele humana, proliferar em soluções ou emulsões contendo basicamente carboidratos, aminoácidos, lipídios e vitaminas, e de aderir a superfícies plásticas. Pode se tornar patogênica, caso ocorra alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou o comprometimento de barreiras anatômicas da pele, secundariamente à queimadura ou a procedimentos médicos invasivos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; DIGNANI; SOLOMKIM; ANAÏSSE, 2003; ALMIRANTE *et al.*, 2006; KUMAR; MENON, 2006; TROFA; GÁCSEK; NOSANCHUK, 2008).

Caracteriza-se morfologicamente por células leveduriformes ovais, arredondadas ou cilíndricas. Em agar de Sabouraud dextrose, suas colônias são brancas, cremosas, brilhantes, lisas ou enrugadas. *C. parapsilosis* não forma hifas verdadeiras, mas se apresenta na forma leveduriforme ou de pseudohifas. Os fenótipos das colônias dependem da morfologia de *C. parapsilosis*. Células leveduriformes exibem fenótipos lisos ou em forma de cratera, enquanto que pseudohifas apresentam fenótipos concêntricos ou de aspecto rendado (KIM; EL BISSATI; MANOUN, 2006; LAFFEY; BUTLER, 2006).

*C. parapsilosis* é uma espécie de fungo oportunista que tem emergido como um patógeno nosocomial causando infecções com manifestações clínicas que incluem fungemia, endocardite, endoftalmite, artrite, peritonite, meningite, otomicoses, onicomioses, vulvovaginites e infecções de trato urinário. Todas as quais ocorrem normalmente em associações a procedimentos médicos invasivos ou a dispositivos protéticos e devido à prévia terapia antifúngica (TROFA; GÁCSEK; NOSANCHUK, 2008; van ASBECK *et al.*, 2009).

A incidência de *C. parapsilosis* tem aumentado, significativamente, nas últimas décadas, sendo a segunda espécie mais isolada de infecções fúngicas hematogênicas principalmente na Europa e na América Latina. Em alguns hospitais infantis, *C. parapsilosis* tem se tornado a espécie predominante em candidemia, sendo a mais frequente em infecções da corrente sanguínea de recém-nascidos (GODOY *et al.*, 2003; PFALLER *et al.*, 2005; ALMIRANTE *et al.*, 2006; COLOMBO *et al.*, 2006).

A infecção fúngica invasiva causada por *C. parapsilosis* pode ocorrer sem colonização prévia e é frequentemente transmitida horizontalmente, via fontes externas contaminadas tais como dispositivos médicos, fluidos ou soluções, as mãos dos profissionais de saúde, dispositivos protéticos e cateteres (TROFA; GÁCSEK; NOSANCHUK, 2008).

Vários estudos indicam que o uso prolongado de cateter venoso em posição central e a nutrição parenteral aumentam os riscos para infecções invasivas por *C. parapsilosis*, além disso, o tempo prolongado de internação e o fato desses pacientes serem manuseados por um grande número de pessoas aumentam a probabilidade de infecção. Outra característica marcante dessa levedura é a capacidade de formar biofilme em dispositivos médico-cirúrgicos o que facilita a sua penetração no hospedeiro e influencia muito na sua disseminação hospitalar (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; KUHN *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2006; TROFA; GÁCSEK; NOSANCHUK, 2008; CONDE-ROSA *et al.*, 2010).

A patogenicidade de *C. parapsilosis* na infecção fúngica invasiva é facilitada pela presença de alguns fatores de virulência. Os mais importantes são aderência às células epiteliais e endoteliais do hospedeiro, formação de biofilme e secreção de enzimas hidrolíticas, tais como peptidases e lipases. Apesar de intensa pesquisa para identificar fatores associados à patogênese nos fungos, particularmente, em *C. albicans*, pouco se conhece sobre os fatores de virulência de *C. parapsilosis* (DAGDEVIREN; CERIKCIOGLU; KARAVUS, 2005; TROFA; GÁCSEK; NOSANCHUK, 2008).

A produção de biofilme constitui um importante fator de virulência para algumas espécies de *Candida*, conferindo maior resistência à terapia antifúngica, por limitar a penetração dos agentes antifúngicos através da matriz extracelular, protegendo as células fúngicas da resposta imune do hospedeiro. *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* são algumas espécies produtoras de biofilme. A formação de biofilme é precedida pela aderência do fungo aos tecidos ou aos dispositivos médicos. *C. parapsilosis* pode formar biofilme em diversos dispositivos médicos, incluindo cateter venoso central e periférico, cateter de hemodiálise e de diálise peritoneal, dispositivos protéticos para lesões intracardíacas e articulações protéticas. A colonização inicial do cateter, muitas vezes é decorrente da

manipulação do mesmo pelos próprios profissionais de saúde, já que *C. parapsilosis* é um microrganismo comensal da pele humana (KUMAR; MENON, 2004; RAMAGE; MARTINEZ; LÓPEZ-RIBOT, 2006; TUMBARELLO *et al.*, 2007).

O papel das peptidases e lipases na patogenicidade de *C. parapsilosis* ainda não está totalmente elucidado (DAGDEVIREN; CERIKCIOGLU; KARAVUS, 2005).

Sabe-se que as proteinases são importantes determinantes de virulência para *C. albicans*. As asparto-proteinase secretadas (Saps) são responsáveis pela adesão e pelo dano tecidual tendo como consequência a degradação de proteínas estruturais e imunológicas, tais como as cadeias pesadas das imunoglobulinas G, proteína C3, colágeno e fibronectina (PICHOVA *et al.*, 2001).

As fosfolipases têm como função a degradação dos fosfolipídios que são os principais componentes de todas as membranas celulares e, juntamente com as proteinases, facilitam a invasão dos tecidos do hospedeiro, durante o processo de infecção (RUCHEL *et al.*, 1992; GHANNOUM, 2000; KANTARCIOGLU; YUSEL, 2002). A ausência ou a baixa expressão dessas enzimas pode indicar uma espécie de *Candida* menos virulenta, quando comparada com uma espécie de *Candida* com alta expressão dessas enzimas (BORST; FLUIT, 2003; DAGDEVIREN; CERIKCIOGLU; KARAVUS, 2005).

As lipases extracelulares têm sido consideradas como potentes fatores de virulência de *C. albicans*. Suas possíveis funções incluem a digestão de lipídios para obtenção de nutrientes, adesão às células e tecidos do hospedeiro, interações sinérgicas com outras enzimas, hidrólise inespecífica, iniciação de processos inflamatórios por afetar células do sistema imune e autodefesa (STEHR *et al.*, 2004; SCHALLER *et al.*, 2005). As lipases extracelulares produzidas por *C. parapsilosis* possivelmente favorecem o seu crescimento em soluções lipídicas. Este dado é importante, pois infecções invasivas por *C. parapsilosis* frequentemente ocorrem em pacientes recém-nascidos de baixo peso que recebem nutrição parenteral rica em lipídios (GÁCSEK *et al.*, 2007).

### 1.3 COMPLEXO *Candida parapsilosis*

Isolados de *C. parapsilosis* são fenotipicamente indistinguíveis, mas geneticamente heterogêneos. Estudos anteriores, baseados na análise da amplificação randômica de DNA polimórfico (RAPD) (LEHMANN *et al.*, 1992), na eletroforese de enzimas multilocus e no

sequenciamento da região intergênica (ITS) do rDNA (LIN *et al.*, 1995), na morfotipagem (CASSONE *et al.*, 1995), na análise da relação de parentesco ao nível de DNA (ROY; MEYER, 1998), na sequência de genes da DNA topoisomerase II (KATO *et al.*, 2001), na hibridização com uma sonda de oligonucleotídeos Cp3-13 para DNA *fingerprinting* (ENGER *et al.*, 2001), na análise das diferenças na sequência do DNA mitocondrial (NOSEK *et al.*, 2002), e no polimorfismo de nucleotídeo único (FUNDYGA *et al.*, 2004), demonstraram que *C. parapsilosis* formava um complexo composto de três grupos geneticamente distintos, nomeados I, II e III.

Tavanti *et al.* (2005), baseados na tipagem da sequência multilocus (MLST), sugeriram que os grupos II e III de *C. parapsilosis* constituíssem novas espécies, sendo nomeadas *Candida orthopsilosis* e *Candida metapsilosis*, respectivamente, mantendo o grupo I como *C. parapsilosis stricto sensu*. Assim, o complexo *C. parapsilosis* ou *psilosis* passou a ser formado por *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. Até o momento, a distinção entre as três espécies só é possível por meio de análises moleculares (TAVANTI *et al.*, 2005).

Um estudo realizado numa coleção de *C. parapsilosis* isoladas em vários hospitais na Itália demonstrou que 4,5% das infecções/colonizações atribuídas a *C. parapsilosis lato sensu*, na verdade, eram causadas por *C. orthopsilosis* (TAVANTI *et al.*, 2007).

*C. parapsilosis stricto sensu* é a espécie predominante entre os isolados clínicos de pacientes com infecções hematogênicas (KOCSUBE *et al.*, 2007; GOMÉZ-LOPEZ, 2008a; SILVA *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2010; CANTÓN *et al.*, 2011; de TORO *et al.*, 2011). Isto pode ser parcialmente explicado devido a sua capacidade de formar biofilme ou pode estar associado a sua natureza ubíqua, já que pode ser isolada de diferentes fontes ambientais (LEVIN *et al.*, 1998; TUMBARELLO *et al.*, 2007). No entanto, a proporção de isolados representados por *C. orthopsilosis* em infecções fúngicas associadas ao complexo *psilosis* vem aumentando nos últimos anos (LOCKHART *et al.*, 2008; CANTÓN *et al.*, 2011). *C. metapsilosis*, embora menos virulenta do que as outras duas espécies (ORSI; COLOMBARI; BLASI, 2010) apresentam proporções que variam de acordo com a área geográfica e com o espécime clínico analisado (DIEKEMA *et al.*, 2009).

Lockhart *et al.* (2008) demonstraram em um estudo sobre a distribuição geográfica e a susceptibilidade aos antifúngicos das duas novas espécies descritas do complexo *psilosis* em comparação a espécie *C. parapsilosis stricto sensu*, que a proporção de isolados de *C. orthopsilosis* variou entre continentes, sendo 10,9% na América do Sul e 0,7% na África, 5,0% na América do Norte e 8% na Europa. Em relação a *C. metapsilosis*, a Polônia teve o

maior percentual (13,8%), enquanto que na Austrália o percentual foi de 6,8%. Já na Ásia o percentual de *C. metapsilosis* diminuiu (2,6%), sendo ainda menor na América do Sul (1,7%).

Um estudo realizado na Espanha envolvendo 345 casos de infecções hematogênicas por *Candida* spp. revelou 87 isolados do complexo *psilosis*. Destes, 87,4% foram *C. parapsilosis stricto sensu*, 5,7% foram caracterizados como *C. orthopsilosis* e 6,9% como *C. metapsilosis*. De todos os casos de candidemia registrados neste estudo, as taxas de prevalência de *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, representaram 1,4% (5/345) e 1,7% (6/345), respectivamente, representando entre a quinta e sexta espécie mais isolada neste estudo (GOMEZ-LOPEZ *et al.*, 2008a). Outro estudo desenvolvido na Espanha, incluindo 44 hospitais e 364 isolados do complexo *psilosis*, demonstrou a presença de *C. parapsilosis stricto sensu* (90,7%), *C. orthopsilosis* (8,2%) e *C. metapsilosis* (1,1%). *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* não foram isoladas de pacientes neonatos. *C. metapsilosis* foi isolada de pacientes adultos e idosos (CANTÓN *et al.*, 2011).

Em Portugal, *C. parapsilosis stricto sensu* foi a espécie mais isolada (91,4%), seguida de *C. metapsilosis* (2,9%) e *C. orthopsilosis* (2,3%). Interessantemente, todos os isolados de sangue corresponderam a *C. parapsilosis stricto sensu*. Enquanto que *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* foram isoladas de outras amostras biológicas como urina, mucosas superficiais e trato respiratório (SILVA *et al.*, 2009).

No Brasil, foi realizado um estudo envolvendo 141 isolados de hemocultura obtidos entre 2003-2004 sendo identificados como *C. parapsilosis lato sensu*. De acordo com a caracterização molecular do complexo *psilosis*, a prevalência das espécies foi de 88% para *C. parapsilosis*, 9% para *C. orthopsilosis* e 3% para *C. metapsilosis* (GONÇALVES *et al.*, 2010). Outro estudo brasileiro, envolvendo 152 isolados de hemocultura obtidos durante 1997-2011, demonstrou que *C. parapsilosis stricto sensu* (90,8%) foi a espécie mais isolada, seguida de *C. orthopsilosis* (8,6%) e *C. metapsilosis* (0,6%) (BONFIETTI *et al.*, 2012).

## 1.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Infecções invasivas por *Candida* spp. são importantes causas de morbidade e mortalidade, portanto, um diagnóstico precoce e rápido é fundamental para a introdução de terapêutica antifúngica adequada (EGGIMANN *et al.*, 2011). O diagnóstico laboratorial de

candidíase invasiva tem sido problemático, pois os sinais e sintomas são inespecíficos, o que dificulta o diagnóstico clínico (ELLEPOLA; MORRISON, 2005).

Classicamente, o diagnóstico definitivo das infecções por *Candida* spp. é feito com base no isolamento do fungo em cultura. Este método é considerado padrão ouro para o diagnóstico de uma infecção fúngica, embora apresente baixa sensibilidade em relação às infecções hematogênicas pelo gênero *Candida* (BERENGUER *et al.*, 1993; BARNES; MARR, 2007; PEMÁN; ALMIRANTE, 2008; GUERY *et al.*, 2009).

Mesmo após a implementação de sistemas automatizados de hemocultura (BD Bactec™ e BacT/ALERT®) (HORVATH *et al.*, 2004), o diagnóstico das infecções fúngicas invasivas permanece um desafio por vários motivos. As leveduras são colonizadores comuns da mucosa humana, sendo difícil distinguir um fungo patogênico de um comensal. Só o isolamento do fungo no espécime clínico não estéril não indica um estado infeccioso (LARONE, 2002; ANAISSE; MCGINNIS; PFALLER, 2003). Além disso, a presença de bactérias crescendo rapidamente pode mascarar a presença do fungo no espécime clínico. Estima-se que 27% das infecções hematogênicas nosocomiais sejam polimicrobianas; *Staphylococcus aureus* é um dos microorganismos que pode ser isolado em conjunto com *C. albicans* (KLOTZ *et al.*, 2007). Outro fator importante que pode influenciar nos métodos de cultivo é o tratamento prévio ou empírico de pacientes de alto risco com fármacos antifúngicos que podem inibir o crescimento do fungo (BARNES; MARR, 2007).

Métodos de identificação fenotípica de *Candida* spp. isoladas em cultura são baseados nas suas características macro e micromorfológicas, bem como no seu perfil bioquímico através da assimilação de fontes de carbono e nitrogênio e fermentação de açúcares (ELLEPOLA; MORRISON, 2005). Macromorfolologicamente, essas leveduras apresentam colônias brancas a cremes, aspecto cremoso ou membranoso, superfície lisa ou enrugada, brilhante ou opaca. Microscopicamente, apresentam hifas verdadeiras e/ou pseudo-hifas, sendo que o arranjo e a disposição dos blastoconídios auxiliam na identificação das espécies (DIGNANI; SOLOMKIN; ANAISSE, 2003). Sistemas comerciais de fácil execução e interpretação desenvolvidos através da capacidade assimilativa em substratos bioquímicos e enzimáticos como API® 20 C AUX, Vitek® 2, RapID Yeast® Plus panel, entre outros, podem ser utilizados nos laboratórios de microbiologia clínica para a identificação rápida de *Candida* spp. (FREYDIERE *et al.*, 2001; ELLEPOLA; MORRISON, 2005).

Meios cromogênicos como CHROMagar® *Candida* (BD Difco), Candida® ID2 (bioMérieux), Hicrome® *Candida* (HiMedia) entre outros são eficazes na detecção e identificação de algumas leveduras do gênero *Candida* como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C.*

*krusei* e *C. glabrata* (ERASO *et al.*, 2006; SIVAKUMAR *et al.*, 2009).

Testes sorológicos têm sido desenvolvidos para o diagnóstico precoce da candidíase invasiva com base na detecção de diversos componentes fúngicos liberados durante a infecção e na resposta de anticorpos produzidos contra eles (PONTÓN; PALACIO, 2007).

A manana e a enolase são provavelmente os antígenos mais imunogênicos de *Candida* spp. A detecção de antígeno de manana pode ser realizada com um kit comercial conhecido como Platelia *Candida* Ag (Bio-Rad). Porém, esse antígeno está em baixa concentração sérica em pacientes com candidemia, dificultando a sua detecção. Esta prova se baseia num ensaio imunoenzimático (Elisa) que detecta resíduos de manose unidas por enlaces  $\alpha$  ( $\alpha$ -Man) com uma baixa sensibilidade (69%), porém com uma especificidade alta de 98%. A combinação desta prova com um Elisa, que detecta manoses unidos por enlaces  $\beta$  ( $\beta$ -Man), demonstrou uma sensibilidade diagnóstica maior (85%) e uma especificidade de 95% (SENDID *et al.*, 2004). A detecção de anticorpos anti-enolase pode ser realizada com o kit comercial Elisa *Candida* enolase IgG (laboratório Vircell, Granada, Espanha) com uma sensibilidade de 81% e uma especificidade de 83,9%, para diagnosticar candidíase invasiva (LAÍN *et al.*, 2007). As  $\beta$ -(1-3)-D-glucanas são componentes não antigênicos da parede celular da maioria dos fungos, incluindo *Candida*. Apresentam níveis de sensibilidade e especificidade de 69,9% e 87,1%, respectivamente (OSTROSKY-ZEICHNER *et al.*, 2005). A detecção de  $\beta$ -(1-3)-D-glucanas também é de interesse para o diagnóstico de candidemia associada à formação de biofilme, em cateteres produzidas por *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Durante essa formação, grandes quantidades de  $\beta$ -(1-3)-D-glucanas são liberadas e podem ser detectadas pelo kit comercial Fungitest<sup>®</sup> (Sanofi) (NETT *et al.*, 2007).

Métodos moleculares podem ser utilizados como instrumentos de diagnóstico laboratorial precoce das candidíases invasivas, com resultados promissores quanto aos valores de sensibilidade e especificidade, em relação às culturas, além de possuir acurada capacidade de identificação de *Candida* spp. em amostras clínicas (ATKINS; CLARK, 2004; MOREIRA-OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Genes ribossomais fúngicos são alvos comuns de DNA utilizados em procedimentos para a identificação desses microrganismos a nível de espécie através da reação em cadeia da polimerase (PCR). A grande variabilidade das sequências ITS1 e ITS2 associadas com as regiões conservadas 18S, 5,8S e 28S do DNA ribossômico (rDNA) têm sido utilizadas na PCR, em diferentes formatos, para a discriminação e identificação de leveduras (CHEN *et al.*, 2000; 2001), assim como a região D1/D2 da subunidade do rDNA (28S) (LINTON *et al.*, 2007).

Buchman *et al.* (1990) foram os primeiros a demonstrar que a detecção de *C. albicans* em amostras clínicas era possível através da técnica da PCR de uma sequência do gene que codifica a enzima lanosterol- $\alpha$ - demetilase (L1A1) (BUCHMAN *et al.*, 1990). A partir daí, diferentes métodos de PCR têm sido aplicados para o diagnóstico e identificação de fungos patogênicos invasivos. Esses métodos, incluem PCR panfungal (van BURIK *et al.*, 1998), Nested PCR (BOUGNOUX *et al.*, 1999), PCR multiplex (CHANG *et al.*, 2001), PCR em tempo real (MAAROFI *et al.*, 2004), PCR transcriptase reversa (LUO *et al.*, 2004), entre outros.

Um estudo desenvolvido com PCR multiplex, tendo como alvo a região ITS envolvendo a combinação de *primers* universais e *primers* espécie-específicos numa única reação foi capaz de identificar oito espécies de *Candida* de relevância clínica: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* e *C. dubliniensis* (CARVALHO *et al.*, 2007).

Leveduras de importância clínica mostram diferenças espécie-específicas em relação à susceptibilidade aos fármacos antifúngicos, portanto uma identificação rápida e acurada do patógeno é essencial. A identificação molecular, empregando a amplificação por PCR e o sequenciamento das regiões genômicas que são altamente conservadas, representa uma alternativa rápida e sensível para a identificação convencional de leveduras e também é útil para estabelecer relações filogenéticas (CHEN *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2001; LINTON *et al.*, 2007; BORMAN *et al.*, 2010).

Asadzadeh *et al.* (2009) desenvolveram um método simples e rápido baseado na PCR, onde foram empregados *primers* espécie-específicos, tendo como gene alvo a região ITS1 e ITS2. Esse método foi utilizado para a identificação de *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. Para confirmação dos resultados encontrados, também foi utilizado uma associação da técnica de PCR com uma digestão enzimática de fragmentos de restrição gerados (PCR-RFLP) a partir de uma sequência de nucleotídeos do gene SADH e o sequenciamento da região ITS e das regiões D1/D2 do rDNA 28S. Todos os métodos confirmaram a identificação de *C. parapsilosis stricto sensu* e *C. orthopsilosis*. Nenhum isolado de *C. metapsilosis* foi encontrado neste estudo (ASADZADEH *et al.*, 2009).

## 1.5 FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS

Os fármacos antifúngicos para tratamento das micoses sistêmicas são: anfotericina B (e sua forma liposomal), fluocitosina, itraconazol, fluconazol, derivados triazólicos de segunda geração (voriconazol, posaconazol, ravuconazol) e, dentre as equinocandinas, a caspofungina (ANAISSE, 2008; MENSA; PITART; MARCO, 2008; CORNELLY *et al.*, 2009). Nos hospitais públicos brasileiros são considerados medicamentos essenciais para tratamento das infecções fúngicas invasivas apenas anfotericina B, fluconazol e itraconazol (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Anfotericina B pertence à classe dos poliênicos e possui atividade fungicida. Seu amplo espectro de ação, que inclui a maior parte das espécies patogênicas para o homem, fizeram dela a principal, senão única, alternativa no tratamento das micoses profundas até os anos 90. No entanto, a administração deste fármaco pode ser complicada devido à sua nefrotoxicidade, podendo ser necessária a redução na dose do fármaco administrado ao paciente (WALSH *et al.*, 2002) ou mesmo o término da terapia (MOUDGAL *et al.*, 2005). O risco potencial de toxicidade, especialmente em pacientes com função renal comprometida, levou ao desenvolvimento de formulações lipídicas da anfotericina B com eficácia similar à anfotericina tradicional, porém com nefrotoxicidade reduzida (ADLER-SHOHET; WASKIN; LIEBERMAN, 2001; LINDER *et al.*, 2003).

Flucitosina, também conhecida como 5-fluocitosina (5-FC), é o único fármaco antifúngico pertencente a classe das pirimidinas e seu espectro de ação se limita as leveduras, sendo o seu efeito fungistático (SANGLARD, 2002). A anfotericina B convencional e a fluocitosina podem ser utilizadas no tratamento combinado em infecções do trato urinário e endocardite por *Candida* spp., apesar dessa associação de fármacos ser mais comum no tratamento da criptococose em pacientes aidéticos (PAPPAS *et al.*, 2009).

Fluconazol e itraconazol foram os primeiros fármacos da família dos triazólicos que começaram a ser utilizados no tratamento das candidíases invasivas e de outras infecções fúngicas. Os triazólicos, assim como os imidazólicos (cetoconazol e miconazol), pertencem ao grupo dos azólicos, que são moléculas sintéticas com um anel de cinco carbonos unido a uma cadeia alifática com um grupo fenil. Essas duas famílias de azólicos se distinguem de acordo com o número de átomos de nitrogênio presentes em sua composição química, dois no caso dos imidazólicos e três no caso dos triazólicos. Os azólicos constituem um dos principais avanços terapêuticos da micologia. Fluconazol foi o primeiro antifúngico sistêmico com

toxicidade reduzida e com um excelente perfil farmacocinético, com formulações oral e intravenosa, que eram muito bem toleradas pelos pacientes (GÓMEZ-LOPEZ *et al.*, 2008b; RUIZ-CAMPS; CUENCA-ESTRELLA, 2009; CUENCA-ESTRELLA, 2010a). O itraconazol tem um espectro de ação mais amplo que o fluconazol, sendo ativo frente às leveduras e aos fungos filamentosos. Entretanto, a maioria das leveduras resistentes ao fluconazol acaba desenvolvendo resistência cruzada ao itraconazol (SABATELLI *et al.*, 2006).

Na primeira década do século XXI, dois novos triazólicos de uso sistêmico, voriconazol e posaconazol, começaram a ser comercializados, assim como três moléculas pertencentes à classe das candinas denominadas equinocandinas. Voriconazol foi desenvolvido a partir do fluconazol com a intenção de ampliar seu espectro de ação. É ativo frente à maior parte das leveduras e dos fungos filamentosos. Fungos da ordem Mucorales apresentam resistência intrínseca ao voriconazol (ALASTRUEY-IZQUIERDO *et al.*, 2009). Posaconazol é um azólico de espectro mais amplo, com atividade frente às leveduras, e a vários fungos filamentosos, incluindo os Mucorales (CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 2006).

Os triazólicos como fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol mostram uma afinidade 100 vezes superior pelas enzimas fúngicas do que pelas enzimas humanas, por isso, apresentam menos toxicidade do que os imidazólicos, sendo possível administrar doses mais elevadas (CUENCA-ESTRELLA, 2010a).

Infelizmente, os azólicos têm atividade fungistática frente ao gênero *Candida* e o fenômeno da resistência, em especial ao fluconazol, emerge em algumas espécies como *C. glabrata* e *C. krusei* (PAPPAS; REX, 2004).

As equinocandinas são uma família de fármacos pertencentes à classe das candinas. Seu desenvolvimento começou em 1974, mas a aprovação para uso em seres humanos não chegou antes de 2001, data em que o primeiro fármaco desta classe, a caspofungina, foi licenciada. Estão disponíveis no mercado, além da caspofungina, outras duas equinocandinas com indicações clínicas, a micafungina e a anidulafungina (DENNING, 2002).

## 1.6 MECANISMOS DE AÇÃO E RESISTÊNCIA

O surgimento de novos fármacos antifúngicos tem modificado o tratamento das infecções fúngicas sistêmicas, sendo possível utilizar um fármaco mais eficaz e com menos efeitos colaterais, levando em consideração a espécie envolvida e o seu perfil de

susceptibilidade às drogas. Por isso, o conhecimento dos mecanismos de ação, do perfil de susceptibilidade e dos mecanismos de resistência dos diferentes antifúngicos é importante para a prática clínica diária (CUENCA-ESTRELLA, 2010<sup>a</sup>).

A resistência ao tratamento antifúngico pode estar associada a fatores clínicos e microbiológicos. A resistência clínica ao agente terapêutico pode ser considerada quando uma infecção persiste ao tratamento, apesar da dosagem máxima do fármaco. No entanto, o microrganismo infectante pode apresentar susceptibilidade normal ao agente terapêutico *in vitro*. Isso pode acontecer devido a fatores farmacológicos dos medicamentos em questão, fatores relacionados ao hospedeiro (sistema imune, doença de base associada, uso de dispositivos externos, por exemplo) e fatores fúngicos da espécie causadora da infecção (capacidade de produzir biofilme, sorotipos variáveis, por exemplo). A resistência microbiológica pode ser definida como uma alteração na susceptibilidade fúngica que pode ser medida *in vitro* por métodos laboratoriais adequados. Esta resistência pode ser primária, quando algumas espécies são resistentes a determinados fármacos antifúngicos independente da exposição prévia; ou secundária, após exposição ao fármaco a espécie passa a ser resistente, seja de um modo transitório ou permanente (REX *et al.*, 1997; ESPINEL-INGROFF, 2000; SANGLARD, 2002).

A anfotericina B se liga de forma irreversível ao ergosterol presente na membrana celular fúngica, determinando a formação de canais pelos quais a célula perde íons e moléculas que levam à morte celular (CUENCA-ESTRELLA, 2010a).

A resistência a anfotericina B é pouco frequente, mas se tem detectado amostras de leveduras e de fungos filamentosos com mecanismos de resistência. Estes mecanismos são pouco conhecidos, mas a maior parte deles está relacionada com um decréscimo na quantidade de ergosterol da membrana ou um aumento dos fosfolipídios que reduzem a interação do fármaco com os esteróis. Essas alterações estão associadas com mutações nos genes *ERG2* ou *ERG3*, que codificam enzimas que participam da via de síntese do ergosterol (RUIZ-CAMPS; CUENCA-ESTRELLA, 2009).

A fluocitosina é um análogo fluorado da citosina que se converte em fluoracil no interior da célula. O fluoracil é convertido em 5-acido fluodeoxiuradílico que interfere na síntese de DNA e proteínas do fungo. A resistência intrínseca a flucitosina aparece com frequência nas leveduras e em quase todos os fungos filamentosos. Isto ocorre devido a mutações no gene que codifica a citosina desaminase, enzima responsável pela conversão do antifúngico em fluoracil (SANGLARD, 2002).

A atividade antifúngica dos azólicos reside na capacidade de inibir o citocromo P450 fúngico, através da demetilação da enzima 14- $\alpha$ -demetilase que está envolvida na síntese de ergosterol. Com o bloqueio da síntese de ergosterol, há acúmulo de produtos tóxicos, alteração de permeabilidade da membrana e inibição do desenvolvimento celular fúngico (CUENCA-ESTRELLA, 2010a).

O mecanismo de resistência que se detecta com maior frequência em amostras clínicas de leveduras é a redução da concentração intracelular de azólicos. Esta redução pode ser devido a uma diminuição na captação do fármaco ou, mais frequentemente, a um aumento na expulsão do azólico e na atividade das bombas de efluxo ou transportadores. É um mecanismo de resistência secundária devido à super-expressão dos genes que os regulam. Existem dois tipos de bombas, transportadores ABC (*ATP binding cassette*) e os MFS (*Major Facilitators Superfamily*). Os transportadores ABC se associam com a expulsão de todos os azólicos e, aparentemente, os MFS só se relacionam com a resistência ao fluconazol (DENNING; HOPE, 2010; MORSCHHAUSER, 2010).

Em *C. albicans* e outras espécies de leveduras como *C. glabrata* já foram descritos até dez genes diferentes relacionados com a produção dos transportadores ABC, chamados *CDR1-CDR10*. A resistência aos azólicos é observada em cepas com aumento da expressão dos genes *CDR1* e *CDR2*. As bombas MFS, codificadas pelo genes MDR, usam um gradiente de prótons como fonte de energia, no lugar de ATP, e estão associadas com a resistência secundária ao fluconazol (SANGLARD; ODDS, 2002; MORSCHHAUSER, 2010).

As equinocandinas são fármacos que agem diferentemente de outros antifúngicos já que atuam sobre a 1,3- $\beta$ -glucana-sintetase, enzima necessária para a formação de polímeros de 1,3-  $\beta$ -glucana, um dos componentes da parede celular fúngica. Consequentemente, não afetam a membrana celular do hospedeiro, sendo a tolerância a estes fármacos maior. A inibição desta enzima reduz a síntese de glucano, causando instabilidade osmótica, lise e morte celular (CUENCA-ESTRELLA, 2010a).

As equinocandinas têm efeitos fungicidas nas leveduras e fungistáticos nos fungos filamentosos, e a resistência secundária a estes antifúngicos é baixa (ROMERO *et al.*, 2005; BARBERAN *et al.*, 2008; CUENCA-ESTRELLA, 2010b).

Mutações e substituições de aminoácidos em duas regiões (FKS1 e FKS2) do gene *FKS* que codifica a glucano-sintetase geram resistência às três equinocandinas e estão associadas a fracassos terapêuticos. Há descrições de resistência intrínseca às equinocandinas em espécies que tenham 1,6- $\beta$ -glucana em sua parede, como *Cryptococcus* spp., *Fusarium* spp. e outras espécies, particularmente, pertencentes aos filos Basidiomycota e Zygomycota

(GARCIA-EFFRON *et al.*, 2009; ARENDRUP *et al.*, 2010). *C. parapsilosis stricto sensu* também é menos susceptível às equinocandinas, em especial à caspofungina, do que as espécies *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* (PFALLER *et al.*, 2005, GÓMEZ-LOPEZ *et al.*, 2008a).

## 1.7 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE AOS FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS

Há um consenso na literatura sobre o aumento na incidência das infecções fúngicas invasivas nas últimas décadas e mudanças no espectro de microrganismos causadores dessas infecções devido ao surgimento de espécies emergentes (COLOMBO *et al.*, 2006, DA MATTA *et al.*, 2007).

Métodos para investigar a susceptibilidade *in vitro* aos fármacos antifúngicos foram desenvolvidos a partir do surgimento de espécies resistentes, da disponibilidade de novos fármacos, do aumento do consumo de antifúngicos disponíveis para tratamento e prevenção das infecções fúngicas invasivas e da ocorrência de falhas terapêuticas no tratamento destas infecções (SANGLARD; ODDS, 2002; HOSPENTHAL; MURRAY; RINALDI, 2004; ARIKAM, 2007).

Em 1997, foi publicado um método de referência (M27-A) para testes de diluição em caldo recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para determinação da susceptibilidade aos fármacos antifúngicos de *Candida* spp. (incluindo *C. glabrata*) e *Cryptococcus neoformans* (CLSI, 1997). Em 2002, foram publicados os documentos M27-A2 e M27-S2 que tratam da seleção e preparação dos agentes antifúngicos, da implementação e interpretação dos testes, e do propósito e da implementação dos testes de controle de qualidade (CLSI, 2002a e 2002b). As últimas versões desses documentos foram publicadas em 2008 (M27-A3 e M27-S3) e incluem pontos de corte para as equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina) e para o voriconazol (CLSI, 2008a e 200b).

O parâmetro mais tradicional para avaliar a susceptibilidade aos fármacos antifúngicos é baseado na concentração inibitória mínima (CIM) (CUENCA-ESTRELLA; RODRIGUEZ-TUDELA, 2002). Esta é definida como a menor concentração do fármaco capaz de inibir o crescimento fúngico no teste de susceptibilidade aos antifúngicos por diluição em ágar ou caldo (CLSI, 2002a).

A microdiluição em caldo segundo o documento M27-A3 é o método de referência padronizado pelo CLSI para testar a susceptibilidade aos antifúngicos de leveduras que causam infecções invasivas, como *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans* (CLSI, 2008a). Apresenta boa reprodutibilidade intralaboratorial e interlaboratorial para a avaliação *in vitro* dos testes de susceptibilidade aos antifúngicos (REX *et al.*, 2001; CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 2002; PFALLER *et al.*, 2010), mas é um método muito trabalhoso e que exige habilidade técnica para realização e interpretação dos resultados (GIOLO; ESTIVALET-SVIDZINSKI, 2010).

Métodos comerciais vêm sendo utilizados para minimizar esse problema. Dentre eles podemos citar Etest<sup>®</sup> (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France), YeastOne<sup>®</sup> Y08 (Trek Diagnostic systems Ltd., East Grinstead, England) e o sistema automatizado Vitek<sup>®</sup> 2 (AST Card YS01) (bioMérieux, Inc., Hazelwood, France) (PFALLER *et al.*, 2007b; BORGHI *et al.*, 2010; BOURGEOIS *et al.*, 2010; CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 2010b; BERTOUT *et al.*, 2011).

O Etest<sup>®</sup> é um método comercial capaz de determinar a CIM. Baseia-se num gradiente contínuo de concentrações pré-definidas do antifúngico, que estão impregnadas numa fita plástica de material inerte, que se difunde em meio sólido. É um método rápido e de fácil execução, sendo utilizado nos laboratórios clínicos de rotina. No entanto, a leitura é visual, levando à subjetividade na determinação da CIM. O Etest<sup>®</sup> apresenta boa correlação variando entre 75 e 100% com o método de referência da microdiluição em caldo CLSI (M27-A3), de acordo com a espécie de *Candida* e o fármaco antifúngico testado (ALEXANDER *et al.*, 2007; CLAUDINO *et al.*, 2008; PFALLER *et al.*, 2010).

O sistema Vitek<sup>®</sup> 2 (AST Card YS01) é um método comercial automatizado capaz de determinar a susceptibilidade aos antifúngicos de quatro fármacos antifúngicos (anfotericina B, fluconazol, itraconazol e 5-fluocitosina) frente *Candida* spp. O sistema Vitek<sup>®</sup> 2 (AST Card YS01) consiste num cartão com 64 poços contendo diluições dos quatro agentes antifúngicos sendo necessário, para realização do ensaio, preparar apenas uma suspensão do microrganismo a ser testado e uma diluição. As etapas subsequentes de inoculação, selagem, incubação e leitura do cartão são realizadas pelo equipamento que por análise espectrofotométrica detecta quando o poço apresenta bom crescimento da levedura. Os resultados são validados e interpretados por um software acoplado ao sistema que determina o valor da CIM para cada antifúngico testado (BORGHI *et al.*, 2010; BOURGEOIS *et al.*, 2010; CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 2010).

Segundo CLSI (2008), não há pontos de corte definidos para a anfotericina B até o momento para a interpretação dos resultados dos testes de susceptibilidade aos antifúngicos, mas o que se pode concluir é que quando se obtém um valor de CIM > 1 µg/mL para um isolado de *Candida* spp., é provável que o isolado seja resistente a anfotericina B. Para o fluconazol, flucitosina, itraconazol e voriconazol foram estabelecidos pontos de corte (µg/mL) para *Candida* spp. classificando os isolados clínicos em susceptíveis, susceptíveis dependente da dose, intermediários ou resistentes (**ANEXO A**). Na categoria susceptível dependente da dose, doses mais elevadas do fármaco em questão podem ser requeridas para que ocorra uma resposta clínica (CLSI, 2008b).

Outro método fácil e barato para testar a susceptibilidade aos antifúngicos de leveduras é o teste de disco difusão (M-44A2). Ao contrário da microdiluição em caldo, este método não utiliza variações de concentrações de antifúngicos. O critério de leitura segundo o documento M44-S3 (CLSI, 2009b) é a medida das zonas de inibição do crescimento das leveduras, sendo os microrganismos classificados como susceptíveis, susceptíveis dependente da dose, resistentes ou não susceptível de acordo com o fármaco em questão e o tamanho do halo de inibição. A grande desvantagem desse método é que ele está padronizado apenas para os fármacos fluconazol, voriconazol e caspofungina e somente para *Candida* spp. (CLSI, 2009a).

## 2 JUSTIFICATIVA

A prevalência de *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* associada a episódios de fungemia vem aumentando nos últimos anos no Brasil (SILVA *et al.*, 2009; GONÇALVES *et al.*, 2010; BONFIETTI *et al.*, 2012) e em vários países do mundo (LOCKHART *et al.*, 2008; DIEKEMA *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2010). Desta forma, torna-se necessário monitorar e detectar diferenças no perfil de resposta aos antifúngicos dessas três espécies através de testes de susceptibilidade. Essas diferenças podem influenciar os clínicos na escolha terapêutica para tratamento de infecções fúngicas invasivas causadas por essas espécies (BORGHI *et al.*, 2011; CANTÓN *et al.*, 2011).

Devido às falhas terapêuticas, os testes de avaliação da susceptibilidade aos diferentes fármacos antifúngicos passaram a ter grande importância devido ao aumento das doenças fúngicas invasivas em pacientes imunocomprometidos e, principalmente, à emergência do fenômeno da resistência (PEREA; PATTERSON, 2002).

Estudos anteriores que avaliaram o Etest<sup>®</sup> ou o sistema Vitek<sup>®</sup> 2 em comparação ao método de referência de microdiluição em caldo CLSI (M27-A3) indicaram que há uma boa correlação entre esses métodos para determinar a susceptibilidade aos antifúngicos de várias espécies do gênero *Candida* (SIMS *et al.*, 2006; PFALLER *et al.*, 2007b; CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 2010b; PETERSON *et al.*, 2011). Entretanto, não foram encontrados dados na literatura nacional e internacional sobre o Etest<sup>®</sup> e/ou o sistema Vitek<sup>®</sup> 2 para avaliar a susceptibilidade aos antifúngicos de isolados clínicos do complexo *psilosis*.

Portanto, nossa hipótese foi verificar se esses sistemas comerciais poderiam ser utilizados rotineiramente nos laboratórios de microbiologia clínica para determinação do perfil de susceptibilidade aos antifúngicos do complexo *psilosis* ou não.

Além disso, os dados encontrados neste estudo contribuem para o conhecimento de quais espécies do complexo *psilosis* estavam presentes na nossa amostragem e qual era o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos dessas espécies.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Descrever o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos de amostras do complexo *psilosis* isoladas de pacientes que estavam internados entre 1998 e 2006 com quadro de fungemia em três hospitais no município do Rio de Janeiro.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar as características fenotípicas e bioquímicas dos isolados do complexo *psilosis*;
- Identificar molecularmente esses isolados;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos seguintes fármacos antifúngicos: anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol frente aos isolados clínicos do complexo *psilosis*;
- Comparar dois métodos comerciais, o Etest<sup>®</sup> e o sistema automatizado Vitek<sup>®</sup> 2 (AST Card YS01), com o método de referência de microdiluição em caldo CLSI (M27-A3), na determinação da susceptibilidade aos antifúngicos *in vitro* dos isolados clínicos do complexo *psilosis*.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ISOLADOS CLÍNICOS

Foram incluídos neste estudo 53 isolados do complexo *psilosis* oriundos de amostras de hemocultura. Todos foram obtidos de pacientes com episódios de fungemia que estavam internados em três hospitais localizados no município do Rio de Janeiro entre 1998 e 2006. Vinte isolados foram oriundos do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE), 29 amostras do Hospital dos Servidores do Estado (HSE) e quatro do Hospital Samaritano (HSAM). Os isolados foram identificados por métodos convencionais (CHROMagar<sup>®</sup> *Candida* e API<sup>®</sup> 20 C AUX) (FREYDIERE *et al.*, 2001; SIVAKUMAR *et al.*, 2009) e estavam armazenados a -70°C na Coleção de Fungos Patogênicos do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

### 4.2 CEPAS DE REFERÊNCIA

*C. albicans* (ATCC 18804), *C. tropicalis* (ATCC 13803), *C. krusei* (ATCC 6258) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019) foram utilizadas como controle de qualidade no CHROMagar<sup>®</sup> *Candida*. As duas últimas cepas também foram usadas como controles nos testes de susceptibilidade aos antifúngicos. *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. orthopsilosis* (ATCC 96141) e *C. metapsilosis* (ATCC 96143) foram utilizadas como cepas de referência para os métodos de identificação molecular.

### 4.3 CONFIRMAÇÃO FENOTÍPICA

#### 4.3.1 Reisolamento e identificação cromogênica

Todos os isolados do complexo *psilosis* estocados a -70°C foram semeados tanto no meio ágar batata dextrose (Fluka analytical, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) quanto no CHROMagar<sup>®</sup> *Candida* (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA) ambos pela técnica de esgotamento em placas de Petri (90 mm) para avaliar a viabilidade, pureza, detecção de

culturas mistas e obtenção de colônia isolada. Todas as placas foram incubadas a 35°C por 24-72 horas. A interpretação dos resultados foi baseada no exame macroscópico das colônias e, no caso do CHROMagar<sup>®</sup> *Candida*, de acordo com as orientações do fabricante: verde, *C. albicans*; azul metálico, *C. tropicalis*; rosa, rugosa, *C. krusei*; e branca a rosada, demais espécies.

### 4.3.2 Identificação bioquímica

#### 4.3.2.1 Sistema API<sup>®</sup> 20 C AUX

Após crescimento em ágar Sabouraud dextrose (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA) em tubos de ensaio (12 x 150 mm) com tampas de rosca mantidos à temperatura de 35°C por 24 horas, com auxílio de uma alça de semeadura de 10 µL foi preparada uma suspensão homogênea de levedura numa ampola API<sup>®</sup> NaCl a 0,85% (2 mL) (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France), equivalente ao padrão n° 2 da escala de McFarland. A seguir, uma alíquota de 100 µL dessa suspensão foi transferida para outra ampola denominada API<sup>®</sup> C *Medium* (7 mL) (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France) e homogeneizada por pipetagem. As cúpulas da galeria API<sup>®</sup> 20 C AUX (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France) foram preenchidas com 200 µL da suspensão obtida em API<sup>®</sup> C *Medium* evitando a formação de bolhas. Na sequência, a galeria foi colocada numa caixa de incubação devidamente identificada contendo 5 mL de água destilada estéril para criar uma atmosfera úmida e incubada à temperatura de 30°C por até 72 horas (FREYDIERE *et al.*, 2001). A leitura foi feita por comparação com os controles de crescimento e a identificação por consulta ao catálogo analítico ou um programa de identificação (apiweb<sup>TM</sup>) (Manual do API<sup>®</sup> 20 C AUX, bioMérieux, França).

#### 4.3.2.2 Sistema Vitek<sup>®</sup> 2 para identificação de leveduras (YST *Card*)

Após crescimento em ágar Sabouraud dextrose em tubos de ensaio mantidos à temperatura de 35°C por 24 horas, com auxílio de uma alça de semeadura de 10 µL foi preparada uma suspensão homogênea da levedura em 3 mL de salina estéril a 0,45% em tubos

de ensaio de poliestireno transparente (10 x 75 mm). A densidade óptica dessa suspensão foi verificada por um densitômetro (DensiCheck™, bioMérieux) e ajustada para o padrão nº 2 da escala de McFarland. O tubo da suspensão e o cartão de identificação de leveduras YST Card (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France) foram colocados em estante própria e inseridos no primeiro compartimento do aparelho para que a suspensão de levedura fosse distribuída entre os poços do cartão. Em seguida, foram direcionados ao segundo compartimento do aparelho para a realização das etapas de selagem, incubação a 35,5°C por um período de aproximadamente 18 horas e leitura do cartão (HATA *et al.*, 2007).

#### 4.4 PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS

Após confirmação fenotípica, os isolados clínicos do complexo *psilosis* foram semeados em tubos de ensaio (20 x 200 mm) contendo ágar batata dextrose (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA) e incubados a 35°C por 24-48 h para obtenção de massa celular. Em seguida, foram adicionados 5 mL de *Skim Milk* (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) a 20% e homogeneizado por pipetagem. Alíquotas de 1 mL da suspensão de leveduras foram distribuídas em criotubos de 2,0 mL e mantidas a temperatura de -20°C para posterior uso nos testes de identificação molecular e nos testes de susceptibilidade aos antifúngicos.

#### 4.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

##### 4.5.1 Extração do DNA genômico

Antes da extração do ácido nucleico, os isolados foram descongelados e semeados em placas de Petri (90 mm) contendo o meio ágar Sabouraud dextrose. Após crescimento e partindo de uma colônia isolada, foi realizado um repique neste mesmo meio de cultura e o cultivo foi mantido *overnight* a 35°C para obtenção de massa celular. O DNA genômico da levedura foi extraído usando o kit *Gentra® Puregene® Yeast and G+ Bacteria* (Qiagen®, Maryland, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as leveduras foram lisadas com um detergente aniônico e as proteínas removidas por precipitação salina. O

DNA presente no sobrenadante foi precipitado com etanol 70% (Merck, Darmstadt, Germany) ressuspenso em tampão TE (0,01 M Tris, 0,001M EDTA pH 8), tratado com RNase e quantificado por espectrofotometria (NanoVue Plus™ GE Healthcare). A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão 1 X TBE (0,1 M Tris-HCl pH 8,4; 0,09 M de ácido bórico; 0,001 M EDTA) por aproximadamente 1h sob uma tensão de 90 V. A seguir, o gel foi submerso numa solução de brometo de etídio (Invitrogen™, Carlsbad, CA USA) a uma concentração final de 0,5 µg/mL por 30 min e as bandas visualizadas sob luz ultravioleta (UV) de um transiluminador (HOEFER®, MacroVue UV-20).

#### 4.5.3 PCR com *primers* espécie-específicos

Cada isolado foi submetido a três diferentes pares de *primers* espécie-específicos e a PCR foi realizada utilizando 50 µL (volume final) de mistura da reação (ASADZADEH *et al.*, 2009). Cada reação consistiu em 50 ng de DNA da levedura, em 1 X tampão de PCR (10 mM de Tris-HCl [pH 8,3], KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, Invitrogen™ Brasil), contendo 0,1 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA), 10 pmol de cada par de *primers* (Invitrogen™ Brasil) e 1 U *Platinum® Taq* DNA polimerase (Invitrogen™ Brasil). A PCR foi realizada num termociclador Bio Rad (modelo C 1000) com o seguinte programa: desnaturação inicial durante 5 min a 95°C, seguido por 30 ciclos de desnaturação durante 1 min a 95°C, 30 s de pareamento a 63°C, 1 min de extensão a 72°C, e, em seguida, uma extensão final durante 10 min a 72°C. No equipamento MicroVac™ modelo MV-100, os produtos amplificados da PCR foram concentrados a um volume final de 20 µL. Após a adição de *loading buffer*, na concentração de 1µL de corante para cada 5 µL de produto amplificado, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 1 X a 90 V durante 80 min. Em seguida, o gel foi imerso em uma solução de brometo de etídio (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA) numa concentração final de 0,5 µg/mL durante 30 min, e visualizado sob luz UV de um transiluminador (HOEFER®, MacroVue UV-20).

Os pares de *primers* espécie-específicos utilizados neste estudo estão descritos no **Quadro 1**.

<i>Primers</i>	Gene alvo	Sequência (5' → 3')	Espécie-Específica	Tamanho do Amplicon
CPAF	ITS1	TTTGCTTTGGTAGGCCTTCTA	<i>C. parapsilosis</i>	379 pb
CPAR	ITS2	GAGGTCGAATTTGGAAGAAGT	<i>stricto sensu</i>	
CORF	ITS1	TTTGGTGGCCCACGGCCT	<i>C. orthopsilosis</i>	367 pb
CORR	ITS2	TGAGGTCGAATTTGGAAGAATT		
CMEF	ITS1	TTTGGTGGGCCCACGGCT	<i>C. metapsilosis</i>	374 pb
CMER	ITS2	GAGGTCGAATTTGGAAGAATGT		

**Quadro 1.** *Primers* espécie-específicos utilizados para discriminação molecular do complexo *psilosis* tendo como alvo a região ITS1-5.8S-ITS2 do gene codificador do rDNA. Fonte adaptada: Asadzadeh *et al.* (2009).

#### 4.5.4 Amplificação e Sequenciamento da região D1/D2 do rDNA

A reação de amplificação da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 50 ng do DNA, 1X tampão da PCR (10 mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; Invitrogen™ Brasil), 0,1 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP; Invitrogen™ Carlsbad, CA, EUA), 2,5 U de *Platinum® Taq* DNA polimerase (Invitrogen™ Brasil), e 10 pmol de cada *primer* (Invitrogen™ Brasil) NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (ASADZADEH *et al.*, 2009). A PCR foi realizada nas seguintes condições: um ciclo inicial de 5 min de desnaturação a 95°C, 30 ciclos com 1 min de desnaturação a 95°C, 30 segundos de pareamento a 60°C, extensão de 1 min a 72°C, seguido de uma extensão final de 10 min a 72°C. O produto amplificado obtido foi purificado com o QIAquick® PCR *Purification* Kit (QIAGEN®) de acordo com instruções do fabricante e enviado à Plataforma de Sequenciamento Genômico (ABI-3730/ Applied Biosystems) PDTIS/ Fiocruz, onde foi utilizado como molde de DNA para a reação de sequenciamento de suas duas fitas com o kit comercial *Big Dye Terminator Sequencing* (Applied Biosystems). As sequências foram editadas usando o software *Sequencher* 4.9 e comparadas com as depositadas no banco de dados do NCBI/*GenBank*.

## 4.6 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

Todos os isolados incluídos neste estudo foram submetidos a três testes de susceptibilidade aos antifúngicos: Etest<sup>®</sup>, Sistema Vitek<sup>®</sup> 2 (AST Card YS01) e microdiluição em caldo pelo CLSI (M27-A3). Os fármacos testados foram anfotericina B, fluconazol, voriconazol e itraconazol.

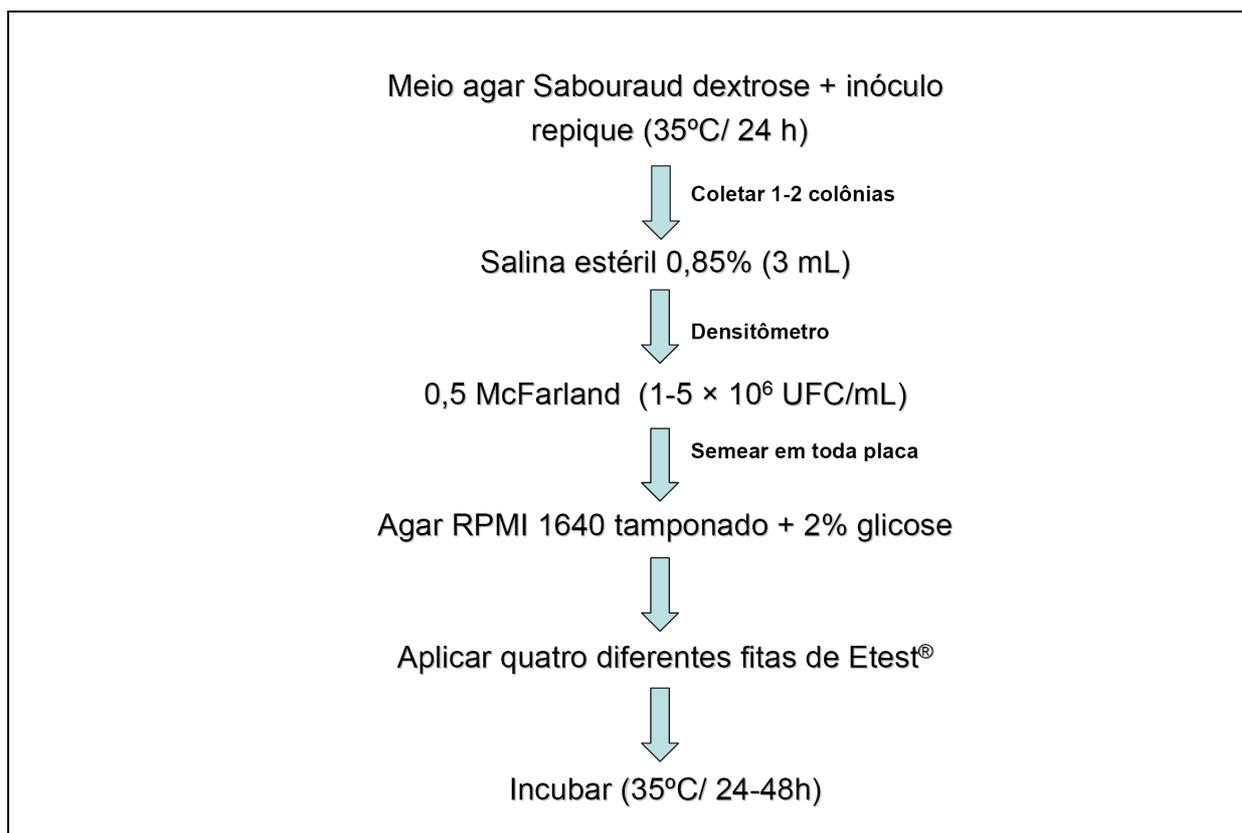
O teste de susceptibilidade aos antifúngicos Etest<sup>®</sup> e sistema Vitek<sup>®</sup> 2 foram realizados de acordo com as instruções do fabricante (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France) e interpretados segundo critérios do CLSI (CLSI 2008b) (**ANEXO B**). Os resultados das CIMs dos métodos comerciais foram comparados aos resultados do método de referência CLSI (M27-A3) para verificar o percentual de concordância entre eles. Todos os testes foram realizados em duplicata e, em caso de discrepâncias, foram repetidos mais uma vez. Para controle de qualidade, as cepas de referência citadas anteriormente foram utilizadas em cada ensaio.

### 4.6.1 Etest<sup>®</sup>

As fitas de Etest<sup>®</sup> adquiridas da bioMérieux SA (Marcy-l'Etoile, France) apresentaram as seguintes concentrações de antifúngicos: 32 a 0,002 µg/mL para anfotericina B, voriconazol e itraconazol; e 256 a 0,016 µg/mL para fluconazol. Essas fitas foram mantidas a temperatura de -20°C até o momento do teste.

Foram utilizadas placas de Petri de 150 mm contendo meio composto por RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio (Sigma Chemical Corporation, St. Louis, USA) suplementado com 2% de glicose (Sigma Chemical Corporation, St. Louis, USA) e 1,5% de ágar (Difco, Becton-Dickinson and Company, USA) e tamponado com 0,165 M de MOPS [pH 7,0] (3-N-morpholinopropane-sulphonic acid) (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, Brasil). O preparo do inóculo foi a partir de uma cultura pura com repique de 24 horas no meio ágar Sabouraud dextrose. A seguir, uma suspensão da levedura foi preparada em 3 mL de solução salina a 0,85% e a densidade óptica ajustada através de um densitômetro (DensiCheck, bioMérieux) para o padrão n° 0,5 da escala de McFarland que corresponde a um inóculo de aproximadamente  $1-5 \times 10^6$  UFC/mL. Com auxílio de um *swab* estéril, a suspensão de levedura foi inoculada em três direções em toda superfície do ágar. Depois que

o excesso de umidade foi absorvido e a superfície estava completamente seca, quatro diferentes fitas de Etest foram aplicadas por placa e, em seguida, as placas foram incubadas a 35°C por 24-48h (**Figura 1**). Após incubação, quando houve crescimento visível, o valor da CIM foi determinado pela interseção da elipse com a fita de Etest<sup>®</sup>.

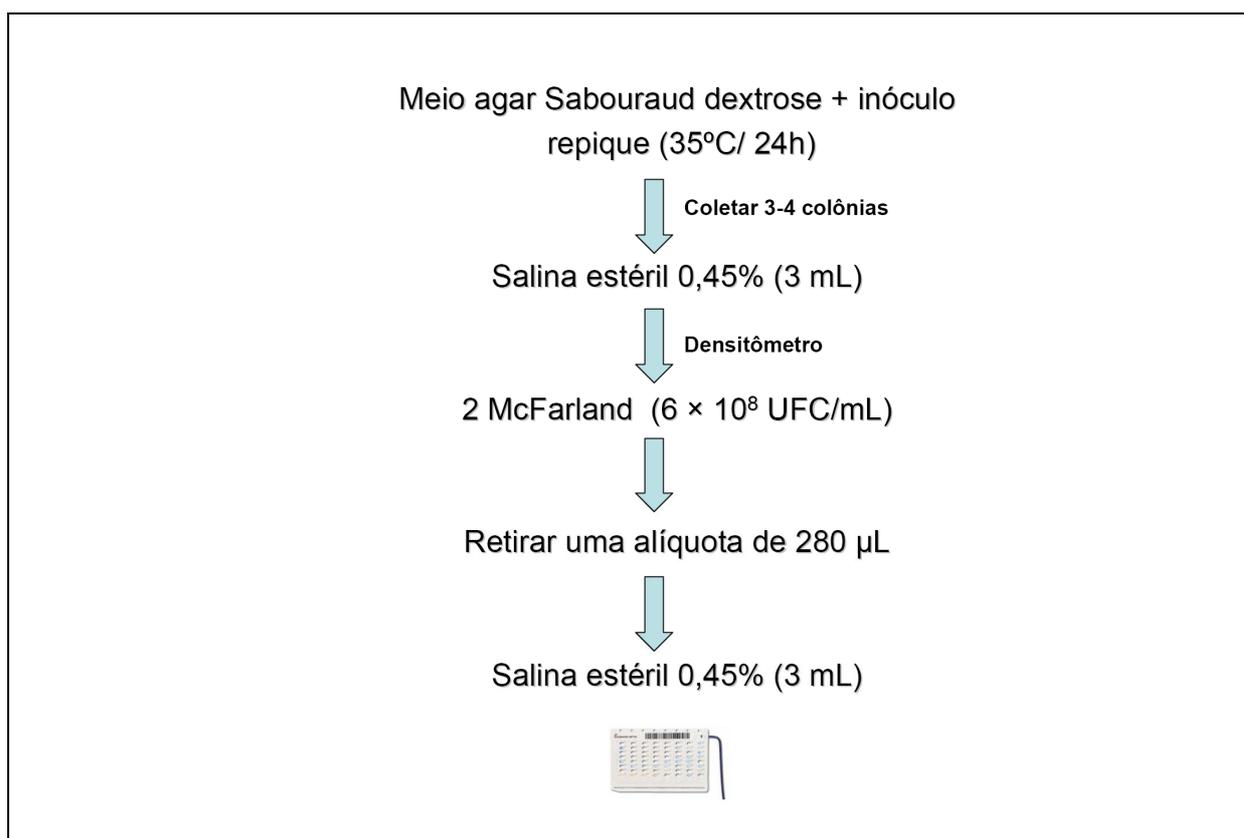


**Figura 1.** Esquema ilustrativo da preparação do inóculo para execução do teste de susceptibilidade aos antifúngicos pelo método Etest<sup>®</sup>.

#### **4.6.2 Sistema Vitek<sup>®</sup> 2 para teste de susceptibilidade aos antifúngicos (AST Card YS01)**

Os cartões do sistema Vitek<sup>®</sup> 2 para teste de susceptibilidade aos antifúngicos (AST Card YS01) foram obtidos da bioMérieux, Inc., (Hazelwood, France). As concentrações dos fármacos no cartão AST YS01 variaram de: 16 a 0,25 µg/mL para anfotericina B, de 64 a 1 µg/mL para fluconazol e de 8 a 0,125 µg/mL para voriconazol. Eles foram mantidos a temperatura de 2-8°C até o momento do uso. O cartão Vitek<sup>®</sup> 2 AST YS01 não contém o antifúngico itraconazol.

Após crescimento de 24 horas no meio ágar Sabouraud dextrose, uma suspensão de levedura foi preparada em 3 mL de salina a 0,45% e a densidade óptica ajustada através de um densitômetro para equivalência com o padrão nº 2 da escala de McFarland que corresponde a aproximadamente  $6 \times 10^8$  UFC/mL. Uma alíquota de 280  $\mu$ L dessa suspensão foi retirada deste tubo e adicionada em um novo tubo contendo 3 mL de salina estéril a 0,45% (Figura 2). Este, juntamente com cartão AST *Card* YS01, foi disposto na estante do Vitek<sup>®</sup> 2. O conjunto foi inserido no primeiro compartimento do equipamento para distribuição da suspensão de levedura nos poços, e na sequência o mesmo foi inserido no segundo compartimento para selagem e incubação a 35,5°C. Os valores de CIM foram determinados automaticamente por espectrofotometria conforme o controle de crescimento de cada isolado testado, e foram expressos em  $\mu$ g/mL (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema ilustrativo da preparação do inóculo para execução do teste de susceptibilidade aos antifúngicos pelo sistema Vitek<sup>®</sup> 2 (AST *Card* YS01).

### 4.6.3 Método da microdiluição em caldo pelo CLSI (M27-A3)

Anfotericina B, fluconazol, voriconazol e itraconazol (Sigma Chemical Corporation, St. Louis, MO, USA) foram testados pelo método da microdiluição em caldo pelo CLSI (M27-A3). Somente fármacos sob a forma de referência em pó adquiridos comercialmente foram empregados. De acordo com o protocolo M27-A3 do CLSI (CLSI, 2008a), as soluções estoques de anfotericina B, voriconazol e itraconazol foram preparadas em DMSO (dimetilsulfóxido) (Amresco, Ohio, USA) na concentração de 1.600 µg/mL e a de fluconazol foi preparada em água destilada estéril, na concentração de 5.120 µg/mL. As soluções estoques foram armazenadas a -20°C em frascos de polipropileno estéreis por um período de até três meses.

Os isolados clínicos de *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. parapsilosis stricto sensu* foram testados *in vitro* para a anfotericina B, fluconazol, voriconazol e itraconazol de acordo com o documento M27-A3 do CLSI (CLSI, 2008a) com algumas modificações. Foram utilizadas placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços de fundo plano (Jet Biofil, Guangdong, China) e a leitura dos resultados foi realizada num leitor de microplacas (Epoch, Biotek) a 530 nm de comprimento de onda.

Cepas de referência de *C. krusei* (ATCC 6258) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019) foram utilizadas como controle interno de qualidade em cada placa de microtitulação. O meio usado neste estudo também foi o RPMI-1640 (com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio), tamponado com 0,165 M de MOPS, pH 7,0.

Cada antifúngico foi avaliado em 10 diferentes concentrações seriadas. Para a anfotericina B, o voriconazol e o itraconazol a faixa de concentração variou de 16 a 0,03 µg/mL. Para o fluconazol variou de 64-0,12 µg/mL. Para os antifúngicos insolúveis em água (anfotericina B, voriconazol e itraconazol), o DMSO foi utilizado como diluente no preparo da primeira série de diluições e o RPMI-1640 na segunda. A partir das soluções estoques (1.600 µg/mL) desses fármacos foi preparada uma série de diluições do antifúngico sendo a primeira 100X a concentração final. A seguir, cada solução não aquosa foi diluída 1:100, produzindo uma concentração de antifúngico 2X superior a concentração final do ensaio (**Figura 3**). Para o antifúngico solúvel em água (fluconazol), o diluente empregado em todas as diluições foi o RPMI-1640. Neste caso, a partir da solução estoque (5.280 µg/mL) foi preparada uma série de 10 diluições cuja concentração foi 10X mais elevada do que a

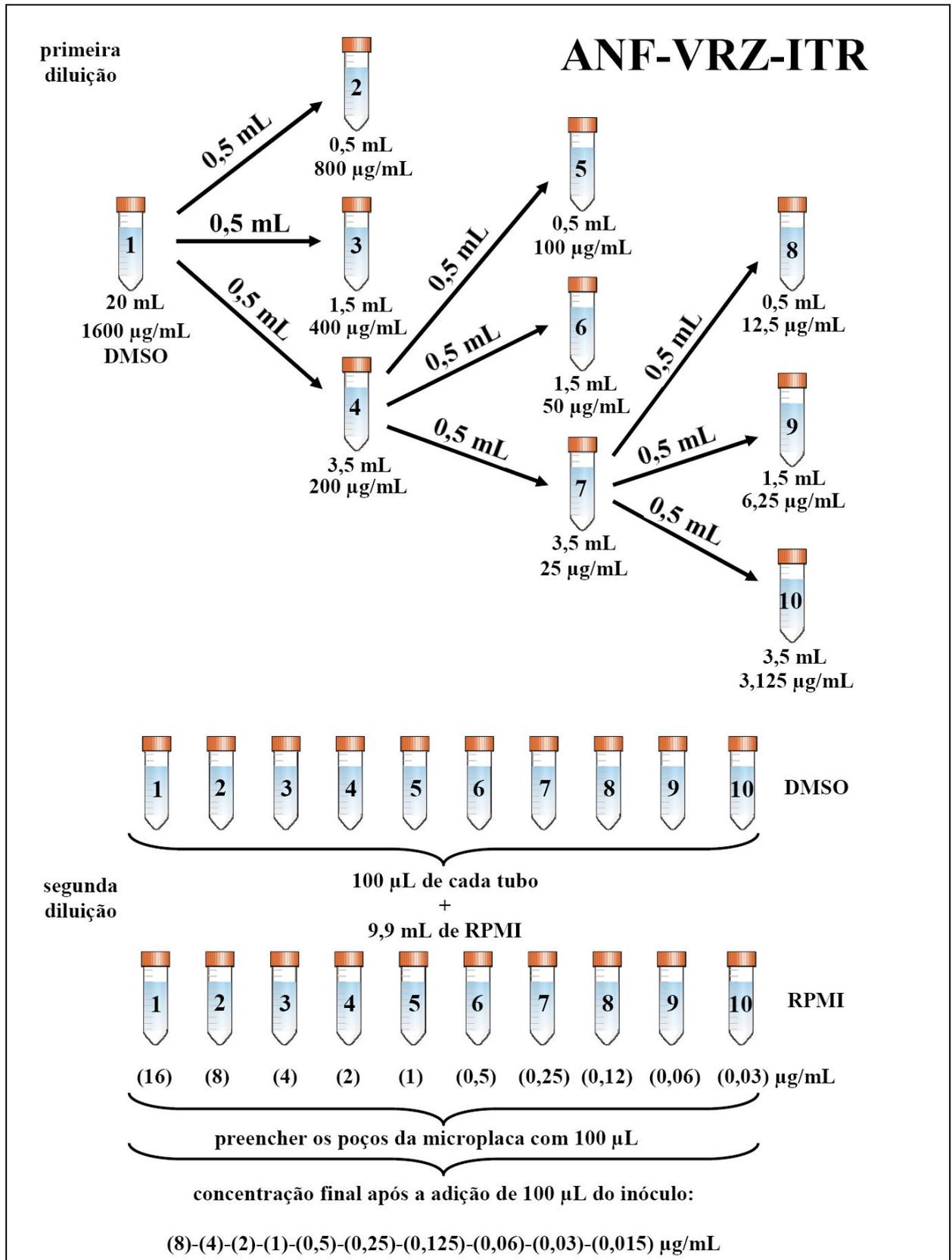
concentração final. Em seguida, foi realizada uma diluição 1:10 obtendo uma concentração 2X superior a concentração final do ensaio (**Figura 4**).

Os poços entre as colunas 02 e 11 das placas de microtitulação de 96 poços (com 8 linhas identificadas de A-H e 12 colunas numeradas de 1 a 12) foram preenchidos com alíquotas de 100 µL das 10 diluições seriadas do antifúngico 2X concentradas. Os poços da coluna 01 foram preenchidos com 200 µL de RPMI-1640 para controle de esterilidade e os poços da coluna 12 foram preenchidos com 100 µL de RPMI-1640 ou 100 µL de RPMI-1640 com DMSO 0,2% para controle de crescimento. A seguir, as placas de fluconazol, itraconazol e voriconazol foram identificadas, fechadas e embaladas com filme PVC, enquanto as placas de anfotericina B (fármaco fotosensível) foram embaladas com papel alumínio. Todas as placas foram mantidas a temperatura de -20°C até o momento do uso, por um período máximo de 3 meses.

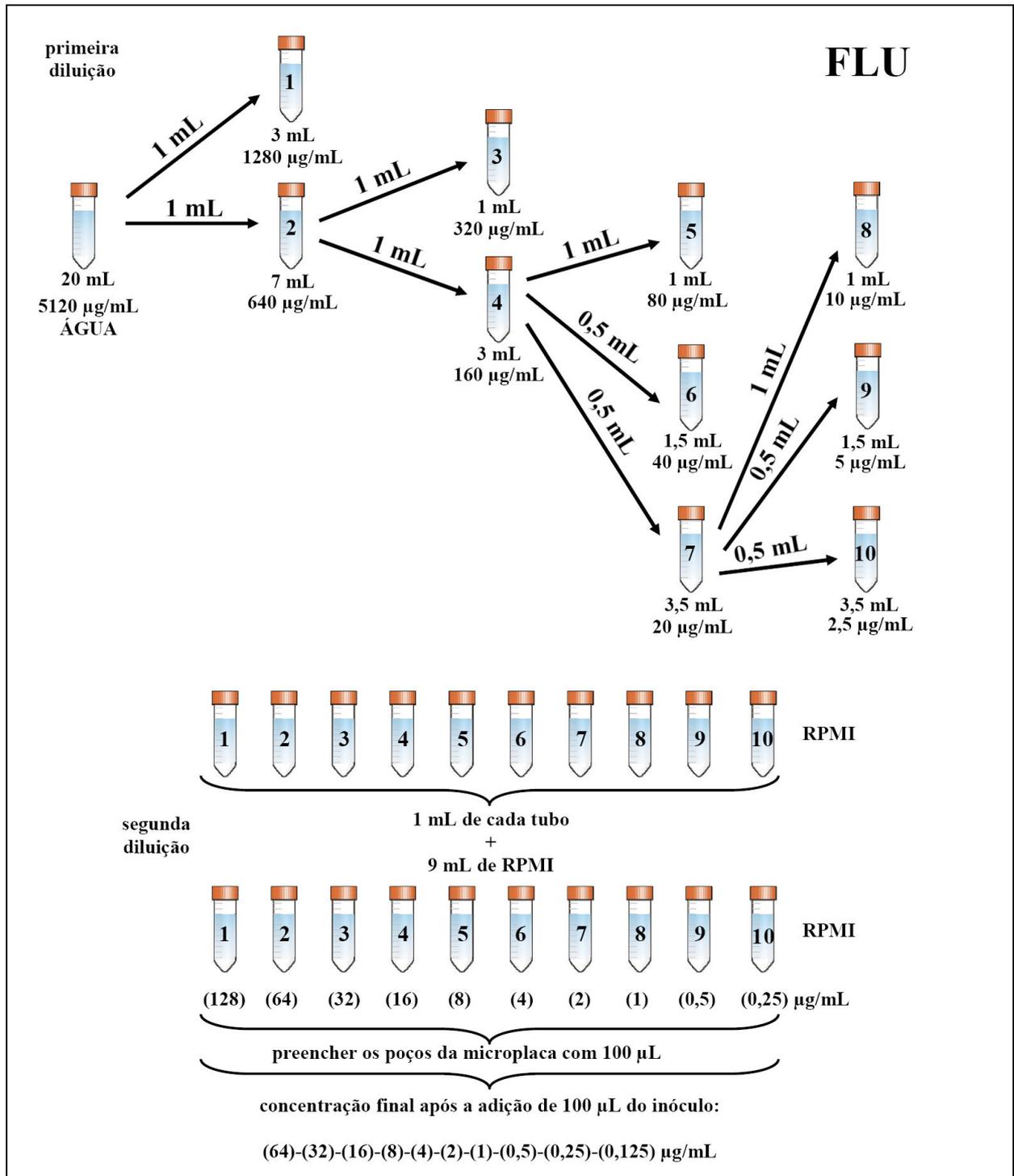
Para obtenção do inóculo dos isolados clínicos do complexo *psilosis*, foi realizado um repique de 24 horas no meio ágar Sabouraud dextrose. A seguir, uma suspensão de leveduras foi preparada em 3 mL de salina a 0,85% e a densidade óptica ajustada através de um densitômetro para o padrão n° 0,5 da escala de McFarland que corresponde a aproximadamente  $1-5 \times 10^6$  UFC/mL. Para produzir uma concentração celular entre  $1-5 \times 10^3$  UFC/mL, essa suspensão foi ainda diluída a 1:1.000 em RPMI-1640.

Para realização do teste da microdiluição em caldo, as placas de microtitulação foram retiradas da refrigeração e mantidas a temperatura de 35°C por 30 min. Em seguida, alíquotas de 100 µL de cada inóculo foram adicionadas nos poços das placas entre as colunas 02 e 12 reduzindo à metade as diferentes concentrações de antifúngico (**Figuras 3 e 4**) e também a concentração do inóculo ( $0,5-2,5 \times 10^3$  UFC/mL). Em cada placa foram distribuídos seis inóculos de leveduras e as duas cepas de referência. As placas foram fechadas e incubadas a 35°C por até 48 horas.

A leitura dos resultados foi realizada num leitor de microplacas (Epoch, Biotek) a 530 nm de comprimento de onda após 24 ou 48h de incubação. O controle de esterilidade (sem antifúngico e sem inóculo) preparado em toda a coluna 1 da placa de microtitulação foi utilizado como “branco” no momento da leitura no espectrofotômetro. Os resultados foram impressos, analisados e os valores de CIM foram interpretados de acordo com os pontos de corte do CLSI (CLSI, 2008b) (**ANEXO B**).



**Figura 3.** Esquema de diluição de anfotericina B (ANF), voriconazol (VRZ) e itraconazol (ITR) pelo método da microdiluição em caldo pelo CLSI (M27-A3). DMSO = dimetilsulfóxido; RPMI = meio *Roswell Park Memorial Institute* 1640.



**Figura 4.** Esquema de diluição do fluconazol (FLU) pelo método da microdiluição em caldo pelo CLSI (M27-A3). RPMI = meio *Roswell Park Memorial Institute* 1640.

Para o fluconazol, o voriconazol e o itraconazol os valores das CIMs foram definidos como a menor concentração do antifúngico capaz de inibir 50% do crescimento quando comparado ao poço controle livre do fármaco (coluna 12). Para a anfotericina B, o valor de

CIM foi definido na menor concentração do fármaco capaz de inibir 100% do crescimento da levedura.

#### 4.7 ANÁLISE DE RESULTADOS

Foram adotados os critérios de concordância essencial (CE) e concordância categórica (CC) segundo a *U. S. Food and Drug Administration* (FDA) (FDA, 2003) para comparação entre os métodos. A CE foi definida quando os valores de CIM variavam até duas diluições e a CC foi considerada quando o valor de CIM estava dentro da mesma categoria de sensibilidade [susceptível (S), susceptível dependente da dose (SDD) ou resistente (R)] desde que haja pontos de corte definidos para os antifúngicos em estudo. Os tipos de erros categóricos foram classificados no **Quadro 2**.

TIPOS DE ERROS CATEGÓRICOS	MÉTODOS	
	TESTE	REFERÊNCIA
Erro Mínimo (EM)	(SDD)	(S) ou (R)
	(S) ou (R)	(SDD)
Erro Grave (EG)	(R)/ falsa resistência	(S)
Erro Muito Grave (EMG)	(S)/ falsa sensibilidade	(R)

**Quadro 2.** Classificação dos tipos de erros categóricos comparando o resultado do perfil de susceptibilidade aos antifúngicos obtido pelo método teste em relação ao método de referência.

Fonte: FDA (2003)

Os critérios interpretativos para anfotericina B ainda não foram estabelecidos pelo CLSI, mas isolados inibidos pela anfotericina B com CIM  $\leq 1$   $\mu\text{g/mL}$  foram susceptíveis e  $> 1$   $\mu\text{g/mL}$  foram considerados resistentes a este fármaco (CLSI, 2008a). Para o fluconazol segundo CLSI (CLSI, 2008b), quando o valor de CIM foi  $\leq 8\mu\text{g/mL}$  os isolados foram susceptíveis, CIM entre 16-32  $\mu\text{g/mL}$  foram susceptíveis dependente da dose e CIM  $\geq 64$   $\mu\text{g/mL}$  foram resistentes a este fármaco. Para itraconazol, quando o valor de CIM foi  $\leq 0,125$   $\mu\text{g/mL}$  os isolados foram susceptíveis, CIM entre 0,25-0,5  $\mu\text{g/mL}$  foram susceptíveis dependente da dose e CIM  $\geq 1$   $\mu\text{g/mL}$  foram resistentes a este fármaco. Para o voriconazol,

quando o valor da CIM  $\leq 1$   $\mu\text{g/mL}$  os isolados foram susceptíveis, CIM = 2  $\mu\text{g/mL}$  susceptíveis dependente da dose e CIM  $\geq 4$   $\mu\text{g/mL}$  foram resistentes a este fármaco (**ANEXO B**).

Foram realizadas análises estatísticas descritivas de frequência acumulada no software *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) versão 16.0 para determinar: (1) o intervalo de CIM representando o limite superior e inferior das CIMs de cada antifúngico frente às diferentes espécies do complexo *psilosis*; (2) a CIM<sub>50</sub> que equivale à concentração inibitória mínima do fármaco capaz de inibir o crescimento de 50% dos isolados testados; (3) a CIM<sub>90</sub> definida como a concentração inibitória mínima do fármaco capaz de inibir o crescimento de 90% dos isolados testados e (4) a média geométrica das CIMs.

Além disso, o Coeficiente de Correlação Intraclasse (CCI) foi calculado pelo SPSS versão 16.0 para verificar a correlação dos valores de CIMs obtidos pelos métodos Etest<sup>®</sup> e Vitek<sup>®</sup> 2 (AST Card YS01) com o método CLSI (M27-A3) para as espécies do complexo *psilosis* frente aos fármacos antifúngicos testados. De acordo com esta análise, se o valor de CCI for  $< 0,4$  a correlação é ruim, se  $0,4 < \text{CCI} < 0,75$  a correlação é boa e se  $\text{CCI} > 0,75$  é excelente (SHROUT; FLEISS, 1979).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS DO COMPLEXO *psilosis*

Os 53 isolados fúngicos do complexo *psilosis* provenientes de hemoculturas de pacientes com episódios de fungemia que estavam internados em três hospitais no município do Rio de Janeiro entre 1998 e 2006 foram identificados através de métodos morfológicos, bioquímicos e moleculares.

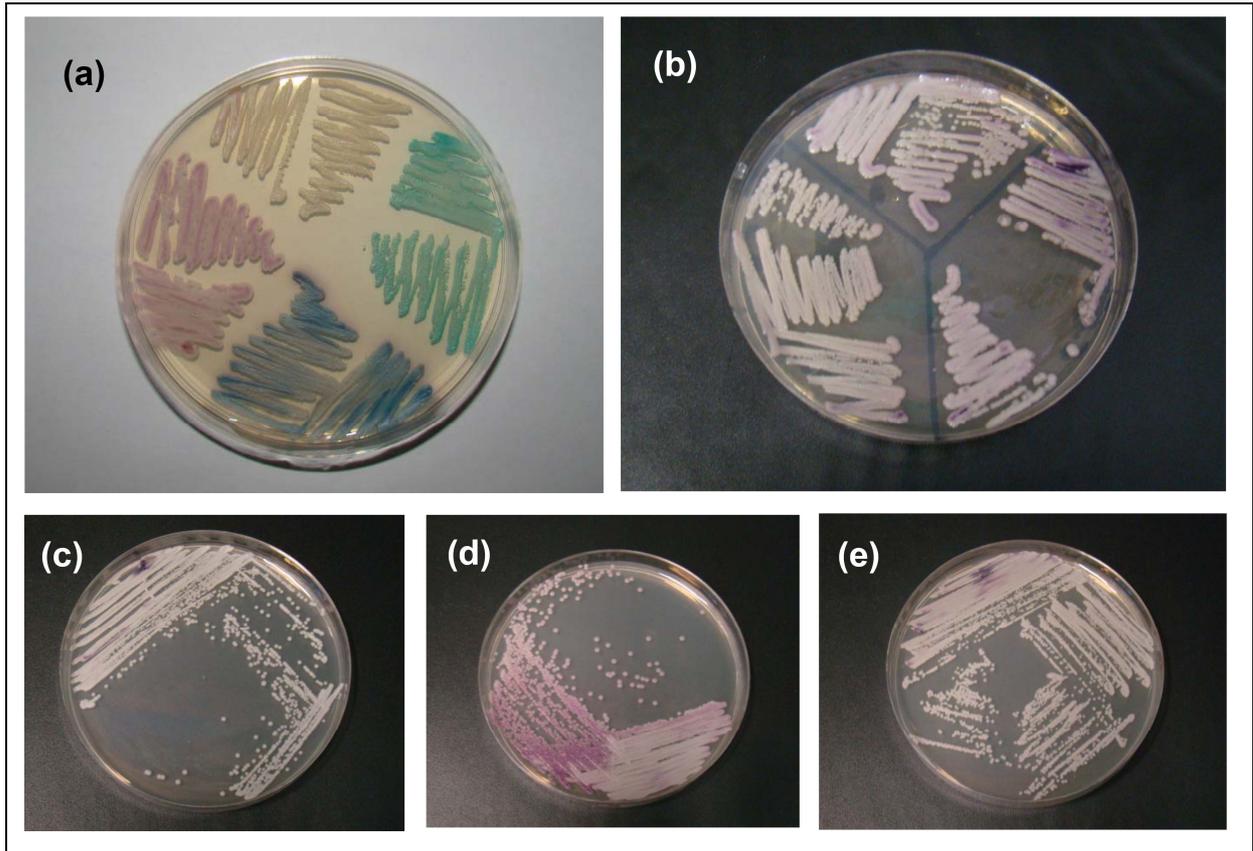
#### 5.1.1 Características macromorfológicas das leveduras

Em ágar batata dextrose foram observadas as características morfológicas das colônias. Em relação à pigmentação, houve variação do levemente branco ao creme com reverso incolor e pigmento não difusível no meio; as bordas foram delineadas e por vezes com o tempo maior de incubação apresentavam uma leve aparência rendada; textura cremosa e homogênea de aspecto úmido ou seco; relevo glabro e com o passar do tempo fracamente rugoso e, quanto ao brilho, foi verificado ora um aspecto lustroso ora opaco.

Em meio cromogênico (CHROMagar® *Candida*) todos os isolados apresentaram colônias de pigmentação branca-rosada. Não foram observadas colônias de cor verde, azul e rosa rugosa, descartando a presença de colônias mistas com *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, respectivamente (**Figura 5**).

#### 5.1.2 Identificação bioquímica

Todos os 53 isolados investigados pelo API® 20 C AUX foram identificados como pertencente ao complexo *psilosis* e apresentaram taxa de probabilidade que variaram de 96,1 a 99,9%, sendo a média do percentual de probabilidade de 99,6%. Pelo sistema automatizado Vitek® 2 YST Card, os isolados apresentaram taxa de probabilidade que variou de 86,0 a 99,0%, sendo a média do percentual de probabilidade de 96,4% em relação à identificação da levedura como pertencente ao complexo *psilosis* (**Tabela 1**). Os resultados referentes a todas as amostras estão presentes no **APÊNDICE A**.



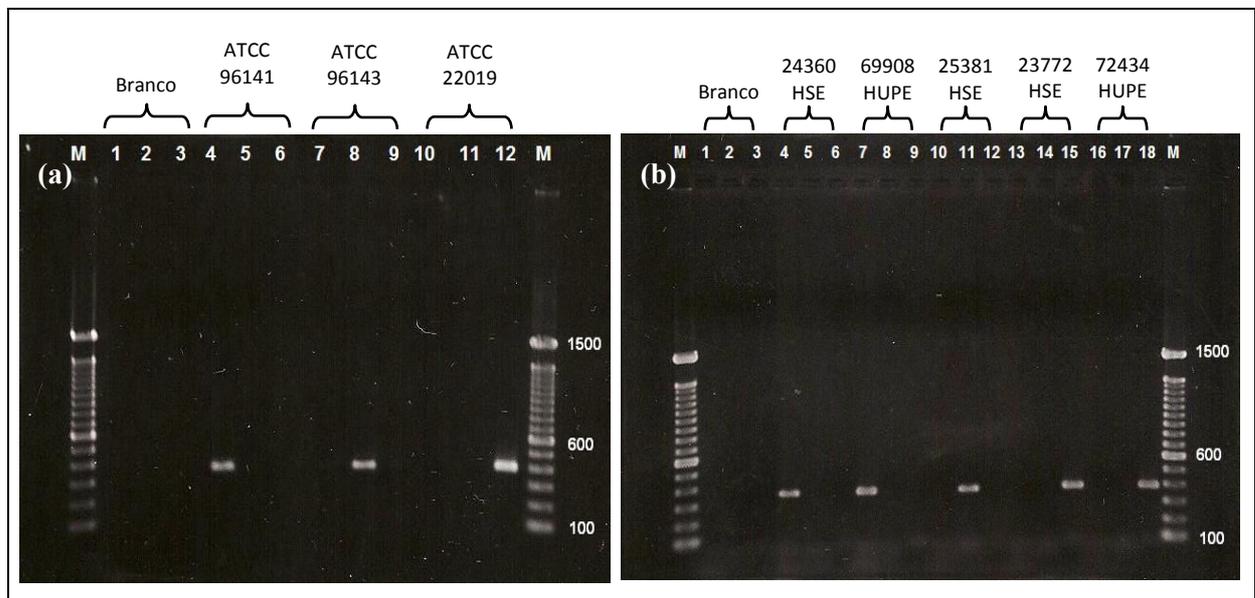
**Figura 5:** Chromagar<sup>®</sup> *Candida* de 72 horas a 35°C. **(a)** No sentido horário: cor branca *C. parapsilosis* ATCC 22019, cor verde *C. albicans* ATCC 18804, cor azul *C. tropicalis* ATCC 13803 e rosa rugosa *C. krusei* (ATCC 6258). **(b)** No sentido horário: *C. orthopsilosis* ATCC 96141, *C. metapsilosis* ATCC 96143 e *C. parapsilosis* ATCC 22019. **(c)** **(d)** e **(e)** Representativo de três diferentes isolados do total de amostras. **(c)** 24775 HSE, **(d)** 25381 HSE e **(e)** 250.111.129.11 HSAM, que posteriormente foram identificados molecularmente como *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. parapsilosis stricto sensu*, respectivamente.

**Tabela 1.** Caracterização bioquímica de 53 isolados do complexo *psilosis* oriundos de amostras de hemocultura de pacientes com fungemia que estavam internados em três hospitais no município do Rio de Janeiro entre 1998 e 2006.

Complexo <i>psilosis</i>		
Métodos	Espécie (Média de probabilidade %)	Intervalo de Confiança (IC 95%)
API <sup>®</sup> 20 C AUX	<i>C. parapsilosis</i> (99,6)	99,4 – 99,8
Vitek <sup>®</sup> 2 YST Card	<i>C. parapsilosis</i> (96,4)	95,6 – 97,2

### 5.1.3 Identificação molecular

A identificação molecular do complexo *psilosis* foi realizada pela PCR utilizando *primers* espécie-específicos. Dos 53 isolados fúngicos, 51 amplificaram para um único par de *primers*, sendo caracterizados como 39 (73,6%) isolados de *C. parapsilosis stricto sensu*, 10 (18,9%) de *C. orthopsilosis* e dois (3,8%) de *C. metapsilosis*. Esses resultados estão apresentados na **Figura 6**, sendo demonstrados na figura 6 (a) os controles negativos (brancos) que não amplificaram para nenhum dos três pares de *primers*, e os controles positivos que foram as cepas de referência de *C. orthopsilosis* (ATCC 96141), *C. metapsilosis* (ATCC 96143) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019), respectivamente que só amplificaram de acordo com seus pares de *primers* espécie-específicos; e na figura 6 (b) uma eletroforese representativa da identificação molecular dos 53 isolados do complexo *psilosis*, mostrando os controles negativos que novamente não amplificaram para nenhum dos *primers* espécie-específicos e cinco isolados do complexo *psilosis* que foram identificados como *C. orthopsilosis* (amostras 24360 HSE e 69908 HUPE), *C. metapsilosis* (amostra 25381 HSE) e *C. parapsilosis stricto sensu* (amostras 23772 HSE e 72434 HUPE), respectivamente.



**Figura 6.** Produtos de PCR com *primers* espécie-específicos após amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA. (a) Colunas 1, 4, 7 e 10 *primers* CORF-CORR; colunas 2, 5, 8 e 11 *primers* CMEF-CMER; colunas 3, 6, 9 e 12 *primers* CPAF-CPAR. Colunas 4, 8 e 12: *C. orthopsilosis* (ATCC 96141), *C. metapsilosis* (ATCC 96143) e *C. parapsilosis stricto sensu* (ATCC 22019), respectivamente. (b) Colunas 1, 4, 7, 10, 13 e 16 *primers* CORF-CORR; colunas 2, 5, 8, 11, 14 e 17 *primers* CMEF-CMER; colunas 3, 6, 9, 12, 15 e 18 *primers* CPAF-CPAR. 24360 HSE e 69908 HUPE foram identificadas como *C. orthopsilosis*; 25381 HSE como *C. metapsilosis*; 23772 HSE e 72434 HUPE como *C. parapsilosis stricto sensu*. M (marcador de peso molecular) = 100 bp. Colunas 1, 2 e 3: brancos (reação de PCR sem adição de DNA) em (a) e (b).

Dois isolados não foram identificados pelos *primers* espécie-específicos. Para discriminar e caracterizar estes isolados foi realizada uma amplificação e um sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do DNA ribossomal. Quanto ao resultado do sequenciamento, um isolado foi caracterizado como *C. parapsilosis stricto sensu* e o outro como *C. orthopsilosis*. Desta forma, o total de 53 isolados fúngicos foi caracterizado como *C. parapsilosis stricto sensu* (n=40/ 75,4%), *C. orthopsilosis* (n=11/ 20,8%) e *C. metapsilosis* (n=2/ 3,8%). A distribuição dessas espécies por hospital encontra-se na **Tabela 2**.

**Tabela 2.** Distribuição do número de isolados do complexo *psilosis* presente em três hospitais no município do Rio de Janeiro entre 1998 e 2006

Espécie	N° de Isolados (%)			
	HUPE	HSE	HSAM	TOTAL
<i>C. parapsilosis stricto sensu</i>	11 (20,8)	25 (47,2)	4 (7,4)	40 (75,4)
<i>C. orthopsilosis</i>	9 (17)	2 (3,8)	0 (0)	11 (20,8)
<i>C. metapsilosis</i>	0 (0)	2 (3,8)	0 (0)	2 (3,8)
Total	20 (37,7)	29 (54,7)	4 (7,6)	53 (100)

HUPE= Hospital Universitário Pedro Ernesto; HSE= Hospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro; HSAM= Hospital Samaritano

Comparando os resultados macromorfológicos e moleculares dos isolados do complexo *psilosis*, não possível distinguir um padrão morfológico comum para cada tipo de espécie, confirmando a importância da biologia molecular para caracterizar as espécies do complexo *psilosis*.

## 5.2 SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

Os valores de CIM dos 53 isolados do complexo *psilosis* para anfotericina B, fluconazol, voriconazol e itraconazol foram determinados por três métodos distintos: Etest<sup>®</sup>,

Sistema Vitek<sup>®</sup> 2 para susceptibilidade antifúngica (AST YS01 *Card*) e Microdiluição em caldo pelo CLSI (M27-A3) (**APÊNDICE B**). Esses resultados foram validados após utilização em cada ensaio de duas cepas de referência da ATCC (*C. parapsilosis* 22019 e *C. krusei* 6258) cujos valores estavam dentro da faixa de CIM recomendada pelo CLSI (**ANEXO A**).

O tempo de leitura variou de acordo com crescimento fúngico para os três métodos. Pelo Etest e pelo CLSI (M27-A3) variou entre 24 e 48h enquanto que pelo Vitek 2 o resultado foi disponibilizado entre 13h e 22h 25 min.

### 5.2.1 Etest<sup>®</sup>

A variação dos valores de CIM pelo Etest<sup>®</sup> para os 40 isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* foi de 0,25 a 1,5 µg/mL para a anfotericina B; 0,094 a 0,75 µg/mL para o fluconazol; 0,006 a 0,032 µg/mL para o voriconazol e 0,016 a 0,125 µg/mL para o itraconazol.

A variação dos valores de CIM para os 11 isolados de *C. orthopsilosis* foi de 0,25 a 0,5 µg/mL para a anfotericina B; 0,25 a 2 µg/mL para o fluconazol; 0,008 a 0,032 µg/mL para o voriconazol e 0,032 a 0,25 µg/mL para o itraconazol.

A variação dos valores de CIM para os dois isolados de *C. metapsilosis* foi de 0,25 a 0,38 µg/mL para a anfotericina B; 0,125 a 0,25 µg/mL para o fluconazol; 0,008 a 0,012 µg/mL para o voriconazol e 0,094 µg/mL para o itraconazol. Com relação aos valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> estes não puderam ser calculados devido ao número reduzido de isolados dessa espécie neste estudo.

Os valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub>, bem como a média geométrica e o perfil de susceptibilidade antifúngica dos 53 isolados do complexo *psilosis* pelo método Etest estão apresentados na **Tabela 3**. Analisando esse perfil, 49 isolados foram susceptíveis aos quatro fármacos testados pelo método Etest, mas um único isolado de *C. parapsilosis stricto sensu* foi considerado resistente (amostra 80792 HUPE com CIM = 1,5 µg/mL) para a anfotericina B e três isolados de *C. orthopsilosis* foram considerados susceptíveis dependente da dose para o itraconazol (amostra 70114 HUPE com CIM= 0,19 µg/mL; e duas amostras 79188 e 81480 HUPE com CIM= 0,25 µg/mL).

**Tabela 3.** Valores de concentrações inibitórias mínimas, média geométrica e perfil de susceptibilidade aos antifúngicos *in vitro* de isolados do complexo *psilosis* oriundos de pacientes com fungemia no município do Rio de Janeiro entre 1998 e 2006 pelo método Etest<sup>®</sup>.

Espécie (Nº de isolados)	Fármacos	CIM <sub>50</sub> / CIM <sub>90</sub> (µg/mL)	MG (µg/mL)	Susceptibilidade n (%)		
				S	SDD	R
<i>C. parapsilosis</i> <i>stricto sensu</i> (40)	ANF	0,5/ 0,75	0,5	39 (97,5)	0 (0)	1 (2,5)
	FLU	0,25/ 0,5	0,3	40 (100)	0 (0)	0 (0)
	VRZ	0,012/ 0,016	0,012	40 (100)	0 (0)	0 (0)
	ITR	0,064/ 0,125	0,09	40 (100)	0 (0)	0 (0)
<i>C. orthopsilosis</i> (11)	ANF	0,38/ 0,5	0,4	11 (100)	0 (0)	0 (0)
	FLU	0,5/ 1	0,5	11 (100)	0 (0)	0 (0)
	VRZ	0,016/ 0,032	0,019	11 (100)	0 (0)	0 (0)
	ITR	0,125/ 0,25	0,1	8 (72,7)	3 (27,3)	0 (0)
<i>C. metapsilosis</i> (2)	ANF	-/ -	0,3	2 (100)	0 (0)	0 (0)
	FLU	-/ -	0,2	2 (100)	0 (0)	0 (0)
	VRZ	-/ -	0,015	2 (100)	0 (0)	0 (0)
	ITR	-/ -	0,09	2 (100)	0 (0)	0 (0)

ANF= anfotericina B; FLU= fluconazol; VRZ= voriconazol; ITR= itraconazol; CIM<sub>50</sub>/ CIM<sub>90</sub>= concentração inibitória mínima do fármaco capaz de inibir o crescimento de 50% e 90% dos isolados fúngicos, respectivamente; MG= média geométrica dos valores de concentrações inibitórias mínimas; S= susceptível; SDD= susceptível dependente da dose; R= resistente.

### 5.2.2 Vitek<sup>®</sup> 2

A variação dos valores de CIM pelo Vitek<sup>®</sup> 2 para os 40 isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* foi de  $\leq 0,25$  a 1 µg/mL para a anfotericina B,  $\leq 1$  a 2 µg/mL para o fluconazol e  $\leq 0,12$  µg/mL para o voriconazol.

A variação dos valores de CIM para os 11 isolados de *C. orthopsilosis* foi de  $\leq 0,25$  a 0,5 µg/mL para a anfotericina B,  $\leq 1$  a 8 µg/mL para o fluconazol e  $\leq 0,12$  µg/mL para o voriconazol.

A variação dos valores de CIM para os dois isolados de *C. metapsilosis* foi de  $\leq 0,25$  a  $0,5 \mu\text{g/mL}$  para a anfotericina B,  $\leq 1 \mu\text{g/mL}$  para o fluconazol e  $\leq 0,12 \mu\text{g/mL}$  para o voriconazol. Com relação aos valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> estes não puderam ser calculados devido ao número reduzido de isolados dessa espécie neste estudo. O itraconazol não foi avaliado pelo Vitek<sup>®</sup> 2, pois o cartão AST YS01 utilizado nesse método só permite testar anfotericina B, fluconazol, voriconazol e fluocitosina.

Os valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub>, bem como a média geométrica e o perfil de susceptibilidade antifúngica dos 53 isolados do complexo *psilosis* pelo método Vitek<sup>®</sup> 2 estão apresentados na **Tabela 4**. Analisando esse perfil, todos os isolados foram susceptíveis aos quatro fármacos testados pelo método Vitek<sup>®</sup> 2.

**Tabela 4.** Valores de concentrações inibitórias mínimas, média geométrica e perfil de susceptibilidade aos antifúngicos *in vitro* de isolados do complexo *psilosis* oriundos de pacientes com fungemia no município do Rio de Janeiro entre 1998 e 2006 pelo método Vitek<sup>®</sup> 2.

Espécie (Nº de isolados)	Fármacos	CIM <sub>50</sub> /CIM <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	MG ( $\mu\text{g/mL}$ )	Susceptibilidade n (%)		
				S	SDD	R
<i>C. parapsilosis</i> <i>stricto sensu</i> (40)	ANF	0,5/ 0,5	0,4	40 (100)	0 (0)	0 (0)
	FLU	$\leq 1/ 2$	1,2	40 (100)	0 (0)	0 (0)
	VRZ	$\leq 0,12$	$\leq 0,12$	40 (100)	0 (0)	0 (0)
<i>C. orthopsilosis</i> (11)	ANF	$\leq 0,25/ 0,5$	0,4	11 (100)	0 (0)	0 (0)
	FLU	$\leq 1/ 4$	1,5	11 (100)	0 (0)	0 (0)
	VRZ	$\leq 0,12$	$\leq 0,12$	11 (100)	0 (0)	0 (0)
<i>C. metapsilosis</i> (2)	ANF	-/ -	0,3	2 (100)	0 (0)	0 (0)
	FLU	-/ -	$\leq 1$	2 (100)	0 (0)	0 (0)
	VRZ	-/ -	$\leq 0,12$	2 (100)	0 (0)	0 (0)

ANF= anfotericina B; FLU= fluconazol; VRZ= voriconazol; CIM<sub>50</sub>/ CIM<sub>90</sub> = concentração inibitória mínima do fármaco capaz de inibir o crescimento de 50% e 90% dos isolados fúngicos, respectivamente; MG= média geométrica dos valores de concentrações inibitórias mínimas; S= susceptível; SDD= susceptível dependente da dose; R= resistente.

### 5.2.3 Microdiluição em caldo pelo CLSI (M27-A3)

A variação dos valores de CIM obtidos pelo CLSI (M27-A3) para os 40 isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* foi de 0,25 a 2 µg/mL para a anfotericina B; 0,125 a 1 µg/mL para o fluconazol; 0,015 a 0,03 µg/mL para o voriconazol e 0,015 a 0,12 µg/mL para o itraconazol.

A variação dos valores de CIM para os 11 isolados de *C. orthopsilosis* foi de 0,25 a 1 µg/mL para a anfotericina B; 0,25 a 2 µg/mL para o fluconazol; 0,015 a 0,03 µg/mL para o voriconazol e 0,03 a 0,12 µg/mL para o itraconazol.

A variação dos valores de CIM para os dois isolados de *C. metapsilosis* foi de 0,25 µg/mL para a anfotericina B; 0,25 a 0,5 µg/mL para o fluconazol; 0,015 µg/mL para o voriconazol e 0,06 µg/mL para o itraconazol. Novamente, não foi possível determinar os valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> devido ao número reduzido de isolados dessa espécie neste estudo.

Os valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub>, bem como a média geométrica e o perfil de susceptibilidade antifúngica dos 53 isolados do complexo *psilosis* pelo método CLSI (M27-A3) estão apresentados na **Tabela 5**.

**Tabela 5.** Valores de concentrações inibitórias mínimas, média geométrica e perfil de susceptibilidade aos antifúngicos *in vitro* de isolados do complexo *psilosis* oriundos de pacientes com fungemia no município do Rio de Janeiro entre 1998 e 2006 pelo método CLSI (M27-A3).

Espécie (Nº de isolados)	Fármacos	CIM <sub>50</sub> / CIM <sub>90</sub> (µg/mL)	MG (µg/mL)	Susceptibilidade n (%)		
				S	SDD	R
<i>C. parapsilosis</i> (40)	ANF	0,5/ 1	0,6	39 (97,5)	0 (0)	1 (2,5)
	FLU	0,25/ 0,5	0,3	40 (100)	0 (0)	0 (0)
	VRZ	0,015/ 0,03	0,019	40 (100)	0 (0)	0 (0)
	ITR	0,06/ 0,12	0,07	40 (100)	0 (0)	0 (0)
<i>C. orthopsilosis</i> (11)	ANF	0,25/ 0,5	0,4	11 (100)	0 (0)	0 (0)
	FLU	0,5/ 1	0,6	11 (100)	0 (0)	0 (0)
	VRZ	0,015/ 0,03	0,019	11 (100)	0 (0)	0 (0)
	ITR	0,06/ 0,12	0,08	11 (100)	0 (0)	0 (0)
<i>C. metapsilosis</i> (2)	ANF	-/ -	0,3	2 (100)	0 (0)	0 (0)
	FLU	-/ -	0,4	2 (100)	0 (0)	0 (0)
	VRZ	-/ -	0,019	2 (100)	0 (0)	0 (0)
	ITR	-/ -	0,06	2 (100)	0 (0)	0 (0)

ANF= anfotericina B; FLU= fluconazol; VRZ= voriconazol; ITR= itraconazol; CIM<sub>50</sub>/ CIM<sub>90</sub> = concentração inibitória mínima do fármaco capaz de inibir o crescimento de 50% e 90% dos isolados fúngicos, respectivamente; MG= média geométrica dos valores de concentrações inibitórias mínimas; S= susceptível; SDD= susceptível dependente da dose; R= resistente.

#### 5.2.4 Comparação entre os métodos Etest<sup>®</sup>, Vitek<sup>®</sup> 2 e CLSI (M27-A3)

Quanto ao perfil de susceptibilidade aos antifúngicos, *C. metapsilosis* foi 100% susceptível aos quatro fármacos pelos três métodos. Embora susceptível a anfotericina B, ao fluconazol e ao voriconazol, três isolados de *C. orthopsilosis* (amostras 69908, 70114 e 79298B todas do HUPE) apresentaram CIM  $\geq 2$  µg/mL para o fluconazol pelo Vitek<sup>®</sup> 2 e CIM  $\leq 2$  µg/mL pelos métodos Etest<sup>®</sup> e CLSI (M27-A3) (APÊNDICE B). Para o itraconazol, oito isolados de *C. orthopsilosis* foram classificados como susceptíveis e três foram susceptíveis dependente da dose pelo Etest<sup>®</sup> (amostras 70114 com CIM= 0,19 µg/mL; e duas

amostras 79188 e 81480 com CIM= 0,25 µg/mL; todas do HUPE) enquanto que pelo método de referência CLSI (M27-A3) todos foram susceptíveis. Todos os 40 isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* foram susceptíveis ao fluconazol, voriconazol e itraconazol. Para a anfotericina B, 39 isolados apresentaram uma CIM ≤ 1 µg/µL e um isolado (amostra 80792 HUPE) apresentou uma CIM de 1,5 µg/mL, 0,5 µg/mL e 2 µg/mL pelos métodos Etest<sup>®</sup>, Vitek<sup>®</sup> 2 e CLSI (M27-A3), respectivamente nas **Tabelas 3, 4 e 5**.

Os valores de concentrações inibitórias mínimas CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub>, a média geométrica das CIMs e o percentual de concordância essencial pelos métodos Etest<sup>®</sup> e Vitek<sup>®</sup> 2 em comparação ao método de referência CLSI (M27-A3) para *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* estão apresentados na **Tabela 6**.

Analisando os três métodos, os isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* apresentaram valores de médias geométricas de CIM mais elevados para anfotericina B, do que os isolados de *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. Já os isolados de *C. orthopsilosis* apresentaram valores de CIM mais elevados para os azólicos fluconazol e itraconazol do que os isolados das outras duas espécies do complexo *psilosis*. Dentre as três espécies, os isolados de *C. metapsilosis* apresentaram valores de CIM mais baixos para todos os fármacos. Não houve variação das médias geométricas das CIM entre as três espécies do complexo *psilosis* para o voriconazol, indicando a boa atividade *in vitro* desse fármaco frente ao complexo *psilosis* (**Tabela 6**).

Quando os resultados obtidos pelo Etest<sup>®</sup> e pelo Vitek<sup>®</sup> 2 foram comparados com o CLSI (M27-A3), mostraram 100% de concordância essencial para todos os fármacos testados frente às espécies do complexo *psilosis*, exceto por um único isolado da espécie de *C. orthopsilosis* quando testada frente ao itraconazol. Neste caso, o Etest<sup>®</sup> apresentou concordância essencial de 90,9%, pois o valor da CIM desse isolado foi maior que duas diluições em relação ao CLSI (M27-A3) (amostra 81480 HUPE CIM=0,25 µg/mL pelo Etest e CIM=0,03 µg/mL pelo CLSI) (**Tabela 6**).

**Tabela 6.** Valores de concentrações inibitórias mínimas, média geométrica e percentual de concordância essencial pelos métodos Etest<sup>®</sup> e Vitek<sup>®</sup> 2 em comparação ao CLSI (M27-A3) de 53 isolados do complexo *psilosis* oriundos de pacientes com fungemia no município do Rio de Janeiro entre 1998 e 2006.

Espécies (Nº de isolados)	Métodos	Anfotericina B			Fluconazol			Voriconazol			Itraconazol		
		(µg/mL)		%	(µg/mL)		%	(µg/mL)		%	(µg/mL)		%
		CIM <sub>50</sub> / CIM <sub>90</sub>	MG	CE	CIM <sub>50</sub> / CIM <sub>90</sub>	MG	CE	CIM <sub>50</sub> / CIM <sub>90</sub>	MG	CE	CIM <sub>50</sub> / CIM <sub>90</sub>	MG	CE
<i>C. parapsilosis</i> <i>stricto sensu</i> (40)	Etest	0,5/ 0,75	0,5	100	0,25/ 0,5	0,3	100	0,012/ 0,016	0,012	100	0,064/ 0,125	0,09	100
	Vitek 2	0,5/ 0,5	0,4	100	≤1/ 2	1,2	100	≤0,12/ ≤0,12	≤0,12	100	NR	NR	NR
	CLSI	0,5/ 1	0,6		0,25/ 0,5	0,3		0,015/ 0,03	0,019		0,06/ 0,12	0,07	
<i>C. orthopsilosis</i> (11)	Etest	0,38/ 0,5	0,4	100	0,5/ 1	0,5	100	0,016/ 0,032	0,019	100	0,125/ 0,25	0,1	90,9
	Vitek 2	≤0,25/ 0,5	0,4	100	≤1/ 4	1,5	100	≤0,12/ ≤0,12	≤0,12	100	NR	NR	NR
	CLSI	0,25/ 0,5	0,4		0,5/ 1	0,6		0,015/0,03	0,019		0,06/0,12	0,08	
<i>C. metapsilosis</i> (2)	Etest	-	0,3	100	-	0,2	100	-	0,01	100	-	0,09	100
	Vitek 2	-	0,3	100	-	≤1	100	-	≤0,12	100	NR	NR	NR
	CLSI	-	0,3		-	0,4		-	0,019		-	0,06	

CIM<sub>50</sub>/ CIM<sub>90</sub> = concentração inibitória mínima do fármaco capaz de inibir o crescimento de 50% e 90% dos isolados fúngicos, respectivamente; MG= média geométrica dos valores de concentrações inibitórias mínimas; CE= concordância essencial; NR= não realizado.

Os isolados de *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. parapsilosis stricto sensu* demonstraram 100% de concordância categórica para fluconazol e voriconazol, comparando os resultados de Etest<sup>®</sup> e Vitek<sup>®</sup> 2 com o método de referência CLSI (M27-A3).

Para o itraconazol pelo Etest, os isolados de *C. orthopsilosis* apresentaram 72,7% de concordância categórica. Embora nenhum erro grave ou erro muito grave tenha ocorrido, foi encontrado 27,3% de erros mínimos, resultante de três isolados classificados como susceptíveis dependente da dose pelo Etest<sup>®</sup> e susceptível pelo CLSI (M27-A3). Os isolados de *C. metapsilosis* e *C. parapsilosis stricto sensu* apresentaram 100% de concordância categórica para o itraconazol comparando Etest<sup>®</sup> com o CLSI (M27-A3).

Para a anfotericina B, não foram observadas discrepâncias comparando os resultados do Etest<sup>®</sup> com os resultados do CLSI (M27-A3) para as três espécies do complexo *psilosis*, sendo a concordância categórica de 100%. Entretanto, quando os resultados do Vitek<sup>®</sup> 2 foram comparados aos resultados obtidos pelo CLSI (M27-A3), para anfotericina B a concordância categórica foi de 97,5% com 2,5% de erros muito graves de acordo com os critérios adotados no **Quadro 2** do item 4.7 referente à análise de resultados. Isso ocorreu devido a um único isolado de *C. parapsilosis stricto sensu* que foi classificado como susceptível pelo Vitek<sup>®</sup> 2 e considerado resistente pelo CLSI (M27-A3).

Pela análise do coeficiente de correlação intraclasse (CCI), foi possível avaliar estatisticamente a correlação dos resultados de CIMs obtidos pelos métodos Etest<sup>®</sup> e Vitek<sup>®</sup> 2 (AST Card YS01) em relação ao CLSI (M27-A3) para as espécies do complexo *psilosis*, levando em consideração o número de isolados e o valor absoluto das CIMs. Esses resultados estão apresentados nas **Tabelas 7 e 8**. Para análise estatística, todos os resultados de CIM liberados pelo Vitek<sup>®</sup> 2 com o símbolo  $\leq$  a um determinado valor foram considerados como iguais aos valores lidos. Por exemplo,  $\text{CIM} \leq 0,25 \mu\text{g/mL}$  para a anfotericina B, o valor considerado foi  $\text{CIM} = 0,25 \mu\text{g/mL}$ .

Comparando Etest<sup>®</sup> com CLSI (M27-A3), para *C. parapsilosis stricto sensu* a correlação foi boa ( $0,4 < \text{CCI} < 0,75$ ) para a anfotericina B, itraconazol e voriconazol, e excelente ( $\text{CCI} > 0,75$ ) para o fluconazol. Já para *C. orthopsilosis*, a correlação foi boa para anfotericina B, fluconazol e voriconazol, mas foi ruim ( $\text{CCI} < 0,4$ ) para o itraconazol.

Comparando Vitek<sup>®</sup> 2 com CLSI (M27-A3), a correlação foi ruim para anfotericina B tanto para *C. parapsilosis stricto sensu* quanto para *C. orthopsilosis*, embora neste último caso o valor esteja muito próximo de 0,4. No entanto, para o fluconazol em relação a *C. parapsilosis stricto sensu* e *C. orthopsilosis*, a correlação foi excelente e boa, respectivamente. Para o voriconazol, tanto para *C. parapsilosis stricto sensu* quanto para *C.*

*orthopsilosis*, a correlação foi ruim. Não foi possível calcular o CCI para *C. metapsilosis* devido ao número muito reduzido de isolados encontrados neste estudo (N= 2).

Tabela 7. Coeficiente de correlação intraclasse (CCI) comparando os valores de concentrações inibitórias mínimas obtidos pelo Etest<sup>®</sup> em relação ao método CLSI (M27-A3) de *C. parapsilosis stricto sensu* e *C. orthopsilosis*.

Espécie (N° de isolados)	Antifúngicos	Etest <sup>®</sup> / CLSI (M27-A3)		
		CCI (média)	Intervalo de Confiança 95%	
			Limite inferior	Limite superior
<i>C. parapsilosis stricto sensu</i> (40)	Anfotericina B	0,688	0,410	0,835
	Fluconazol	0,756	0,538	0,871
	Voriconazol	0,713	0,457	0,848
	Itraconazol	0,729	0,488	0,857
<i>C. orthopsilosis</i> (11)	Anfotericina B	0,475	-0,975	0,859
	Fluconazol	0,687	-0,164	0,916
	Voriconazol	0,691	-0,149	0,917
	Itraconazol	0,144	-2,183	0,770

Tabela 8. Coeficiente de correlação intraclasse (CCI) comparando os valores de concentrações inibitórias mínimas obtidos pelo Vitek<sup>®</sup> 2 (AST Card YS01) em relação ao método CLSI (M27-A3) de *C. parapsilosis stricto sensu* e *C. orthopsilosis*.

Espécie (N° de isolados)	Antifúngicos	Vitek <sup>®</sup> / CLSI (M27-A3)		
		CCI (média)	Intervalo de Confiança 95%	
			Limite inferior	Limite superior
<i>C. parapsilosis stricto sensu</i> (40)	Anfotericina B	0,272	-0,376	0,615
	Fluconazol	0,762	0,550	0,874
	Voriconazol	0	-0,891	0,471
<i>C. orthopsilosis</i> (11)	Anfotericina B	0,352	-1,410	0,826
	Fluconazol	0,567	-0,608	0,884
	Voriconazol	0	-2,717	0,731

## 6 DISCUSSÃO

A frequência de fungemia em hospitais terciários tem aumentado nas últimas décadas, especialmente entre pacientes hospitalizados em unidades de terapia intensiva, imunocomprometidos, pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos invasivos e recém-nascidos prematuros (PEMÁN *et al.*, 2011). Há diferença na distribuição de espécies de *Candida* associadas à candidemia, sendo observada uma variação entre continentes, países, estados e instituições (TORTORANO *et al.*, 2006; NUCCI *et al.*, 2010; PFALLER *et al.*, 2011), estando também associadas à doença de base, a cateterização e ao uso de profilaxia antifúngica indiscriminada (COLOMBO *et al.*, 2006).

Dentre as espécies não-*albicans*, *C. parapsilosis* vêm emergindo como importante patógeno de candidemia, sendo a espécie comumente isolada de pacientes com infecções hematogênicas em várias partes do mundo nos últimos anos (LOCKHART *et al.*, 2008; DIZBAY *et al.*, 2010; CANTÓN *et al.*, 2011). Na verdade, *C. parapsilosis* é formada por um complexo de três espécies denominadas *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* (TAVANTI *et al.*, 2005).

Conhecer o perfil de susceptibilidade frente aos fármacos antifúngicos do complexo *psilosis* vem sendo necessário devido ao aumento da prevalência dessas espécies associada a episódios de fungemia e, principalmente, à emergência do fenômeno de resistência (LOCKHART *et al.*, 2008; BONFIETTI *et al.*, 2012).

Este é o primeiro estudo comparativo de dois métodos comerciais, Etest® e sistema Vitek® 2, com o método de referência pelo CLSI (M27-A3) para testar a susceptibilidade *in vitro* dos isolados clínicos de *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. parapsilosis stricto sensu* frente aos fármacos antifúngicos anfotericina B, fluconazol, voriconazol e itraconazol.

Embora nossa investigação tenha sido realizada com um número pequeno de amostras (N= 53), os resultados obtidos foram relevantes devido à escassez de informações em relação à frequência e ao perfil de susceptibilidade aos antifúngicos de amostras do complexo de espécies de *C. parapsilosis* nos hospitais no município do Rio de Janeiro.

Os 53 isolados incluídos no nosso estudo, identificados fenotipicamente como pertencentes ao complexo *psilosis*, foram caracterizados por métodos moleculares (ASADZADEH *et al.*, 2009). *C. parapsilosis stricto sensu* foi a espécie mais predominante (75,4%) seguida de *C. orthopsilosis* (20,8%) e *C. metapsilosis* (3,8%). Dados semelhantes a estes foram encontrados num estudo realizado com 141 isolados do complexo *psilosis* a partir

de hemoculturas coletadas de pacientes com candidemia durante um estudo multicêntrico envolvendo 11 hospitais gerais localizados em nove cidades brasileiras entre 2003 e 2004. Este estudo demonstrou a presença de *C. parapsilosis stricto sensu* (88%), *C. orthopsilosis* (9%) e *C. metapsilosis* (3%) (GONÇALVES *et al.*, 2010). Um outro trabalho envolvendo 156 isolados de *Candida não-albicans* oriundos de 11 centros hospitalares em São Paulo, revelou 103 (92,8%) isolados identificados como *C. parapsilosis stricto sensu* e oito (7,2%) identificados como *C. orthopsilosis*. Nenhuma *C. metapsilosis* foi encontrada neste estudo (PURISCO *et al.*, 2012). Outro estudo semelhante ao nosso, também realizado, em São Paulo envolvendo 152 isolados de hemocultura obtidos entre 1997 e 2011, revelou a frequência das três espécies, sendo *C. parapsilosis stricto sensu* (90,8%) a mais frequente, seguida de *C. orthopsilosis* (8,6%) e *C. metapsilosis* (0,6%) (BONFIETTI *et al.*, 2012).

A frequência dessas espécies também foi similar em outros países envolvendo a caracterização do complexo *psilosis*. A primeira descrição global da prevalência das três espécies do complexo *psilosis* mostrou o predomínio de *C. parapsilosis stricto sensu* em relação a *C. orthopsilosis* e a *C. metapsilosis* em diferentes países ou regiões, sendo que a prevalência destas últimas espécies varia geograficamente, podendo ter uma frequência de 10,9% de *C. orthopsilosis* na América do Sul e 0,7% na África. Outro dado interessante é que a proporção de isolados representados por *C. orthopsilosis* está aumentando nos últimos anos, principalmente a partir de 2005 (LOCKHART *et al.*, 2008).

No nosso estudo, a distribuição do número de isolados do complexo *psilosis* presente em três hospitais no município do Rio de Janeiro entre 1998 e 2006 mostra a maior frequência de *C. parapsilosis stricto sensu* circulando nos hospitais HUPE, HSE e HSAM, seguida de *C. orthopsilosis* em dois hospitais HUPE e HSE e *C. metapsilosis* presente apenas no HSE. Nossos dados corroboram a circulação de isolados de *C. orthopsilosis* em hospitais no município do Rio de Janeiro, uma vez que já foi descrita a associação de *C. parapsilosis* grupo II (hoje *C. orthopsilosis*) com um surto de fungemia por *C. parapsilosis* num hospital no estado do Rio de Janeiro (ZANCOPÉ-OLIVEIRA *et al.*, 2000) e destacam a presença de *C. metapsilosis*, embora menos frequente, em isolados clínicos oriundos de hemocultura obtidos de pacientes com fungemia em um dos hospitais estudados.

Nossos resultados, assim como os de outros reportados anteriormente (GOMEZ-LOPEZ *et al.*, 2008a; LOCKHART *et al.*, 2008; ASADZADEH *et al.*, 2009), mostram que isolados clínicos identificados como *C. parapsilosis lato sensu* através de métodos bioquímicos como, por exemplo, o sistema Vitek<sup>®</sup> 2 para identificação de leveduras, na verdade são isolados de *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. parapsilosis stricto sensu*,

demonstrando a importância da biologia molecular para discriminar essas espécies. Até o momento, a distinção entre as três espécies do complexo *psilosis* só é possível por métodos moleculares (TAVANTI *et al.*, 2005).

A rápida identificação de uma levedura isolada de amostra clínica é particularmente importante não só do ponto de vista epidemiológico, mas, sobretudo, terapêutico. Mas isso é complicado devido ao número crescente de patógenos emergentes que não estão incluídos no repertório de *kits* comerciais disponíveis para a identificação das espécies fúngicas. Assim, a identificação, a taxonomia e a análise epidemiológica de leveduras estão cada vez mais dependentes de modernas técnicas moleculares, baseadas na PCR através da amplificação de regiões conservadas do genoma e sequenciamento dos produtos resultantes (BORMAN *et al.*, 2008).

A região ITS, por ser altamente conservada intraespecificamente mas variável entre diferentes espécies, tem se mostrado eficaz para a identificação molecular de leveduras de importância médica (LEAW *et al.*, 2006) e vem sendo utilizada para caracterizar as espécies dentro do complexo *psilosis* (ASADEZADEH *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2010).

Dentre as ferramentas moleculares utilizadas para discriminação e identificação das três espécies do complexo *psilosis* tais como o método PCR-RFLP do gene SADH (SILVA *et al.*, 2009), o sequenciamento da região ITS e da região D1/D2 do rDNA (ASADEZADEH *et al.*, 2009), o método do polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (PCR-AFLP) (HENSGENS *et al.*, 2009), o método baseado na PCR utilizando *primers* espécie-específicos tendo como alvo o gene da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA foi o protocolo de escolha por ser simples e rápido para caracterização do complexo *psilosis* conforme descrito previamente por Asadezadeh *et al.* (2009), pois apresenta maior aplicabilidade em laboratórios clínicos já que não necessita de reações de sequenciamento (ASADEZADEH *et al.*, 2009). No entanto, no nosso estudo dos 53 isolados do complexo *psilosis*, 51 (96,2%) foram identificados por esta metodologia e 2 (3,8%) precisaram ser sequenciados para caracterizar as espécies. Estes dados foram discordantes dos encontrados por Asadezadeh *et al.* (2009), que investigaram 114 isolados clínicos do complexo *psilosis* no Kwait por este método e identificaram 100% de seus isolados, sendo 104 (95,6%) identificados como *C. parapsilosis stricto sensu* e cinco (4,4%) como *C. orthopsilosis*. Nenhum isolado de *C. metapsilosis* foi encontrado na amostragem desses autores (ASADEZADEH *et al.*, 2009). Por outro lado, no nosso estudo foram encontradas duas amostras de *C. metapsilosis* que foram devidamente identificadas por este método.

Nem todas as infecções fúngicas devem ser tratadas da mesma forma. Algumas espécies de leveduras podem apresentar resistência primária (intrínseca) ou secundária (adquirida) a determinados fármacos antifúngicos (RUIZ-CAMPS; CUENCA-ESTRELLA, 2010). A maioria das espécies de *Candida* apresenta boa susceptibilidade aos azólicos. No entanto, *C. albicans* apesar de susceptível ao fluconazol, pode desenvolver resistência secundária após exposição contínua a esse fármaco. Por outro lado, *C. krusei* é intrinsecamente resistente ao mesmo fármaco (SABATELLI *et al.*, 2006). Por isso, a identificação da espécie e os estudos de susceptibilidade antifúngica são muito importantes para a prática clínica (RUIZ-CAMPS; CUENCA-ESTRELLA, 2010).

A padronização de procedimentos de referência para testes de susceptibilidade antifúngica de leveduras pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2008a) tem levado ao desenvolvimento de *kits* ou sistemas comerciais mais simples, de fácil execução e acessíveis para uso nos laboratórios clínicos (BOURGEOIS *et al.*, 2010). Muitos microbiologistas preferem o uso desses sistemas ao método de referência da microdiluição em caldo (M27-A3) preconizado pelo CLSI pelas vantagens oferecidas como facilidade de utilização, economia e resultados mais rápidos (CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 2010b).

Alguns kits ou sistemas comerciais já estão em uso para testes de susceptibilidade aos antifúngicos, dentre eles: o Etest<sup>®</sup> (bioMérieux SA, Marcy l'Etoile, France), o sistema Sensititre YeastOne<sup>®</sup> (Trek Diagnostic Systems Ltd., East Grinstead, England) e mais recentemente, o Vitek<sup>®</sup> 2, que é um sistema automatizado tanto para identificação de leveduras (*Yeast Card*) quanto para determinação da susceptibilidade de uma espécie frente aos fármacos antifúngicos flucitosina, anfotericina B, fluconazol e voriconazol (*AST Card YS01*) (BORGHI *et al.*, 2010; FARINA *et al.*, 2011). Atualmente, já está sendo comercializado pela bioMérieux o cartão *AST Card YS06* composto pelos mesmos fármacos já mencionados e mais a caspofungina, mas o mesmo ainda não está disponível para venda no Brasil.

No nosso estudo, o tempo de incubação para determinar os valores de CIMs variou, sendo menor para o sistema automatizado Vitek<sup>®</sup> 2 (em média 16h), seguido pelo Etest (em média 36h) e pelo método CLSI (M27A3) (em média 40h). Um estudo comparativo avaliando estes três métodos em relação ao tempo de incubação para determinação das CIMs de fármacos antifúngicos para *Candida* spp., indicou que o sistema Vitek<sup>®</sup> 2 foi capaz de determinar os valores de CIM para os agentes antifúngicos depois de cerca de 15 a 26 h de incubação, com um tempo médio de leitura de aproximadamente 15 h (BOURGEOIS *et al.*, 2010). Outro estudo semelhante comparando diferentes métodos como Vitek<sup>®</sup> 2, CLSI,

EUCAST, Sensititre YeastOne<sup>®</sup> e Etest<sup>®</sup> para determinação das CIMs de diferentes fármacos antifúngicos frente a algumas espécies de leveduras, também mostrou que os resultados pelo Vitek<sup>®</sup> 2 foram obtidos no menor tempo possível em relação aos outros métodos, sendo em média 14 a 18 h (média de 15,5 h) para *Candida* spp. e de 34 h para *C. neoformans*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Dipodascus capitatus* (CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 2010b). Esse é um fator importante no manejo terapêutico de pacientes graves.

De acordo com os nossos resultados, em relação ao perfil de susceptibilidade aos antifúngicos *in vitro* dos isolados clínicos de *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. parapsilosis stricto sensu* nenhum isolado foi considerado resistente aos azólicos testados segundo os critérios adotados pelo CLSI (CLSI, 2008b). Entretanto, valores mais elevados de CIM foram observados para o fármaco fluconazol em *C. orthopsilosis* pelos métodos CLSI (M27-A3) (0,25 a 2 µg/mL), Vitek<sup>®</sup> 2 ( $\leq 1$  a 8 µg/mL) e Etest<sup>®</sup> (0,25 a 2 µg/mL). O mesmo perfil foi observado num estudo global a partir de 134 centros hospitalares distribuídos em diferentes países ou regiões sobre a avaliação da susceptibilidade do complexo *psilosis* frente a cinco fármacos antifúngicos pelo método de referência da microdiluição em caldo pelo CLSI, onde os valores de CIMs para o fluconazol também foram mais elevados para *C. orthopsilosis* (a CIM variou de 1 a 4 µg/mL), sendo menores para *C. parapsilosis stricto sensu* e *C. metapsilosis* (LOCKHART *et al.*, 2008). No entanto, nossos dados foram discordantes de um estudo realizado em Portugal envolvendo 169 isolados clínicos do complexo *psilosis* onde somente um isolado de *C. parapsilosis stricto sensu* foi resistente aos azólicos fluconazol, voriconazol e posaconazol pelo método da microdiluição em caldo pelo CLSI (M27-A3). Nenhum isolado de *C. orthopsilosis* ou *C. metapsilosis* foi susceptível dependente da dose ou resistente a estes azólicos. Porém, os intervalos das CIMs para o fluconazol variaram de 0,5 a 1 µg/mL para os isolados de *C. orthopsilosis* e de 1 a 4 µg/mL para os isolados de *C. metapsilosis* (SILVA *et al.*, 2009).

No Brasil, três estudos distintos descrevendo o perfil de susceptibilidade de amostras do complexo *psilosis* observaram que todos os isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* apresentaram valores de CIM mais elevados em comparação a *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, sendo encontrados isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* susceptíveis dependente da dose ou resistentes ao fluconazol (GONÇALVES *et al.*, 2010; BONFIETTI *et al.*, 2012; PURISCO *et al.*, 2012).

Interessantemente, um estudo desenvolvido em Taiwan revelou um isolado de *C. metapsilosis* susceptível dependente da dose e dois isolados desta mesma espécie resistentes

ao fluconazol. *C. parapsilosis stricto sensu* e *C. orthopsilosis* foram susceptíveis a este fármaco (CHEN *et al.*, 2010).

Em um estudo multicêntrico envolvendo 334 isolados do complexo *psilosis* oriundos de 44 instituições de saúde espanholas, quando foi verificada a susceptibilidade *in vitro* frente a nove fármacos antifúngicos pelo método da microdiluição em caldo pelo CLSI (M27-A3), nenhum isolado de *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* foi resistente ao fluconazol de acordo com os pontos de corte clínicos adotados pelo CLSI (CLSI, 2008b). Porém, os intervalos dos valores de CIM mais elevados foram observados para *C. parapsilosis stricto sensu* (0,06 a 32 µg/mL) e *C. orthopsilosis* (0,25 a 16 µg/mL) (CANTÓN *et al.*, 2011).

Em relação ao itraconazol, no nosso estudo houve uma discrepância entre os resultados obtidos pelo Etest<sup>®</sup> e pela microdiluição em caldo pelo CLSI para *C. orthopsilosis* possivelmente devido ao fato da CIM deste fármaco ter sido determinada em 24h pelo CLSI e 48h pelo Etest<sup>®</sup>. Isto ocorreu porque três amostras de *C. orthopsilosis* apresentaram um crescimento disperso no meio sólido, não sendo possível determinar a CIM com 24h (leitura visual), já pelo método CLSI a leitura foi espectrofotométrica. Um estudo comparativo avaliando a susceptibilidade antifúngica de *Candida* spp. isoladas de hemocultura pelo método da microdiluição em caldo pelo CLSI e pelo Etest<sup>®</sup>, descreveu três isolados de *C. parapsilosis* como susceptíveis dependente da dose pelo Etest<sup>®</sup> e susceptíveis pelo CLSI, tal como neste trabalho. No entanto, o tempo de incubação para determinação da CIM foi de 24h para os dois métodos (METIN *et al.*, 2011).

Em relação ao voriconazol, este antifúngico apresentou boa atividade *in vitro* contra *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, sendo todos os isolados do complexo *psilosis* do nosso estudo susceptíveis a este fármaco pelos três métodos analisados. De acordo com um estudo brasileiro que avaliou 109 isolados do complexo *psilosis* obtidos de 11 centros hospitalares localizados no estado de São Paulo no período de janeiro de 2005 a dezembro de 2008, *C. parapsilosis stricto sensu* e *C. orthopsilosis* também foram susceptíveis ao voriconazol. Nenhuma *C. metapsilosis* foi encontrada neste estudo (PURISCO *et al.*, 2012). No entanto, um outro estudo brasileiro também realizado no estado de São Paulo, porém mais abrangente, envolvendo isolados obtidos desde 1997 até 2011, mostrou três isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* resistentes ao voriconazol (BONFIETTI *et al.*, 2012). Dados internacionais demonstram intervalos de valores de CIMs mais elevados para o voriconazol em *C. parapsilosis stricto sensu* (GOMEZ-LOPEZ *et al.*, 2008; CANTÓN *et al.*,

2011) ou resistência frente a este fármaco para essa espécie (SILVA *et al.*, 2009; BORGHI *et al.*, 2011).

Até agora, não foram estabelecidos pontos de corte clínicos para anfotericina B de acordo com documento do CLSI (CLSI 2008a). Entretanto, CIM > 1 µg/mL sugere resistência a este fármaco. Desta forma, neste estudo um isolado de *C. parapsilosis stricto sensu* foi considerado resistente à anfotericina B pelo método da microdiluição em caldo pelo CLSI (M27-A3) e pelo Etest<sup>®</sup>. *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* foram susceptíveis a este fármaco. Embora seja rara a resistência à anfotericina B para *Candida* spp., há relatos de isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* considerados resistentes à anfotericina B (SILVA *et al.*, 2009; CANTÓN *et al.*, 2011). *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* também já foram descritas com CIMs ≥ 4 µg/mL para anfotericina B (LOCKHART *et al.*, 2008). Em relação ao Brasil, os estudos disponíveis não encontraram resistência à anfotericina B entre as espécies do complexo *psilosis* (GONÇALVES *et al.*, 2010; BONFIETTI *et al.*, 2012; PURISCO *et al.*, 2012).

Novos pontos de corte clínicos espécie-específicos e valores de *cutoff* epidemiológicos (ECVs) foram determinados para *Candida* spp. pelo método de referência da microdiluição em caldo pelo CLSI (CLSI, 2008a) para os azólicos e as equinocandinas. Os ECVs foram estabelecidos para diferenciar cepas tipo selvagem (aquelas sem resistência adquirida ou mutações) de cepas tipo não-selvagem (aquelas com resistência adquirida ou com mutações). Em relação ao complexo *psilosis*, os novos pontos de corte foram definidos somente para *C. parapsilosis stricto sensu* até o momento (PFALLER *et al.*, 2011).

Para a anfotericina B, a flucitosina e o itraconazol foram determinados apenas ECVs para oito *Candida* spp., incluindo *C. parapsilosis*. Na ausência de pontos de corte clínicos, os valores de *cutoff* epidemiológicos (ECVs) podem ajudar a caracterizar a susceptibilidade de *Candida* spp. para anfotericina B, flucitosina e itraconazol, e assim monitorar a emergência de isolados com mutações que podem levar a uma susceptibilidade reduzida ou resistência à estes fármacos (PFALLER *et al.*, 2012).

De acordo com esses novos critérios (PFALLER *et al.*, 2011; 2012), os isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* foram susceptíveis ao fluconazol e ao voriconazol pelo método da microdiluição em caldo pelo CLSI (M27-A3) e apresentaram CIM ≤ 2 µg/mL e CIM ≤ 0,12 µg/mL, respectivamente, classificando os isolados como tipo selvagem. Para a anfotericina B ainda não há pontos de cortes clínicos definidos, mas CIM ≤ 2 µg/mL conforme encontrado neste estudo para um isolado de *C. parapsilosis stricto sensu* classifica este isolado como tipo selvagem, pois o valor de CIM foi ≤ ECV para a anfotericina B. Já para o itraconazol, os

isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* foram susceptíveis a este fármaco. Estes isolados também foram classificados como tipo selvagem, pois a CIM foi  $\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$  ( $\text{CIM} \leq \text{ECV}$ ) para o itraconazol.

Analisando os métodos Etest<sup>®</sup>, Vitek<sup>®</sup> 2 e CLSI (M27-A3) é possível observar que praticamente não houve variabilidade entre os valores obtidos em relação ao percentual de concordância essencial e categórica, sendo encontrado para a maioria das análises 100% de correlação, com exceção para o itraconazol e anfotericina B.

Em relação ao itraconazol, os valores de concordância essencial e categórica foram menores (90,9% e 72,7%, respectivamente) diante de isolados de *C. orthopsilosis* pelo método Etest<sup>®</sup> em comparação ao CLSI (M27-A3). Analisando a concordância categórica entre Etest<sup>®</sup> e CLSI (M27-A3), somente erros mínimos foram detectados para o itraconazol contra os isolados de *C. orthopsilosis*. Esses dados foram consistentes com estudos que avaliaram o Etest<sup>®</sup> e o método CLSI (M-27A3) para determinar a susceptibilidade antifúngica de outras espécies de *Candida* (ALEXANDER *et al.*, 2007; CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 2010b).

Para anfotericina B, houve uma variação em um isolado de *C. parapsilosis stricto sensu* quando os resultados do Vitek<sup>®</sup> 2 foram comparados com o CLSI (M27-A3). Essa variação foi classificada, de acordo com o **Quadro 2** do item 4.7 referente à análise de resultados, como um erro muito grave, apesar de neste caso ter obtido 100% de concordância essencial. Esse achado foi similar a estudos comparativos entre os métodos Vitek<sup>®</sup> 2 e CLSI (M27-A3) para o mesmo agente antifúngico (BOURGEOIS *et al.*, 2010; PFALLER *et al.*, 2007b).

O coeficiente de correlação intraclasse (CCI) é uma das ferramentas estatísticas mais utilizadas para a mensuração da confiabilidade de medidas. Em termos gerais, é dado pela razão da variância entre grupos e a variância total. O CCI é adequado para mensurar a homogeneidade de duas ou mais medidas e é interpretado como a proporção da variabilidade total atribuída ao objeto medido (SHROUT; FLEISS, 1979).

No nosso estudo, o CCI entre o método comercial Etest<sup>®</sup> com o método de referência pelo CLSI (M27-A3) indicou que há boa correlação entre os métodos para quase todos os fármacos testados em relação a *C. parapsilosis stricto sensu* e a *C. orthopsilosis*, exceto para o itraconazol para a espécie de *C. orthopsilosis*. Este fato pode estar relacionado ao número reduzido de isolados de *C. orthopsilosis* e também provavelmente devido aos três isolados de *C. orthopsilosis* que apresentaram valores de CIM mais elevados para o Etest<sup>®</sup> do que para o CLSI (M27-A3).

Por outro lado, o CCI entre Vitek<sup>®</sup> 2 e o CLSI (M27-A3) indicou que há boa correlação entre os métodos para o fluconazol em relação a *C. parapsilosis stricto sensu* e *C. orthopsilosis*. Entretanto, a correlação foi ruim entre os métodos para anfotericina B e voriconazol. Isto pode ser explicado pela pouca variabilidade do valor de CIM encontrado na estreita faixa de valores de concentrações dos antifúngicos observada no Vitek<sup>®</sup> 2, e pelo fato de não ser determinado o valor exato da CIM, sendo uma limitação da técnica. Isso fica evidente para o voriconazol, pois neste estudo não houve variabilidade entre os valores de CIMs encontrados pelo Vitek<sup>®</sup> 2 para este fármaco, sendo todos os valores  $\leq 0,12 \mu\text{g/mL}$ .

Em geral, os resultados da análise estatística para determinar o coeficiente de correlação intraclasse (CCI) comparando os métodos Etest<sup>®</sup> e Vitek<sup>®</sup> 2 com o método de referência pelo CLSI (M27-A3) foram concordantes com os resultados obtidos pela análise de concordância essencial e categórica, inclusive em relação aos valores mais baixos.

Em resumo, a concordância dos resultados obtidos pelo Etest<sup>®</sup> e pelo Vitek<sup>®</sup> 2 comparados ao método de referência de microdiluição em caldo pelo CLSI (M-27A3) foi elevada, demonstrando resultados de CIMs reprodutíveis e acurados. Estes dados estão de acordo com estudos realizados com outras espécies de *Candida* (SIMS *et al.*, 2006; PFALLER *et al.*, 2007b; CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 2010b; PETERSON *et al.*, 2011). É importante considerar que o sistema Vitek<sup>®</sup> 2 é um método totalmente automatizado, eliminando a subjetividade de leitura que é inerente aos métodos Etest<sup>®</sup> e CLSI (M27-A3). Assim, esse estudo reforça a importância dos métodos comerciais Etest<sup>®</sup> e Vitek<sup>®</sup> 2 como ferramentas úteis e de fácil aplicabilidade na rotina dos laboratórios microbiológicos clínicos para testes de susceptibilidade antifúngica. Além disso, foram demonstradas diferenças sutis no perfil de susceptibilidade antifúngica dos isolados de *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. Essas diferenças podem ser importantes na escolha terapêutica para tratamento de infecções invasivas causadas por essas espécies, contudo a resposta clínica do paciente em relação ao fármaco deve ser levada em consideração.

É importante ressaltar que este estudo foi retrospectivo sendo os isolados do complexo *psilosis* oriundos de hemoculturas obtidas entre 1998 e 2006, portanto, pode ter ocorrido uma emergência de resistência ou mudança na frequência de *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* no município do Rio de Janeiro de 2006 até o momento. Sendo assim, são necessários estudos futuros para o monitoramento da frequência e para a investigação do perfil atual da susceptibilidade aos antifúngicos dessas espécies neste município.

## 7 CONCLUSÕES

1. Não foram observadas características fenotípicas e/ ou bioquímicas específicas capaz de distinguir as espécies do complexo *psilosis*.
2. As três espécies do complexo *psilosis* foram identificadas molecularmente na nossa amostragem, sendo *C. parapsilosis stricto sensu* a espécie predominante nos hospitais do município do Rio de Janeiro estudados, seguida de *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, respectivamente.
3. A PCR utilizando *primers* espécie-específicos não foi 100% eficiente para discriminar e caracterizar os 53 isolados do complexo *psilosis*, sendo necessária uma segunda metodologia para tal.
3. A comparação entre os três métodos para determinar o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos *in vitro* demonstrou que os isolados de *C. parapsilosis stricto sensu* foram menos susceptíveis a anfotericina B; *C. orthopsilosis* foram menos susceptíveis ao fluconazol e ao itraconazol; *C. metapsilosis* foram mais susceptíveis aos quatro fármacos testados.
4. A concordância essencial e categórica obtida pelo Etest<sup>®</sup> e Vitek<sup>®</sup> 2 quando comparada ao CLSI (M27-A3) foi alta (100%), exceto para o itraconazol pelo Etest<sup>®</sup> e anfotericina B pelo Vitek<sup>®</sup> 2.
5. As análises estatísticas pelo coeficiente de correlação intraclassa (CCI) comparando os métodos Etest<sup>®</sup> e Vitek<sup>®</sup> 2 com o método de referência pelo CLSI (M27-A3) indicaram uma boa correlação entre os métodos para os diferentes antifúngicos testados, exceto para o itraconazol pelo Etest<sup>®</sup>; e para a anfotericina B pelo Vitek<sup>®</sup> 2.
6. Este estudo confirma que há concordância entre os métodos e reforça a importância de utilizá-los nos laboratórios clínicos rotineiros para determinar o perfil de susceptibilidade *in vitro* frente a anfotericina B, fluconazol, voriconazol e itraconazol para as espécies de *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*.

## REFERÊNCIAS

Adler-Shohet F, Waskin H, Lieberman M. Amphotericin B lipidic complex for neonatal invasive candidiasis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*. 2001;84:131-133.

Alastruey-Isquierdo A, Castelli MV, Cuesta I, Zaragoza O, Monzón A, Mellado E, *et al*. In vitro activity of antifungals against Zygomycetes. *Clin Microbiol Infect*. 2009;Suppl 5:71-76.

Alexander BD, Byrne TC, Smith KL, Kimberly EH, Keven JA, Perfect JR. Comparative evaluation of Etest and Sensititre YeastOne panels against the Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A2 reference broth microdilution method for testing *Candida* susceptibility to seven antifungal agents. *J Clin Microbiol*. 2007;45(3):693-706.

Almirante B, Rodriguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, *et al*. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol*. 2005;43(4):1829-1835.

Almirante B, Rodriguez D, Cuenca-Estrella M, Almela M, Sanchez F, Ayats J, *et al*. Epidemiology, risk factors and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infection: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol*. 2006;44(5):1681-1685.

Anaisse EJ. Diagnosis and therapy of fungal infection in patients with leukemia-new drugs and immunotherapy. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2008;21(4):683-690.

Anaisse EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. *Clinical Micology*. Philadelphia (PA): Churchill Livingstone; 2003.

Arendrup M, Garcia-Effron G, Lass-Flörl C, Lopez AG, Rodriguez-Tudella JL, Cuenca-Estrella M, *et al*. Echinocandin susceptibility testing of *Candida* species: comparison of EUCAST EDef 7.1, CLSI M27-A3, Etest, disk diffusion, and agar dilution methods with RPMI and isosensitest media. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(1):426-439.

Arikan S. Current status of antifungal susceptibility methods. *Med Mycol.* 2007;45(7):569-587.

Asadzadeh M, Ahmad S, Al-Sweih N, Khan ZU. Rapid molecular differentiation and genotypic heterogeneity among *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* strains isolated from clinical specimens Kuwait. *J Med Microbiol.* 2009;58:745-752.

Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, *et al.* Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis.* 2002;34:7-13.

Ashford B. Certain conditions of the gastrointestinal tract in Puerto Rico and their relation to tropical sprue. *Am J Trop Med Hyg.* 1928;8:507-538.

Atkins SD, Clark IM. Fungal molecular diagnostics: a mini review. *J Appl Genet.* 2004;45(1):3-15.

Barberan J, Mensa J, Farinas C, Llinares P, Serrano R, Menendez R, *et al.* Recommendations of antifungal treatment in patients with low grade immunosuppression. *Rev Esp Quimioter.* 2008;21(2):127-142.

Barnes PD, Marr KA. Risks, diagnosis, and outcome of invasive fungal infections in haematopoietic stem cell transplant recipients. *Br J Haematol.* 2007;139:519-531.

Berenguer J, Buck M, Witebsky F, Stock F, Pizzo PA, Walsh TJ. Lysis-centrifugation blood cultures in the detection of tissue-proven invasive candidiasis. Disseminated versus single-organ infection. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1993;17(2):103-109.

Bertout S, Dunyach C, Drakulovski P, Reynes J, Mallié M. Comparison of the Sensititre Yeast One dilution method with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3 microbroth dilution reference method for determining MIC of eight antifungal agents on 102 yeast strain. 2011;59(1):48-51.

Bodey GP, Mardani M, Hanna HA, Boktour M, Abbas J, Girgawy E, *et al.* The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* fungemia in immunocompromised patients with cancer. *Am J Med.* 2002;112:380-385.

Bonfietti, LX, Martins MA, Szeszs MW, Pukiskas SB, Purisco SU, Pimentel FC, *et al.* Prevalence, distribution and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* bloodstream isolates. *J Med Microbiol.* 2012;61(pt7):1003-1008.

Borg-von Zepelin M, Kunz L, Röchel R, Reichard U, Weig M, Gross U, *et al.* Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. To six antifungal agents: results from a surveillance study in Germany from July 2004 to August 2005. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(2):424-428.

Bourgeois N, Dehandschoewercker L, Bertout S, Bousquet PJ, Rispaël P, Lachaud L. Antifungal susceptibility of 205 *Candida* spp. isolated primarily during invasive candidiasis and comparison of the vitek 2 system with the CLSI broth microdilution and Etest methods. *J Clin Microbiol.* 2010;48(1):154-161.

Borghi E, Iatta R, Sciota R, Biassoni C, Cuna T, Montagna MT, *et al.* Comparative evaluation of the Vitek 2 yeast susceptibility test and CLSI broth microdilution reference method for testing antifungal susceptibility of invasive fungal isolates in Italy: the GISIA3 study. 2010;48(9):3153-3157.

Borghi E, Sciota R, Iatta R, Biassoni C, Montagna MT, Morace G. Characterization of *Candida parapsilosis* complex strains isolated from invasive fungal infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011;30:1437-1441.

Bormann AM, Linton CJ, Miles S-J, Johnson EM. Molecular identification of pathogenic fungi. *J Antimicrob Chemoter.* 2008;61 Suppl 1:i7-12.

Borman AM, Linton CJ, Oliver D, Palmer MD, Szekely A, Johnson EM. Rapid molecular identification of pathogenic yeasts by pyrosequencing analysis of 35 nucleotides of internal transcribed spacer 2. *J Clin Microbiol.* 2010;48(10):3648-3653.

Borst A, Fluit AC. High levels of hydrolytic enzymes secreted by *Candida albicans* isolates involved in respiratory infections. *J Med Microbiol.* 2003;52(Pt 11):971-974.

Bougnoux ME, Dupont C, Mateo J, Saulinier P, Faivre V, Payen D, *et al.* Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by Nested PCR. *J Clin Microbiol.* 1999;37(4):925-930.

Brito LR, Guimarães T, Nucci M, Rosas RC, Almeida LP, Matta DA, Colombo AL. Clinical and microbiology aspects of candidemia due to *C. parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. *Medical Mycology.* 2006;44:261-266.

Buchman TG, Rossier M, Merz WG, Charache P. Detection of surgical pathogens by *in vitro* DNA amplification. Part I. Rapid identification of *Candida albicans* by *in vitro* amplification of a fungus-specific gene. *Surgery.* 1990;108(2):338-346.

Cantón E, Pemán J, Quindós G, Eraso E, Miranda-Zapico I, Álvarez M, *et al.* Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. *Antimicrob Agents Ch.* 2011;55(12):5590-5596.

Carvalho A, Costa-De-Oliveira S, Martins ML, Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Ludovico P, *et al.* Multiplex PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species. *Med Mycol.* 2007;45:619-627.

Cassone A, De Bernardis F, Pontieri E, Carruba G, Girmenia C, Martino P, *et al.* Biotypic diversity of *Candida parapsilosis* and its relationship to the clinical source and experimental pathogenicity. *J Infect Dis.* 1995;171:967-975.

Celebi S, Hacimustafaoglu M, Ozdemir O, Ozkaya G. Nosocomial candidemia in children: results of a 9-year study. *Mycoses.* 2008;51(3):248-257.

Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassouljian-Barrett SL, LaFe K, Bui U, *et al.* Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts. *J Clin Microbiol.* 2001;39(11):4042-4051.

Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassouljian-Barrett SL, LaFe K, Yarfitz SL, *et al.* Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *J Clin Microbiol.* 2000;38(6):2302-2310.

Chen YR, Lin LC, Young TG, Liu CE, Chen CH Tsay RW. Risk factors for candidemia-related mortality at a medical center in Taiwan. *J. Microbiol Immunol Infect.* 2006;39:155-161.

Chen YC, Lin YH, CHEN KW, Lii J, Teng HJ, Li SY. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010;68(3):284-292.

Chang HC, Leaw SN, Huang AH, Wu TL, Chang TC. Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by multiplex PCR methods. *J Clin Microbiol.* 2001;39(10):3466-3471.

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

Claudino AL, Peixoto RF Jr, Melhem MS, Szeszs MW, Lyon JP, Chavasco JK, *et al.* Correlation between CLSI, EUCAST, and Etest methodologies for amphotericin B and fluconazole antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. clinical isolates. *Pharmazie.* 2008;63(4):286-289.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pa. 1997.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard – second edition M27-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pa. 2002a.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard – second information supplement M27-S2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pa. 2002b.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard – Third edition. CLSI document M-27A3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pa. 2008a.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard – Third information supplement. CLSI document M-27 S3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA. 2008b.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. Approved guideline – Second edition. CLSI document M44-A2. Wayne, PA:2009a.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. Approved guideline – Second edition supplement CLSI document M44-S3. Wayne, PA:2009b.

Colombo AL. Epidemiology and treatment of hematogenous candidiasis: a Brazilian perspective. *Brazilian J Infect Dis.* 2000;4:113-118.

Colombo AL, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida spp.* *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;36(5):599-607.

Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, *et al.* Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol.* 2006;44(8):2816-2823.

Córdoba S, Vivot W, Bosco-Brogeat ME, Taverna C, Murisengo O, Isla G, *et al.* Species distribution and susceptibility profile of yeasts isolated from blood cultures: results of a multicenter active laboratory-based surveillance study in Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2011;43(3):176-185.

Cornely OA, Böhme A, Buchheidt D, Einsele H, Heinz WJ, Karthaus M, *et al.* Primary prophylaxis of invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies. Recommendations of the infectious diseases working party of the German Society for Haematology and Oncology. *Haematologica.* 2009;94(1):113-122.

Conde-Rosa A, Amador R, Perez-Torres D, Cólón E, Sánchez-Rivera C, Nievas-Plaza M, *et al.* Candidemia distribution, associated risk factors, and attributed mortality at a university-based medical center. *P R Health.* 2010; 29(1): 26-29.

Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Should antifungal treatments be based upon results fo antifungal susceptibility testing? *Rev Iber Micol.* 2002;19(3):133-138.

Cuenca-Estrella M, Lee-Yang W, Ciblak MA, Arthington-Skaggs BA, Mellado E, Warnock DW, *et al.* Comparative evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST broth microdilution procedures for antifungal susceptibility testing of *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(11):3644-3647.

Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Mellado E, Buitrago MJ, Monzon A, Rodriguez-tudella JL. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3.378 spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(3):917-921.

Cuenca-Estrella M. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. *Rev Esp Quimioter.* 2010a; 23(4):169-176.

Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Bernal-Martinez L, Cuesta I, Buitrago MJ. Comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility system with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Comité on Antimicrobial Susceptibility

Testing (EUCAST) broth microdilution referent methods and with the Sensititre YeastOne and Etest techniques for *in vitro* detection of resistance in yeast isolates. J Clin Microbiol. 2010b;48(5):1782-1786.

Dagdeviren M, Cerikcioglu N, Karavus M. Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* strains isolated from clinical specimens of hospitalized patients. Mycoses. 2005;48(5):321-326.

Da Matta DA, de Almeida LP, Machado AM, Azevedo AC, Kusano EJ, Travassos NJ, *et al.* Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007;57(4):399-404.

De Luca C, Guglielminetti M, Ferraro A, Calabr M, Casari E. Candidemia: species involved, virulence factors and antimycotic susceptibility. New Microbiol. 2012;35(4):459-468.

Denning DW. Echinocandins: a new class of antifungal. J Antimicrob Chemother. 2002; 49(6):889-891.

Denning DW, Hope WW. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. Trends Microbiol. 2010;18(5):195-204.

de Toro M, Torres MJ, Maite R, Aznar J. Characterization of *Candida parapsilosis* complex isolates. Clin Microbiol Infect. 2011;17(3):418-424.

Diekema DJ, Messer SA, Boyken LB, Hollis RJ, Kroeger J, Tendolkar S, *et al.* In vitro activity of seven systemically active antifungal agents against a large global collection of rare *Candida* species as determined by CLSI broth microdilution methods. J Clin Microbiol. 2009;47(10):3170-3177.

Dignani MC, Solomkin JS, Anaisse E. Candida. In: Anaisse E, Mcginnis MR, Pfaller MA, editors. Medical Mycology. 1<sup>a</sup> edição. Filadélfia:Churchill Livingstone;2003:p195-239.

Dizbay M, Findan I, Kalkanci A, Sari N, Yalcin B, Kustimur S, *et al.* High incidence of *Candida parapsilosis* candidaemia in non-neutropenic critically ill patients: epidemiology and antifungal susceptibility. *Scand J Infect Dis.* 2010;42(2):114-120.

Eggimann P, Bille J, Marchetti O. Diagnosis of invasive candidiasis in the ICU. *Ann Intensive Care.* 2011;1:1-37.

Ellepola ANB, Morrison CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *The J Microbiol.* 2005;43(5):65-84.

Enger L, Joly S, Pujol C, Simonson P, Pfaller M, Soll DR. Cloning and characterization of a complex DNA fingerprinting probe for *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol.* 2001;39(2):658-669.

Eraso E, Moragues MD, Villar-Vidal M, Sahand IH, González-Gómez N, Pontón J, *et al.* Evaluation of the new chromogenic medium *Candida* ID2 for isolation and identification of *Candida albicans* and other medically important *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 2006;44(9):3340-3345.

Espinel-Ingroff A. Clinical utility of *in vitro* antifungal susceptibility testing. *Rev Esp Quimioter.* 2000;13(2):161-166.

Farina C, Manso E, Andreoni S, Conte M, Fazii P, Lombardi G *et al.* Interlaboratory evaluation of Vitek 2 system and Sensititre YeastOne for antifungal susceptibility testing of yeasts isolated from blood cultures against four antifungal agents. *New Microbiol.* 2011;34(2):195-201.

Food and Drug Administration. 2003. Classe II special control guidance document: antimicrobial susceptibility test systems; guidance for industry. Food and Drug Administration, Washington DC.

Freydiere AM, Guinet R, Boiron P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Med Mycol.* 2001;39(1):9-33.

Fundyga RE, Kuykendall RJ, Lee-Yang W, Lott TJ. Evidence for aneuploidy and recombination in the human commensal yeast *Candida parapsilosis*. *Infect Genet Evol.* 2004;4:37-43.

Gácsér A, Trofa D, Schäfer W, Nosanchuk JD. Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. *J Clin Invest.* 2007;117(10):3049-3058.

Garcia-Effron G, Lee S, Park S, Cleary JD, Perlin DS. Effect of *Candida glabrata* FKS1 e 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(9):3690-3699.

Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13(1):122-143.

Giolo MP, Estivalet-Svidzinski TI. Physiopathogenesis, epidemiology and laboratory diagnosis of candidemia. *J Bras Patol Med Lab.* 2010;46(3):225-234.

Giusiano GE, Mangiaterra M, Rojas F, Gomes V. Yeasts species distribution in neonatal intensive care units in northeast Argentina. *Mycoses.* 2004;47(7):300-303.

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;(3):401-405.

Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Rodriguez D, Almirante B, Pahissa A, Rodríguez-Tudella JL *et al.* Prevalence and susceptibility of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: results from population-based surveillance of candidemia in Spain. *Antimicrob Agents and Chemother.* 2008a;52:1506-1509.

Gomez-Lopez A, Zaragoza O, Rodríguez-Tudella JL, Cuenca-Estrella M. Pharmacotherapy of yeast infections. *Expert Opin Pharmacother.* 2008b;9(16):2801-2816.

Gonçalves SS, Amorim CS, Nucci M, Padovan ACB, Briones MRS, Melo ASA, *et al.* Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis* species complex: results from a nationwide surveillance of candidaemia in Brazil. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:885-887.

Gudlaugsson O, Giuseppe K, Lee K, Vande BJ, Hu J, Messer S *et al.* Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis.* 2003;37:1172-1177.

Guery BP, Arendrup MC, Auzinger G, Azoulay E, Borges Sá M, Johnson EM, *et al.* Management of invasive candidiasis and candidemia in adult non-neutropenic intensive care unit patients: Part I. Epidemiology and diagnosis. *Intensive Care Med.* 2009;35(1):55-62.

Guimarães T, Nucci M, Mendonça JS, Martinez R, Brito LR, Silvia N, *et al.* Epidemiology and predictors of a poor outcome in elderly patients with candidemia. *Int J Infect Dis.* 2012;16:442-447.

Hassan I, Powell G, Sidhu M, Hart WM, Denning DW. Excess mortality, length of stay, and cost attributable to candidaemia. *J Infect.* 2009;59:360-365.

Hata DJ, Hall L, Fothergill AW, Larone DH, Wengenack NL. Multicenter evaluation of the new VITEK 2 advanced colorimetric yeast identification card. *J Clin Microbiol.* 2007;45(4):1087-1092.

Hazen KC, Howell SA. *Candida*, *Cryptococcus*, and other yeast of medical importance. Murray PR, Banon EJ, Jorgensen JH, Landy ML, Pfaller MA in: *Clinical Microbiology*. Washington DC. Asc. Press. 2007;1762-1788.

Hensgens LA, Tavanti A, Mogavero, S, Ghelardi E, Senesi S. AFLP genotyping of *Candida metapsilosis* clinical isolates: evidence for recombination. *Fungal Genet Biol.* 2009;46(10):750-758.

Horn DL, Neofytos D, Anaisse E, Fishman J, Steinbach W, Olyaei A, *et al.* Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *CDI.* 2009;48:1695-1703.

Horvath LL, George BJ, Murray CK, Harrison LS, Hospenthal DR. Direct comparison of the BACTEC 9240 and BacT/ALERT 3D automated blood culture systems for *Candida* growth detection. J Clin Microbiol. 2004;42(1):115-118.

Hospenthal DR, Murray CK, Rinaldi MG. The role of antifungal susceptibility testing in the therapy of candidiasis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2004;48(3):153-160.

Joachim H, Polayes S. Subacute endocarditis and systemic mycosis (monilia). JAMA. 1940;205-208.

Kantarcioglu AS, Yucel A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. Mycoses. 2002;45(5-6):160-165.

Kato M, Ozeki M, Kikuchi A, Kanbe T. Phylogenetic relationship and mode of evolution of yeast DNA topoisomerase II gene in the pathogenic *Candida* species. Gene. 2001;272(1-2):275-281.

Kim S, Ko SK, Moon SY, Lee MS, Lee MY, Son JS. Catheter-related candidemia caused by *Candida haemulonii* in a patient in long-term hospital care. J Korean Med Sci. 2011;26(2):297-300.

Kim SK, El Bissati K, Mamoun CB. Amino acids mediate colony and cell differentiation in the fungal pathogen *Candida parapsilosis*. Microbiology. 2006;152(Pt10):2885-2894.

Klotz SA, Chasin BS, Powell B, Gaur NK, Lipke PN. Polymicrobial bloodstream infections involving *Candida* species: analysis of patients and review of the literature. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007;59(4):401-406.

Kocsubé S, Tóth M, Vágvölgyi C, Dóczi I, Pesti M, Pócsi I, *et al.* Occurrence and genetic variability of *Candida parapsilosis* sensu lato in Hungary. J Med Microbiol. 2007;56:190-195.

Kuhn DM, Mikherjee PK, Clark TA, Pujol C, Chandra J, Hajjed RA, Warnock DW, Soil DR, Ghannoum MA. *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(6):1074-1081.

Kumar CP, Menon T. Biofilm production by clinical isolates of *Candida* species. *Med Mycol.* 2006;44:99-101.

Laffey SF, Butler G. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology.* 2005;151:1073-1081.

Laín A, Moragues MD, García-Ruiz JC, Mendoza J, Camacho A, Palacio A, Pontón J. Evaluation of a novel enzyme-linked immunosorbent assay to detect immunoglobulin G antibody to enolase for serodiagnosis of invasive candidiasis. *Clin and Vaccine Immunol.* 2007;14(3):318-319.

Larone DH. *Medically important fungi: a guide to identification.* 4<sup>th</sup> edition. Washington, DC: American Society for Microbiology Press; 2002.

Leaw SN, Chang HC, Sun HF, Barton R, Bouchara JP, Chang TC. Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. *J Clin Microbiol.* 2006;44(3):693-699.

Lehmann PF, Lin D, Lasker BA. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *J Clin Microbiol.* 1992;30(12):3249-3254.

Levin AS, Costa SF, Mussi NS, Basso M, Sinto SI, Machado C, *et al.* *Candida parapsilosis* fungemia associated with implantable and semi-implantable central venous catheters and the hands of healthcare workers. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1998;30(4):243-249.

Lin, D, Wu LC, Rinaldi MG, Lehmann PF. Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. *J Clin Microbiol.* 1995;33:1815-1821.

Linder N, Klinger G, Shalit I, Levy I, Ashkenazi S, Haski G *et al.* Treatment of candidaemia in premature infants: comparison of three amphotericin B preparations. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52:663-667.

Linton CJ, Borman AM, Cheung G, Holmes AD, Szekely A, Palmer MD, *et al.* Molecular identification of unusual pathogenic yeast isolates by large ribosomal subunit gene sequencing: 2 years of experience at the United Kingdom mycology reference laboratory. *J Clin Microbiol.* 2007;45(4):1152-1158.

Lockhart SR, Igbal N, Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, Bolden CB, *et al.* Species identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* bloodstream isolates from population-based surveillance studies in two u.s. cities from 2008 to 2011. *J Clin Microbiol.* 2012;50(11):3435-3442.

Lockhart SR, Messer AS, Pfaller MA, Diekema DJ. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly describe species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol.* 2008;46(8):2659-2664.

Luo G, Samaranayake LP, Cheung BP, Tang G. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of HLP expression in *Candida glabrata* and its possible role in vitro haemolysin production. *APMIS.* 2004;112(4-5):283-290.

Lupetti A, Tavanti A, Davini P, Ghelardi E, Corsini V, Merusini I, *et al.* Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* candidemia in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol.* 2002;40(7):2363-2369.

Maaroufi Y, Ahariz N, Husson M, Crokaert F. Comparison of different methods of isolation of DNA of commonly encountered *Candida* species and its quantitation by using a real-time PCR-based assay. *J Clin Microbiol.* 2004;42(7):3159-3163.

Manual do API<sup>®</sup> 20 C AUX, Sistema de identificação das leveduras, bioMérieux, França. Referência 20 210, 07628G-pt. Março de 2003.

Medeiros EA, Lott TJ, Colombo AL, Godoy P, Coutinho AP, Braga MS, *et al.* Evidence for a pseudo-outbreak of *Candida guilliermondii* fungemia in a university hospital in Brazil. *J. Clin Microbiol.* 2007;45:942-947.

Mensa J, Pitart C, Marco F. Treatment of critically ill patients with candidemia. *Int J Antimicrob Agents.* 2008;32(2):S93-S97.

Metin DY, Hilmioglu-Polat S, Samlioglu P, Doganay-Oflazoglu B, Inci R, Tumbay E. Evaluation of antifungal susceptibility testing with microdilution and Etest methods of *Candida* blood isolates. *Mycopathologia.* 2011;172(3):187-199.

Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação nacional de medicamentos essenciais. Formulário terapêutico nacional: RENAME/ Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. -7<sup>a</sup> ed.- Brasília: Ministério da Saúde. Brasil. 2010;250p:il (Série B. Textos básicos de saúde).

Moreira-Oliveira MS, Mikami Y, Miyaji M, Miyaji M, Imai T, Schreiber AZ, *et al.* Diagnosis of candidemia by polymerase chain reaction and blood culture: prospective study in a high-risk population and identification of variables associated with development of candidemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005;24:721-726.

Moretti ML, Trabasso P, Lyra L, Fagnani R, Resende MR, de Oliveira Cardoso LG, *et al.* Is the incidence of candidemia caused by *Candida glabrata* increasing in Brazil? Five-year surveillance of *Candida* bloodstream infection in a university reference hospital in southeast Brazil. *Med Mycol.* 2012 [Epub ahead of print].

Morgan J. Global trends in candidemia: review of reports from 1995-2005. *Clin Infect Dis.* 2005a;7:429-439.

Morgan J, Meltzer MI, Plikayts BD, Sofair AN, Huie-White S, Wilcox S, *et al.* Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: a case-control study using data from

population-based candidemia surveillance. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2005b;26:540-547.

Morschhauser J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol.* 2010;47(2):94-106.

Moudgal V, Little T, Boikov D, Vasquez JA. Multiechinocandin- and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:767-769.

Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Andes D. Beta-1,3 glucan as a test for central venous catheter biofilm infection. *J Infect Dis.* 2007;195(11):1705-1712.

Nosek J, Tomáška L, Ryčovská A, Fukuhara H. Mitochondrial telomeres as molecular markers for identification of the opportunistic yeast pathogen *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol.* 2002;40(4):1283-1289.

Nucci M, Anaisse E. Revisiting the source of candidemia: skin or gut? *Clin Infect Dis.* 2001;33:1959-1967.

Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobón AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis.* 2010;51(5):561-570. Review.

Orsi CF, Colombari B, Blasi E. *Candida metapsilosis* as the least virulent member of the *Candida parapsilosis* complex. *Med Mycol.* 2010;48(8):1024-1033.

Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, Vasquez J, Pappas PG, Saeki F, *et al.* Multicenter clinical evaluation of the (1→3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis.* 2005;41(5):645-659.

Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W, *et al.* A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Infect Dis.* 2003;37:634-643.

Pappas PG, Rex JH. Infectious diseases society of America. Guidelines for treatment of candidiasis. Clin Infect Dis. 2004;15(38):161-189.

Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin Jr DK, Calandra TF, Edwards Jr JE, *et al.* Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2009;48(5):503-535.

Pemán J, Almirante B. [Advances in the diagnosis and treatment of yeast infections: role of the new antifungal agents] Enferm Infec Microbiol Clin. 2008;26(13):38-46.

Pemán J, Cantón E, Linares-Sicilia MJ, Roselló EM, Borell N, Pérez-de-Pipaon MTR, *et al.* Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream fungal isolates in pediatric patients: a Spanish multicenter prospective survey. J Clin Microbiol. 2011;49(12):4158-4163.

Perea S, Patterson TF. Antifungal resistance in pathogenic fungi. Clin Infect Dis. 2002;35:1073-1080.

Peterson JF, Pfaller MA, Diekema DJ, Rianldi MG, Riebe KM, Ledebauer NA. Multicenter comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing caspofungin, micafungin, and posaconazole against *Candida* spp. J Clin Microbiol. 2011;49(5):1765-1771.

Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Sader HS, Fluit AC, Hollis RJ, *et al.* International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. J Clin Microbiol. 2001;39(9):3254-3259.

Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell KP, Colombo AL, Finkelstein J, *et al.* Geographic and temporal trends in isolation and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*: a global assessment from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program, 2001 to 2005. J Clin Microbiol. 2005;46:842-849.

Pfaller MA, Diekema DJ, Mendez M. *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: geographic and temporal trends from the Artemis Disk antifungal surveillance program. *J. Clin Microbiol.* 2006;44:3551-3556.

Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(1):133-163.

Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Meis JF, Gould IM, *et al.* Results from the Artemis disk global antifungal surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol.* 2007a;45:1735-1745.

Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW, Rinaldi MG. Multicenter comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing amphotericin B, flucytosine, and voriconazole against *Candida* spp. *J Clin Microbiol.* 2007b;45(11):3522-3528.

Pfaller MA, Castanheira M, Diekema DJ, Messer AS, Moet GJ, Jones RN, *et al.* Comparison of European committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) and Etest methods with the CLSI broth microdilution method for echinocandin susceptibility testing of *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 2010;48(5):1592-1599.

Pfaller MA, Messer SA, Moet GJ, Jones RN, Castanheira M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). 2011;38:65-69

Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Cantón E, Castanheira M, Cuenca-Estrella M, Diekema DJ, *et al.* Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B, flucytosine, and itraconazole and *Candida* spp. As determined by CLSI broth microdilution. *J Clin Microbiol.* 2012;50(6):2040-2046.

Pichova I, Pavlickova L, Dostal J, Dolejsi E, Hruskova-Heidingsfeldova O, Weber J. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. Eur J Biochem. 2001;268(9):2669-2677.

Pontón J, Palacio A. Avances y limitaciones del diagnostic precoz de las infecciones invasoras causadas por levaduras. Rev Iberoam Micol. 2007;24:181-186.

Purisco SU, Martins MA, Szeszs MW, Castro e Silva DM, Pukinkas SRBS, Bonfietti LX, *et al.* 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;1-7.

Ramage G, Martinez JP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. FEMS Yeast Res. 2006;6(7):979-986.

Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Barlett MS, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, *et al.* Development of interpretative breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of *in vitro-in vivo* correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. Subcommittee on Antifungal Susceptibility testing of the National Committee for Clinical and Laboratory Standards Institute. Clin Infect Dis. 1997;24:235-247.

Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. Clin Microbiol Rev. 2001;14(4):643-658.

Rodero L, Davel G, Soria M, Vivot W, Córdoba S, Canteros CE, *et al.* Multicenter study of fungemia due to yeasts in Argentina. Rev Argent Microbiol. 2005;37:189-195.

Romero M, Canton E, Perman J, Gobernado M. Antifungal inhibitors of glucan synthesis. Rev Esp Quimioter. 2005;18(4):281-299.

Roy B, Meyer SA. Confirmation of the distinct genotype groups within the form species *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol. 1998;36:216-218.

Ruchel R, de Bernardis F, Ray TL, Sullivan PA, Cole GT. *Candida* acid proteinases. J Med Vet Mycol. 1992;30(suppl.1):123-132.

Ruiz-Camps I, Cuenca-Estrella M. Antifungals for systemic use. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009;27(6):353-362.

Sabatelli F, Patel R, Mann PA, Mendrick CA, Norris CC, Hare R, *et al.* In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(6):2009-2015.

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

Sanglard D. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2002;20(9):462-470.

Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. Mycoses. 2005;48(6):365-377.

Sendid B, Jouault T, Coudriau R, Camus D, Odds F, Tabouret M, Poulain D. Increased sensitivity of mannanaemia detection tests by joint detection  $\alpha$ - and  $\beta$ -linked oligomannosides during experimental and human systemic candidiasis. J Clin Microbiol. 2004;42(1):164-171.

Shrout PE, Fleiss JL. Intraclass correlations: uses in assessing rater reliability. Psychol Bull. 1979;86:420-428.

Silva A, Miranda IM, Lisboa C, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in a tertiary care hospital. J Clin Microbiol. 2009;47(8):2392-2397.

Silva V, Diaz MC, Febre N; Chilean Invasive Fungal Infections Group. Invasive fungal infections in Chile: a multicenter study of fungal prevalence and susceptibility during a 1-year period. *Med Mycol*. 2004;42(4):333-339.

Sims CR, Paetznick VL, Rodriguez JR, Chen E, Ostrosky-Zeichner L. Correlation between microdilution, Etest, and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of posaconazole against *Candida* spp. *J Clin Microbiol*. 2006;44(6):2105-2108.

Sivakumar VG, Shankar P, Nalina K, Menon T. Use of CHROMagar in the differentiation of common species of *Candida*. *Mycopathologia*. 2009;167:47-49.

Smith PB, Morgan J, Benjamin JD, Fridkin SK, Sanza LT, Harrison LH. Excess costs of hospital care associated with neonatal candidemia. *Pediatr Infect Dis J*. 2007;26:197-200.

Stehr F, Felk A, Gácsér A, Kretschmar M, Mähns B, Neuber K, *et al*. Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples. *FEMS Yeast Res*. 2004;4(4-5):401-408.

Tavanti A, Davison AD, Grow NAR, Maiden MCJ, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol*. 2005;43:284-292.

Tavanti A, Hensgens LAM, Ghelardi E, Campa M, Senesi S. Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. *J Clin Microbiol*. 2007;45(5):1455-1462.

Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Kibbler CC, Faure O *et al*. Epidemiology of candidemia in Europe: results of 28-month. European Confederation of Medical Mycology hospital-base surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004;23:317-322.

Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillot R. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;27(5):359-366.

Trofa D, Gacser A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis* an emerging fungal pathogen. Clin Microbiol Rev. 2008;21(4):606-626.

Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM, Fiori B, Rossi M, Porta R, *et al.* Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. J Clin Microbiol. 2007;45(6):1843-1850.

van Asbeck EC, Clemons KV, Stevens DA. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. Crit Rev Microbiol. 2009;35(4):283-309.

van Burik JA, Myerson D, Schreckhise RW, Bowden RA. Pan fungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. J Clin Microbiol. 1998;36(5):1169-1175.

Walsh TJ, Pappas P, Winston DJ, Lazarus HM, Petersen F, Raffalli J, *et al.* Voriconazole compared with liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with neutropenia and persistent fever. N Engl J Med. 2002;346(4):225-234.

Zancopé-Oliveira RM, James MJ, Derossi AP, Sampaio JLM, Muniz MM, Li RK, *et al.* Strain characterization of *Candida parapsilosis* fungemia by molecular typing methods. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000;19:514-520.

## **APÊNDICES**

**APÊNDICE A** – Quadro de identificação dos testes fenotípicos e moleculares do complexo *psilosis*

N.º	Origem	Isolado	Testes fenotípicos			Testes Moleculares	
			CHROMagar® <i>Candida</i>	API® 20 C AUX <i>C. parapsilosis</i> %	Vitek® 2 <i>C. parapsilosis</i> %	PCR <i>primers</i> espécies-específicos	Sequenciamento região D1/D2 do 28S do rDNA
1	HSE	23772	Branca rosácea	99,9	99	<i>C. parapsilosis</i>	NR
2	HSE	23795	Branca rosácea	99,9	97	<i>C. parapsilosis</i>	NR
3	HSE	24258	Branca rosácea	99,9	95	<i>C. parapsilosis</i>	NR
4	HSE	24360	Branca rosácea	99,9	96	<i>C. orthopsilosis</i>	NR
5	HSE	24384	Branca rosácea	99,9	98	<i>C. parapsilosis</i>	NR
6	HSE	24775	Branca rosácea	98,4	95	<i>C. orthopsilosis</i>	NR
7	HSE	32485	Branca rosácea	99,9	99	<i>C. parapsilosis</i>	NR
8	HSE	32504	Branca rosácea	99,9	99	<i>C. parapsilosis</i>	NR
9	HSE	33286	Branca rosácea	99,9	99	<i>C. parapsilosis</i>	NR
10	HSE	33499	Branca rosácea	97,1	99	<i>C. parapsilosis</i>	NR
11	HSE	33524	Branca rosácea	99,9	99	<i>C. parapsilosis</i>	NR
12	HSE	71663	Branca rosácea	99,9	98	<i>C. parapsilosis</i>	NR
13	HSE	72102	Branca rosácea	99,9	99	<i>C. parapsilosis</i>	NR
14	HSE	72737	Branca rosácea	98,4	99	<i>C. parapsilosis</i>	NR
15	HSE	72834	Branca rosácea	99,9	98	<i>C. parapsilosis</i>	NR
16	HSE	72836	Branca rosácea	99,9	98	<i>C. parapsilosis</i>	NR
17	HSE	73234	Branca rosácea	99,9	95	<i>C. parapsilosis</i>	NR
18	HSE	75234	Branca rosácea	99,9	96	Inespecífico	<i>C. parapsilosis</i>
19	HSE	75525	Branca rosácea	99,9	99	<i>C. parapsilosis</i>	NR
20	HSE	76542	Branca rosácea	99,9	97	<i>C. parapsilosis</i>	NR

HSE= Hospital dos Servidores do Estado; NR= não realizado.

APÊNDICE A (cont.) – Quadro de identificação dos testes fenotípicos e moleculares

N.º	Origem	Isolado	Testes fenotípicos			Testes Moleculares	
			CHROMagar® <i>Candida</i>	API® 20 C AUX <i>C. parapsilosis</i> %	Vitek® 2 <i>C. parapsilosis</i> %	PCR <i>primers</i> espécies-específicos	Sequenciamento região D1/D2 do 28S do rDNA
21	HSE	76555	Branca rosácea	99,8	98	<i>C. parapsilosis</i>	NR
22	HSE	76883	Branca rosácea	99,9	98	<i>C. parapsilosis</i>	NR
23	HSE	78981	Branca rosácea	99,9	98	<i>C. parapsilosis</i>	NR
24	HSE	79130	Branca rosácea	99,9	98	<i>C. parapsilosis</i>	NR
25	HSE	79182	Branca rosácea	99,9	99	<i>C. parapsilosis</i>	NR
26	HSE	79431	Branca rosácea	99,9	98	<i>C. parapsilosis</i>	NR
27	HSE	79769	Branca rosácea	99,9	93	<i>C. parapsilosis</i>	NR
28	HSE	ROM001	Branca rosácea	99,9	97	<i>C. metapsilosis</i>	NR
29	SAM	2500096400	Branca rosácea	97,1	96	<i>C. parapsilosis</i>	NR
30	SAM	2500100450	Branca rosácea	99,9	99	<i>C. parapsilosis</i>	NR
31	SAM	2500100454	Branca rosácea	97,8	95	<i>C. parapsilosis</i>	NR
32	SAM	25011112911	Branca rosácea	99,9	98	<i>C. parapsilosis</i>	NR
33	HUPE	69908	Branca rosácea	99,9	90	<i>C. orthopsilosis</i>	NR
34	HUPE	70114	Branca rosácea	99,9	89	<i>C. orthopsilosis</i>	NR
35	HUPE	70158	Branca rosácea	99,9	94	<i>C. orthopsilosis</i>	NR
36	HUPE	70186	Branca rosácea	99,9	95	<i>C. orthopsilosis</i>	NR
37	HUPE	71228	Branca rosácea	99,9	94	Inespecífico	<i>C. orthopsilosis</i>
38	HUPE	72434	Branca rosácea	99,9	96	<i>C. parapsilosis</i>	NR
39	HUPE	72728	Branca rosácea	99,9	99	<i>C. parapsilosis</i>	NR
40	HUPE	72820	Branca rosácea	99,9	93	<i>C. parapsilosis</i>	NR

HSE= Hospital dos Servidores do Estado; HSAM= Hospital Samaritano; HUPE= Hospital Universitário Pedro Ernesto; NR= não realizado.

**APÊNDICE A (cont.) – Quadro de identificação dos testes fenotípicos e moleculares**

N.º	Origem	Isolado	Testes fenotípicos			Testes Moleculares	
			CHROMagar <sup>®</sup> <i>Candida</i>	API <sup>®</sup> 20 C AUX <i>C. parapsilosis</i> %	Vitek <sup>®</sup> 2 <i>C. parapsilosis</i> %	PCR <i>primers</i> espécies-específicos	Sequenciamento região D1/D2 do 28S do rDNA
41	HUPE	72864	Branca rosácea	99,9	96	<i>C. parapsilosis</i>	NR
42	HUPE	73172	Branca rosácea	99,9	97	<i>C. parapsilosis</i>	NR
43	HUPE	73204	Branca rosácea	98,9	96	<i>C. parapsilosis</i>	NR
44	HUPE	79074	Branca rosácea	97,1	98	<i>C. parapsilosis</i>	NR
45	HUPE	79188	Branca rosácea	99,9	96	<i>C. orthopsilosis</i>	NR
46	HUPE	79298B	Branca rosácea	99,9	93	<i>C. orthopsilosis</i>	NR
47	HUPE	80550	Branca rosácea	99,9	98	<i>C. orthopsilosis</i>	NR
48	HUPE	80792	Branca rosácea	99,9	98	<i>C. parapsilosis</i>	NR
49	HUPE	80828	Branca rosácea	99,9	94	<i>C. parapsilosis</i>	NR
50	HUPE	80846	Branca rosácea	99,9	91	<i>C. parapsilosis</i>	NR
51	HUPE	80882	Branca rosácea	99,9	98	<i>C. parapsilosis</i>	NR
52	HUPE	81480	Branca rosácea	99,9	86	<i>C. orthopsilosis</i>	NR
64	HSE	25381	Branca rosácea	96,1	95	<i>C. metapsilosis</i>	NR
	ATCC	96141	Branca rosácea	98,5	96	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>
	ATCC	96143	Branca rosácea	99,9	98	<i>C. metapsilosis</i>	<i>C. metapsilosis</i>
	ATCC	22019	Branca rosácea	99,9	94	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>

HSE=Hospital dos Servidores do Estado; HUPE= Hospital Universitário Pedro Ernesto; ATCC=American Type Culture Collection; NR=não realizado.

**APÊNDICE B** – Quadro de resultados de CIMs ( $\mu\text{g/mL}$ ) de acordo com os testes de susceptibilidade aos antifúngicos

N.º	Origem	Isolado	Identificação Molecular	Etest <sup>®</sup>				Vitek <sup>®</sup> 2			CLSI (M27-A3)			
				ANF	FLU	ITR	VRZ	ANF	FLU	VRZ	ANF	FLU	ITR	VRZ
1	HSE	23772	<i>Candida parapsilosis</i>	0,5	0,5	0,064	0,016	1	2	0,12	0,5	1	0,06	0,015
2	HSE	23795	<i>Candida parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,125	0,016	1	1	0,12	1	0,25	0,12	0,015
3	HSE	24258	<i>Candida parapsilosis</i>	0,75	0,125	0,094	0,008	0,5	1	0,12	0,5	0,25	0,12	0,015
4	HSE	24360	<i>Candida orthopsilosis</i>	0,38	0,5	0,125	0,032	0,5	1	0,12	0,5	1	0,12	0,015
5	HSE	24384	<i>Candida parapsilosis</i>	0,38	0,25	0,064	0,016	0,5	1	0,12	0,5	0,25	0,03	0,015
6	HSE	24775	<i>Candida orthopsilosis</i>	0,5	0,5	0,064	0,023	0,5	1	0,12	0,5	0,5	0,06	0,03
7	HSE	32485	<i>Candida parapsilosis</i>	0,38	0,25	0,125	0,016	0,25	1	0,12	0,5	0,125	0,12	0,03
8	HSE	32504	<i>Candida parapsilosis</i>	0,5	0,5	0,094	0,016	0,25	1	0,12	0,5	0,125	0,12	0,015
9	HSE	33286	<i>Candida parapsilosis</i>	0,5	0,5	0,064	0,006	0,5	1	0,12	0,5	0,25	0,06	0,015
10	HSE	33499	<i>Candida parapsilosis</i>	0,75	0,5	0,125	0,023	0,25	1	0,12	0,5	0,5	0,12	0,03

CIMs= concentrações inibitórias mínimas; HSE= Hospital dos Servidores do Estado; ANF= anfotericina B; FLU=fluconazol; ITR= itraconazol; VRZ= voriconazol; CLSI=Clinical and Laboratory Standards Institute (documento M27-A3).

**APÊNDICE B** (cont.) – Quadro de resultados de CIMs ( $\mu\text{g/mL}$ ) de acordo com os testes de susceptibilidade aos antifúngicos

N.º	Origem	Isolado	Identificação Molecular	Etest <sup>®</sup>				Vitek <sup>®</sup> 2			CLSI (M27-A3)			
				ANF	FLU	ITR	VRZ	ANF	FLU	VRZ	ANF	FLU	ITR	VRZ
11	HSE	33524	<i>Candida parapsilosis</i>	0,75	0,25	0,125	0,008	0,5	1	0,12	0,5	0,5	0,12	0,015
12	HSE	71663	<i>Candida parapsilosis</i>	0,5	0,19	0,125	0,006	0,5	1	0,12	0,5	0,125	0,12	0,015
13	HSE	72102	<i>Candida parapsilosis</i>	0,38	0,5	0,094	0,016	0,5	2	0,12	0,5	1	0,12	0,015
14	HSE	72737	<i>Candida parapsilosis</i>	0,75	0,38	0,125	0,016	0,5	1	0,12	0,5	0,25	0,015	0,015
15	HSE	72834	<i>Candida parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,094	0,012	0,5	1	0,12	0,5	0,125	0,12	0,015
16	HSE	72836	<i>Candida parapsilosis</i>	0,5	0,75	0,125	0,016	0,5	1	0,12	0,5	0,5	0,12	0,015
17	HSE	73234	<i>Candida parapsilosis</i>	0,38	0,5	0,125	0,016	0,5	1	0,12	0,5	1	0,12	0,015
18	HSE	75234	<i>Candida parapsilosis</i>	0,5	0,5	0,125	0,032	0,5	1	0,12	0,5	0,5	0,12	0,03
19	HSE	75525	<i>Candida parapsilosis</i>	0,38	0,25	0,064	0,016	0,25	1	0,12	0,5	0,5	0,12	0,015
20	HSE	76542	<i>Candida parapsilosis</i>	1	0,125	0,064	0,006	0,5	1	0,12	1	0,125	0,12	0,015

CIMs= concentrações inibitórias mínimas; HSE= Hospital dos Servidores do Estado; ANF= anfotericina B; FLU= fluconazol; ITZ= itraconazol; VRZ= voriconazol; CLSI= *Clinical and Laboratory Standards Institute* (documento M27-A3).

**APÊNDICE B** (cont.) – Quadro de resultados de CIMs ( $\mu\text{g/mL}$ ) de acordo com os testes de susceptibilidade aos antifúngicos

N.º	Origem	Isolado	Identificação Molecular	Etest <sup>®</sup>				Vitek <sup>®</sup> 2			CLSI (M27-A3)			
				ANF	FLU	ITR	VRZ	ANF	FLU	VRZ	ANF	FLU	ITR	VRZ
21	HSE	76555	<i>Candida parapsilosis</i>	0,38	0,25	0,094	0,008	0,5	1	0,12	0,5	0,125	0,12	0,015
22	HSE	76883	<i>Candida parapsilosis</i>	0,75	0,25	0,125	0,008	0,5	1	0,12	0,5	0,25	0,12	0,015
23	HSE	78981	<i>Candida parapsilosis</i>	0,75	0,125	0,064	0,008	0,5	1	0,12	1	0,25	0,06	0,015
24	HSE	79130	<i>Candida parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,064	0,016	0,5	1	0,12	1	0,25	0,06	0,015
25	HSE	79182	<i>Candida parapsilosis</i>	0,5	0,5	0,064	0,008	0,5	1	0,12	0,5	0,25	0,06	0,015
26	HSE	79431	<i>Candida parapsilosis</i>	0,25	0,38	0,125	0,016	0,25	1	0,12	0,25	0,25	0,06	0,015
27	HSE	79769	<i>Candida parapsilosis</i>	0,5	0,125	0,125	0,006	1	1	0,12	1	0,25	0,12	0,015
28	HSE	ROM001	<i>Candida metapsilosis</i>	0,25	0,25	0,094	0,012	0,25	1	0,12	0,25	0,5	0,06	0,015
29	HSAM	2500096400	<i>Candida parapsilosis</i>	0,38	0,125	0,023	0,006	0,5	1	0,12	1	0,25	0,06	0,015
30	HSAM	2500100450	<i>Candida parapsilosis</i>	0,5	0,125	0,016	0,006	0,5	1	0,12	1	0,25	0,015	0,015

CIMs= concentrações inibitórias mínimas; HSE= Hospital dos Servidores do Estado; HSAM= Hospital Samaritano; ANF= anfotericina B; FLU= fluconazol; ITR= itraconazol; VRZ= voriconazol; CLSI= *Clinical and Laboratory Standards Institute* (documento M27-A3).

**APÊNDICE B** (cont.) – Quadro de resultados de CIMs ( $\mu\text{g/mL}$ ) de acordo com os testes de susceptibilidade aos antifúngicos

N.º	Origem	Isolado	Identificação Molecular	Etest <sup>®</sup>				Vitek <sup>®</sup> 2			CLSI (M27-A3)			
				ANF B	FLU	ITZ	VRZ	ANF B	FLU	VRZ	ANF B	FLU	ITZ	VRZ
31	HSAM	2500100454	<i>Candida parapsilosis</i>	0,75	0,125	0,023	0,008	0,25	1	0,12	0,5	0,125	0,03	0,015
32	HSAM	25011112911	<i>Candida parapsilosis</i>	0,5	0,094	0,047	0,008	0,5	1	0,12	0,5	0,0625	0,06	0,015
33	HUPE	69908	<i>Candida orthopsilosis</i>	0,25	2	0,125	0,016	0,25	4	0,12	0,25	1	0,06	0,03
34	HUPE	70114	<i>Candida orthopsilosis</i>	0,5	1	0,25	0,023	0,25	8	0,12	0,5	2	0,12	0,03
35	HUPE	70158	<i>Candida orthopsilosis</i>	0,38	0,5	0,032	0,008	0,25	1	0,12	1	0,25	0,06	0,015
36	HUPE	70186	<i>Candida orthopsilosis</i>	0,5	0,25	0,094	0,016	0,5	1	0,12	1	0,5	0,12	0,015
37	HUPE	71228	<i>Candida orthopsilosis</i>	0,25	0,5	0,032	0,032	0,5	1	0,12	0,5	0,5	0,06	0,03
38	HUPE	72434	<i>Candida parapsilosis</i>	0,5	0,125	0,064	0,006	0,25	1	0,12	0,5	0,0625	0,12	0,015
39	HUPE	72728	<i>Candida parapsilosis</i>	0,25	0,75	0,125	0,016	0,25	2	0,12	0,5	1	0,12	0,03
40	HUPE	72820	<i>Candida parapsilosis</i>	0,5	0,38	0,064	0,012	0,25	2	0,12	1	0,5	0,12	0,015

CIMs= concentrações inibitórias mínimas; HSAM= Hospital Samaritano; HUPE= Hospital Universitário Pedro Ernesto; ANF= anfotericina B; FLU= fluconazol; ITR= itraconazol; VRZ= voriconazol; CLSI= *Clinical and Laboratory Standards Institute* (documento M27-A3).

**APÊNDICE B** (cont.) – Quadro de resultados de CIMs ( $\mu\text{g/mL}$ ) de acordo com os testes de susceptibilidade aos antifúngicos

N.º	Origem	Isolado	Identificação Molecular	Etest <sup>®</sup>				Vitek <sup>®</sup> 2			CLSI (M27-A3)			
				ANF B	FLU	ITZ	VRZ	ANF B	FLU	VRZ	ANF B	FLU	ITZ	VRZ
41	HUPE	72864	<i>Candida parapsilosis</i>	0,25	0,5	0,125	0,016	0,25	2	0,12	1	0,5	0,06	0,015
42	HUPE	73172	<i>Candida parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,064	0,016	0,5	1	0,12	0,5	0,5	0,03	0,015
43	HUPE	73204	<i>Candida parapsilosis</i>	0,5	0,5	0,064	0,016	0,5	1	0,12	0,5	0,5	0,012	0,015
44	HUPE	79074	<i>Candida parapsilosis</i>	0,5	0,38	0,064	0,016	0,25	2	0,12	1	0,5	0,012	0,015
45	HUPE	79188	<i>Candida orthopsilosis</i>	0,38	0,5	0,19	0,032	0,5	1	0,12	0,5	0,5	0,12	0,03
46	HUPE	79298B	<i>Candida orthopsilosis</i>	0,25	0,5	0,064	0,012	0,25	2	0,12	0,25	0,5	0,12	0,015
47	HUPE	80550	<i>Candida orthopsilosis</i>	0,38	0,25	0,125	0,012	0,25	1	0,12	0,5	0,25	0,12	0,015
48	HUPE	80792	<i>Candida parapsilosis</i>	1,5	0,19	0,047	0,006	0,5	1	0,12	2	0,125	0,06	0,015
49	HUPE	80828	<i>Candida parapsilosis</i>	0,75	0,25	0,125	0,008	0,5	1	0,12	1	0,25	0,12	0,015
50	HUPE	80846	<i>Candida parapsilosis</i>	0,5	0,25	0,094	0,008	0,5	1	0,12	1	0,25	0,12	0,015

CIMs= concentrações inibitórias mínimas; HUPE= Hospital Universitário Pedro Ernesto; ANF= anfotericina B; FLU= fluconazol; ITR= itraconazol; VRZ= voriconazol; CLSI= *Clinical and Laboratory Standards Institute* (documento M27-A3).

**APÊNDICE B** (cont.) – Quadro de resultados de CIMs ( $\mu\text{g/mL}$ ) de acordo com os testes de susceptibilidade aos antifúngicos

N.º	Origem	Isolado	Identificação Molecular	Etest <sup>®</sup>				Vitek <sup>®</sup> 2			CLSI (M27-A3)			
				ANF B	FLU	ITZ	VRZ	ANF B	FLU	VRZ	ANF B	FLU	ITZ	VRZ
51	HUPE	80882	<i>Candida parapsilosis</i>	0,75	0,25	0,125	0,006	0,5	1	0,12	1	0,25	0,12	0,015
52	HUPE	81480	<i>Candida orthopsilosis</i>	0,5	0,5	0,25	0,023	0,5	1	0,12	0,5	0,5	0,03	0,03
64	HSE	25381	<i>Candida metapsilosis</i>	0,38	0,125	0,094	0,008	0,5	1	0,12	0,25	0,25	0,06	0,015
	ATCC	22019 <i>C. parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	0,5	0,75	0,125	0,03	0,5	1	0,12	0,5	1	0,25	0,03
	ATCC	6258 <i>C. krusei</i>	NR	1,5	32	1,0	0,25	1,0	32	0,12	1,0	16	0,5	0,12

CIMs= concentrações inibitórias mínimas; HUPE= Hospital Universitário Pedro Ernesto; HSE= Hospital dos Servidores do Estado; ATCC= *American Type Culture Collection*; NR= não realizado; ANF= anfotericina B; FLU= fluconazol; ITR= itraconazol; VRZ= voriconazol; CLSI= *Clinical and Laboratory Standards Institute* (documento M27-A3).

**ANEXOS**

**ANEXO A** – Intervalo da concentração inibitória mínima para os diferentes fármacos antifúngicos frente às cepas de referência de *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e *C. krusei* (ATCC 6258).

Number 15

M27-S3

**Table 6. Recommended 24- and 48-Hour MIC Limits for Two Quality Control Strains for Broth Microdilution.** (From Barry AL, Pfaller MA, Brown SD, et al. Quality control limits for broth microdilution susceptibility tests of ten antifungal agents. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3457-3459; and Krisher K, Brown SD, Traczewski MM. Quality control parameters for broth microdilution tests of anidulafungin. *J Clin Microbiol.* 2004;42:490. Reprinted with permission from the American Society for Microbiology and the authors.)

<b>MIC (µg/mL) Ranges for Microdilution Tests</b>							
<b>Organism</b>	<b>Antifungal Agent</b>	<b>24-Hour</b>		<b>% Within</b>	<b>48-Hour</b>		<b>% Within</b>
		<b>Range</b>	<b>Mode</b>	<b>Range</b>	<b>Range</b>	<b>Mode</b>	<b>Range</b>
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC <sup>®</sup> 22019	Amphotericin B	0.25-2.0	0.5	97.1	0.5-4.0	2.0	91.7
	Anidulafungin	0.25-2.0	1.0	95.0	0.5-2.0	1.0	95.0
	Caspofungin	0.25-1.0	0.5	96.7	0.5-4.0	1.0	92.9
	Flucytosine (5-FC)	0.06-0.25	0.12	99.2	0.12-0.5	0.25	97.9
	Fluconazole	0.5-4.0	2.0	98.2	1.0-4.0	2.0	98.1
	Itraconazole	0.12-0.5	0.25	95.8	0.12-0.5	0.25	97.5
	Ketoconazole	0.03-0.25	0.06/0.12	97.5	0.06-0.5	0.12	98.3
	<b>Micafungin</b>	<b>0.5-2</b>	<b>1</b>	<b>100.0</b>	<b>0.5-4</b>	<b>1</b>	<b>100.0</b>
	Posaconazole	0.06-0.25	0.12	96.7	0.06-0.25	0.12	98.8
	Ravuconazole	0.016-0.12	0.06	95.8	0.03-0.25	0.06	98.3
	Voriconazole	0.016-0.12	0.06	100.0	0.03-0.25	0.06	100.0
<i>Candida krusei</i> ATCC <sup>®</sup> 6258	Amphotericin B	0.5-2.0	1.0	100.0	1.0-4.0	2.0	100.0
	Anidulafungin	0.03-0.12	0.06	97.9	0.03-0.12	0.06	97.5
	Caspofungin	0.12-1.0	0.5	98.8	0.25-1.0	0.5	97.5
	Flucytosine (5-FC)	4.0-16	8.0	97.5	8.0-32	16	99.6
	Fluconazole	8.0-64	16	100.0	16-128	32	100.0
	Itraconazole	0.12-1.0	0.5	95.8	0.25-1.0	0.5	100.0
	Ketoconazole	0.12-1.0	0.5	95.4	0.25-1.0	0.5	99.6
	<b>Micafungin</b>	<b>0.12-0.5</b>	<b>0.25</b>	<b>99.6</b>	<b>0.12-0.5</b>	<b>0.25</b>	<b>99.0</b>
	Posaconazole	0.06-0.5	0.25	100.0	0.12-1.0	0.5	99.6
	Ravuconazole	0.06-0.5	0.25	93.3	0.25-1.0	0.5	100.0
	Voriconazole	0.06-0.5	0.25	98.3	0.12-1.0	0.5	100.0

**NOTE 1:** The MIC QC ranges in boldface type were adopted at a meeting of the subcommittee held on 20 January 2007 in Tampa, FL. These breakpoints are considered tentative for one year and are open for comments.

**NOTE 2:** ATCC<sup>®</sup> is a registered trademark of the American Type Culture Collection.

**NOTE 3:** The MIC for anidulafungin, caspofungin, and micafungin is the lowest concentration at which a score of 2 (prominent decrease in turbidity; see CLSI document M27-A3, Section 7.6.3) is observed after 24 hours incubation.

## ANEXO B – Critérios de interpretação para testes de susceptibilidade antifúngica de *Candida* spp.



### Interpretive Guidelines for *In Vitro* Susceptibility Testing of *Candida* Species

Antifungal Agent	Susceptible (S)	Susceptible-Dose Dependent (S-DD) <sup>‡</sup>	Intermediate (I) <sup>§</sup>	Resistant (R)
Fluconazole*	≤ 8	16-32	–	≥ 64
Flucytosine	≤ 4	–	8-16	≥ 32
Itraconazole <sup>†</sup>	≤ 0.125	0.25-0.5	–	≥ 1
Voriconazole	≤ 1	2	–	≥ 4

**NOTE 1:** Shown are the breakpoints (µg/mL) for *Candida* species against the indicated agents. If MICs are measured using a scale that yields results falling between categories, the next higher category is implied. Thus, an isolate with a fluconazole MIC of 12.5 µg/mL would be placed in the S-DD category.

**NOTE 2:** The MIC breakpoints in boldface type were adopted at a meeting of the subcommittee held on 8 January 2005 in Tampa, Florida. These breakpoints are considered tentative for one year and are open for comments.

#### Footnotes

\* For fluconazole, these guidelines are based substantially on experience with mucosal infections, but are consistent with the limited information for invasive infections due to *Candida* spp. Isolates of *C. krusei* are assumed to be intrinsically resistant to fluconazole, and their MICs should not be interpreted using this scale. It is also pertinent that the 8-µg/mL upper boundary for the susceptible range of fluconazole is not known with certainty—the data would permit selection of either 4 or 8 µg/mL for this cutoff.

† For itraconazole, the data are based entirely on experience with mucosal infections, and data supporting breakpoints for invasive infections due to *Candida* spp. are not available.

‡ Susceptibility is dependent on achieving the maximal possible blood level. For fluconazole, doses of 400 mg/day or more may be required in adults with normal renal function and body habitus. For itraconazole, measures to assure adequate drug absorption and plasma itraconazole concentrations of >0.5 µg/mL may be required for optimal response.

§ The susceptibility of these isolates is not certain, and the available data do not permit them to be clearly categorized as either "susceptible" or "resistant."