

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

BRUNA MALACARNE

**OCORRÊNCIA DE *C. tropicalis* NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO CASSIANO
ANTÔNIO DE MORAES, ESTUDO DE SUA SUSCETIBILIDADE A
ANTIFÚNGICOS COM PROPOSTAS DE MÉTODOS MODIFICADOS PARA
APRIMORAMENTO DOS TESTES *in vitro***

VITÓRIA
2010

BRUNA MALACARNE

**OCORRÊNCIA DE *C. tropicalis* NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO CASSIANO
ANTÔNIO DE MORAES, ESTUDO DE SUA SUSCETIBILIDADE A
ANTIFÚNGICOS COM PROPOSTAS DE MÉTODOS MODIFICADOS PARA
APRIMORAMENTO DOS TESTES *in vitro***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Mariceli Lamas de Araújo

VITÓRIA
2010

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

M236o Malacarne, Bruna, 1985-
Ocorrência de *C. tropicalis* no Hospital Universitário
Cassiano Antônio de Moraes, estudo de sua suscetibilidade a
antifúngicos com propostas de métodos modificados para
aprimoramento dos testes *in vitro* / Bruna Malacarne. . 2010.
119 f. : il.

Orientadora: Mariceli Lamas de Araújo.
Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) .
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1. Candida. 2. Candida tropicalis. 3. Agentes antifúngicos. I.
Araujo, Mariceli Lamas de. II. Universidade Federal do Espírito
Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61



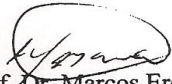
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

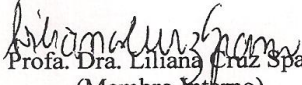
PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO


A mestranda BRUNA MALACARNE, apresentou dissertação intitulada: “OCORRÊNCIA DE *C. tropicalis* NO HUCAM – ESTUDO DE SUA SUSCETIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS COM PROPOSTA DE MÉTODOS MODIFICADOS PARA APRIMORAMENTO DOS TESTES *in vitro*” em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de **Mestre em Doenças Infecciosas**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora da Dissertação decidiu, **APROVAR SEM RESTRIÇÕES**, a dissertação e habilitar a farmacêutica BRUNA MALACARNE, a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória-ES, 10 de dezembro de 2010


Prof. Dr. Marcos Ereno Auler
(Membro Externo)


Profa. Dra. Liliã Cruz Spano
(Membro Interno)


Profa. Dra. Mariceli Araújo Ribeiro
(Orientadora)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Vitória-ES, 30 de setembro de 2009.

Da: Profa. Ethel Leonor Noia Maciel
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde

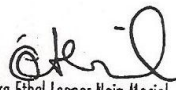
Para: Profa. Mariceli Araújo Ribeiro
Pesquisadora Responsável pelo Projeto de Pesquisa intitulado: **"Estudo comparativo da ocorrência de *Cândida não-albicans* em quatro hospitais da Grande Vitória e proposta de ensaio colorimétrico para determinação *in vitro* da suscetibilidade de *Cândida tropicalis* a agentes antifúngicos"**.

Senhora Pesquisadora,

Informamos a Vossa Senhoria, que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, após analisar o Projeto de Pesquisa, nº. de registro no CEP – 185/09, intitulado: **"Estudo comparativo da ocorrência de *Cândida não-albicans* em quatro hospitais da Grande Vitória e proposta de ensaio colorimétrico para determinação *in vitro* da suscetibilidade de *Cândida tropicalis* a agentes antifúngicos"**, cumprindo os procedimentos internos desta Instituição, bem como as exigências das Resoluções 196 de 10.10.96, 251 de 07.08.97 e 292 de 08.07.99, **APROVOU** o referido acima, em Reunião Ordinária realizada em 30 de setembro de 2009.

Gostaríamos de lembrar que cabe ao pesquisador responsável elaborar e apresentar os relatórios parciais e finais de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10/10/96, inciso IX.2. letra "c".

Atenciosamente,


Prof.ª Dra. Ethel Leonor Noia Maciel
COORDENADORA
Comitê de Ética em Pesquisa
Centro de Ciências da Saúde/UFES

Aos meus pais, José Roque e Etelvina, e ao meu irmão Nauber, por todo amor e apoio que sempre me deram.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais esta vitória e por todas as bênçãos na minha vida.

Aos meus pais, José Roque e Etelvina, que são meus exemplos e sempre me apoiaram em todos os momentos. Ao meu irmão e amigo Nauber, agradeço por tudo e principalmente por ter me proporcionado as maiores alegrias da minha vida - Henrique e Gustavo.

Ao meu namorado Guilherme, que sempre com muito amor, carinho e paciência me acompanhou e ajudou nesta jornada.

À professora Doutora Mariceli, minha orientadora, a quem sou extremamente grata e muito admiro, pela dedicação, carinho e sabedoria que sempre utilizou para me orientar nesta dissertação.

Às minha amigas e sempre companheiras: Vanessa, Monique, Aline, Magda, Cris, Adrielle, Manu e Luana, que sempre fizeram o caminho mais fácil e divertido e me ensinaram muito sobre amizade.

Aos colegas de laboratório: Simone, Mauro, Aline e Adrielle, pela ajuda e ensinamentos constantes.

A todos os professores e colaboradores do Programa de Pós Graduação em Doenças Infecciosas, pelos conhecimentos passados e auxílios prestados.

☹️ mundo é como um espelho que devolve a cada pessoa o reflexo de seus próprios pensamentos.

A maneira como você encara a vida é que faz toda diferença+.

Luís Fernando Veríssimo

RESUMO

A frequência de candidemia tem aumentado nas últimas décadas, com crescente ocorrência de espécies não-*albicans*. *Candida tropicalis* representa, em geral, a espécie não-*albicans* mais freqüente no Brasil e pode apresentar crescimento tipo *trailing* nos testes de microdiluição em caldo, frente a drogas azólicas, o que dificulta e confunde a leitura dos valores de concentração inibitória mínima (CIM). Os objetivos do presente trabalho foram avaliar a ocorrência de candidemia causada por *C. tropicalis* no Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM), Vitória . Espírito Santo, e seu perfil de suscetibilidade a fluconazol, itraconazol e anfotericina B, conforme metodologia de referência M27-A3 (CLSI, 2008), propor modificações deste teste, além de avaliar a influência de diferentes períodos de incubação e formas de leitura. Isolados de *Candida tropicalis* (82) testados pelo método referência foram selecionados e submetidos aos testes modificados, como incubação na temperatura de 42°C, adição de Tricostatina A (TSA) e do composto colorimétrico resazurina. Os resultados obtidos nos testes modificados foram avaliados através da determinação das concordâncias categóricas e essenciais com o teste padrão. Os resultados mostraram que no período de 2006 a 2009, a frequência de candidemia no HUCAM variou de 1,21 a 1,65 casos/1.000 admissões hospitalares e de 0,16 a 0,25 casos/1.000 pacientes-dia. *C. albicans* representou 45% dos episódios, seguida por *C. tropicalis* (26%), *C. parapsilosis* (14%), *C. glabrata* (10%) e outras (*C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae*). Os maiores percentuais de resistência de *C. tropicalis* a fluconazol e a itraconazol ocorreram com 48 horas de incubação (26% versus 5% e 17% versus 1,2%, respectivamente). Foi observado que 28,05% dos isolados apresentaram crescimento tipo *trailing* para uma ou para as duas drogas testadas. As concordâncias categóricas e essenciais dos testes modificados, em relação à metodologia padrão, variaram de 70 a 87%, com 24 horas de incubação e para ambas a drogas. Com 48 horas de incubação, as modificações introduzidas (incubação a 42°C e adição de TSA) propiciaram menores percentagens de concordâncias categóricas e essenciais que o método com adição de resazurina. A incubação a 42°C correlacionou com as melhores concordâncias entre as formas de leitura visual e espectrofotométrica, em comparação com o

método padrão. Diferentes perfis de crescimento tipo *trailing* foram observados, sendo que as três modificações realizadas foram eficazes em reduzir este fenômeno com 24 horas de incubação, mas apenas os métodos a 42°C e com TSA foram capazes de reduzir o *trailing* com 48 horas de incubação. A análise de prontuários médicos permitiu verificar que isolado com crescimento tipo *trailing* apresentou resposta terapêutica satisfatória ao fluconazol e que isolado que permaneceu resistente nos testes modificados não respondeu a tratamento com fluconazol, *in vivo*.

Palavras-chave: *Candida tropicalis*, candidemia, teste de suscetibilidade.

ABSTRACT

The frequency of candidemia has increased in recent decades, with raising occurrence of non-*albicans* species. In general, *Candida tropicalis* is the most frequent non-*albicans* species in Brazil and may present trailing growth in broth microdilution tests with azole drugs, which complicates and confuses the reading of MIC values. The objectives of this study were evaluate the occurrence of candidemia caused by *C. tropicalis* in HUCAM and your susceptibility profile with fluconazole, itraconazole and amphotericin B, according to reference methodology M27-A3 (CLSI, 2008) propose modifications in this test, and evaluate the influence of different incubation periods and ways of reading. Isolates of *Candida tropicalis* were selected and submitted to the modified tests: incubation temperature of 42°C, addition of TSA and colorimetric compound resazurin. The results obtained with modified tests were evaluated through essential and categorical agreements considering the reference methodology. The results showed that in the period of 2006 to 2009, the frequency of candidemia in HUCAM ranged from 1.21 to 1.65 cases / 1,000 admissions and 0.16 to 0.25 cases / 1,000 patient-days. *C. albicans* accounted for 45% of the episodes, followed by *C. tropicalis* (26%), *C. parapsilosis* (14%), *C. glabrata* (10%) and other ones (*C. krusei*, *C. guilliermondii* and *C. lusitanae*). The highest percentages of resistance to fluconazole and itraconazole occurred with 48 hours of incubation (26% versus 5% and 17% versus 1.2%, respectively). 28.05% of the isolates showed trailing growth for one or both drugs. The categorical and essential agreements of the modified tests when compared with the standard methodology, ranged from 70 to 87%, with 24 hours of incubation and for both drugs. With 48 hours of incubation, the modifications (incubation at 42°C and addition of TSA) provided smaller percentages of categorical and essential agreements when compared with the addition of resazurin. The best agreement between ways of reading (visual and spectrophotometric) was obtained with the incubation at 42°C, compared with the standard method. Different trailing growth profiles were observed and the three modified methods were effective in reducing this phenomenon with 24 hours of incubation, but only the methods 42°C and TSA were able to reduce it at 48 hour. The analysis of medical records indicated that isolated with trailing growth showed

satisfactory therapeutic response to fluconazole and the isolated that remained resistant in the modified tests did not respond to treatment with fluconazole *in vivo*.

Key words: *Candida tropicalis*, candidemia, susceptibility test.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC . *American Type Culture Collection*

CIM . Concentração Inibitória Mínima

CLSI . *Clinical and Laboratory Standards Institute*

EUCAST . *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing*

HAD . Desacetilação de Histonas

HUCAM . Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes

MOPS . Ácido N-morfalino propanosulfônico

R . Resistente

RPMI . Roswell Park Memorial Institute

S . Sensível

SDD . Sensível dose-dependente

TSA . Tricostatina A

UFES . Universidade Federal do Espírito Santo

UTI . Unidade de Terapia Intensiva

UTIN . Unidade de Terapia Intensiva Neonatal

p/v . Peso por volume

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Valores de CIM estabelecidos para interpretação do teste de sensibilidade aos antifúngicos para *Candida* spp, segundo documento M27-A3.....37
- Tabela 2 - Distribuição dos espécimes clínicos dos quais foram obtidos os isolados de *C. tropicalis* para o estudo41
- Tabela 3 - Perfis de suscetibilidade de 82 isolados de *C. tropicalis* a fluconazol e itraconazol e representação dos resultados discrepantes e das concordâncias, de acordo com as CIMs obtidas com 24 e 48 horas de incubação46
- Tabela 4 - Perfis de crescimento de *C. tropicalis* frente aos antifúngicos fluconazol e itraconazol, de acordo com o período de incubação 48
- Tabela 5 - Perfis de suscetibilidade de 24 isolados de *C. tropicalis* frente a fluconazol e de 18 isolados de *C. tropicalis* frente a itraconazol, pelo método de referência e pelos métodos modificados, em 24 e 48 horas de incubação.....51
- Tabela 6 - Análise da redução do *trailing* que levou à alteração da categoria dos isolados de S a 24 horas a R com 48 horas de incubação, que foi obtida através dos métodos modificados.....52
- Tabela 7 - Determinação dos tipos de erros e de porcentagem de concordância categórica na classificação frente ao fluconazol de 24 isolados de *C. tropicalis* quando se comparou método de referência com métodos modificados.....54
- Tabela 8 - Determinação dos tipos de erros e de porcentagem de concordância categórica na classificação frente ao itraconazol de 18 isolados de *C. tropicalis* quando se comparou método de referência com métodos modificados.....55
- Tabela 9 - Variações nas CIMs de 24 isolados de *C. tropicalis* e porcentagens de concordância essencial para fluconazol, testados pelo método de referência e pelos métodos modificados.....

Tabela 10 - Variações nas CIMs de 18 isolados de <i>C. tropicalis</i> e porcentagens de concordância essencial para itraconazol, testados pelo método de referência e pelos métodos modificados.....	59
Tabela 11 - Percentuais de concordância na categorização da suscetibilidade de 25 isolados de <i>C. tropicalis</i> ao antifúngico Fluconazol, de acordo com a forma de leitura (visual ou espectrofotométrica) e o tempo de incubação, pelo método M27-A3.....	62
Tabela 12 - Percentuais de concordância na categorização da suscetibilidade de 26 isolados de <i>C. tropicalis</i> ao antifúngico itraconazol, de acordo com a forma de leitura (visual ou espectrofotométrica) e o tempo de incubação pelo método do CLSI.....	63
Tabela 13 - Percentuais de concordância na categorização da suscetibilidade de 25 isolados de <i>C. tropicalis</i> ao antifúngico fluconazol, de acordo com a forma de leitura (visual ou espectrofotométrica) e o tempo de incubação pelo método modificado, com temperatura de incubação de 42°C.....	64
Tabela 14 - Percentuais de concordância na categorização da suscetibilidade de 26 isolados de <i>C. tropicalis</i> ao antifúngico itraconazol, de acordo com a forma de leitura (visual ou espectrofotométrica) e o tempo de incubação pelo método modificado, com temperatura de incubação de 42°C.....	65
Tabela 15 - Análise da resposta à terapia antifúngica com fluconazol de 03 pacientes cujos prontuários foram analisados.....	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Frequência de Candidemia no HUCAM no período de 2006 a 2009 (por 1.000 admissões hospitalares e 1.000 pacientes-dia).....	37
Figura 2 - Etiologia das candidemias no HUCAM, de 2006 a 2009.....	40
Figura 3 - Valores das CIMs de fluconazol obtidos pelo método de referência, com 24 e 48 horas de incubação.....	42
Figura 4 - Valores das CIMs de itraconazol obtidos pelo método de referência, com 24 e 48 horas de incubação.....	43
Figura 5 - Valores das CIMs de anfotericina B pelo método de referência, com 24 e 48 horas de incubação.....	43
Figura 6 - Distribuição do número de isolados por categoria e de acordo com o período de incubação, para os antifúngicos fluconazol e itraconazol.....	44
Figura 7 - Percentuais de isolados de <i>C. tropicalis</i> que apresentaram <i>trailing</i> com alteração do perfil de suscetibilidade de S com 24 horas de incubação a R com 48 horas de incubação frente aos antifúngicos fluconazol e itraconazol.....	48
Figura 8 - Número de isolados com respectivos perfis de erros em relação à concordância categórica, de acordo com antifúngico testado e o período de incubação.....	56
Figura 9 - Concordâncias categóricas e essenciais obtidas em relação à metodologia padrão com os métodos modificados para fluconazol e itraconazol, de acordo com o período de incubação.....	60
Figura 10 - Concordância entre as formas de leitura, de acordo com o período de incubação e com a metodologia realizada, para fluconazol e itraconazol.....	66

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 O GÊNERO <i>Candida</i>	16
1.2 FREQUÊNCIA DE LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i> EM INFECÇÕES DE CORRENTE SANGUÍNEA	17
1.3 FATORES DE RISCO PARA CANDIDEMIA	20
1.4 MORTALIDADE	21
1.5 TRATAMENTO	22
1.6 TESTES DE SUSCETIBILIDADE AOS AGENTES ANTIFÚNGICOS	24
1.7 RESISTÊNCIA A ANTIFÚNGICOS	28
2. OBJETIVOS	30
2.1 OBJETIVO GERAL	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
3. METODOLOGIA.....	31
3.1 HOSPITAL DO ESTUDO	31
3.2 COMITÊ DE ÉTICA.....	31
3.3 TESTE DE SUSCETIBILIDADE <i>In vitro</i> A DROGAS ANTIFÚNGICAS.....	31
3.3.1 ISOLADOS E IDENTIFICAÇÃO DE <i>Candida</i> spp	31
3.3.2 MEIO DE CULTURA	33
3.3.3 DROGAS ANTIFÚNGICAS.....	33

3.3.4 INÓCULO	34
3.3.5 MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO (DOCUMENTO M27-A3, CLSI, 2008).....	34
3.3.6 MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO MODIFICADO-TEMPERATURA A 42°C.....	35
3.3.7 MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO MODIFICADO- MÉTODO COLORIMÉTRICO.....	35
3.3.8 MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO MODIFICADO- ADIÇÃO DE TRICOSTATINA A	36
3.3.9 CONTROLE DE QUALIDADE.....	36
3.3.10 PONTOS DE CORTE PARA CATEGORIZAÇÃO DOS ISOLADOS.....	36
3.4 ANÁLISE DAS CONCORDÂNCIAS ENTRE AS TÉCNICAS.....	37
4. RESULTADOS	39
4.1 OCORRÊNCIA DE CANDIDEMIA.....	39
4.2 ETIOLOGIA DAS CANDIDEMIAS NO HUCAM.....	40
4.3 DISTRIBUIÇÃO DOS ESPÉCIMES CLÍNICOS DOS QUAIS FORAM OBTIDOS OS ISOLADOS DE <i>C. tropicalis</i> PARA O ESTUDO.....	41
4.4 TESTES DE SUSCETIBILIDADE DE <i>C. tropicalis</i> A DROGAS ANTIFÚNGICAS	42
4.4.1 TESTE DE SUSCETIBILIDADE PELO MÉTODO DE REFERÊNCIA M27-A3 (CLSI, 2008)	42
4.4.1.1 INTERFERÊNCIA DO FENÔMENO <i>trailing</i> NOS RESULTADOS DOS TESTES DE SUSCETIBILIDADE PELO MÉTODO DE REFERÊNCIA M27-A3... ..	47

4.4.2 TESTES DE SUSCETIBILIDADE MODIFICADOS- ALTERAÇÕES NA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO, ADIÇÃO DE TRICOSTATINA A E RESAZURINA.....	49
4.5 ANÁLISE DAS CONCORDÂNCIAS ENTRE AS METODOLOGIAS.....	52
4.5.1 CONCORDÂNCIAS CATEGÓRICAS	52
4.5.2 CONCORDÂNCIAS ESSENCIAIS.....	57
4.6 ANÁLISE DAS LEITURAS POR MÉTODO VISUAL E ESPECTROFOTOMÉTICO E EM DIFERENTES PERÍODOS DE INCUBAÇÃO	61
4.7 ANÁLISE DA RESPOSTA À TERAPIA ANTIFÚNGICA DOS PACIENTES DOS QUAIS FORAM OBTIDOS OS ISOLADOS DE <i>C. tropicalis</i> PARA OS MÉTODOS MODIFICADOS.....	66
5. DISCUSSÃO	68
6. CONCLUSÕES.....	83
7. REFERÊNCIAS	84
8. ANEXOS.....	98

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Gênero *Candida*

O fungo do gênero *Candida* pertence a Divisão *Eumycota*, Subdivisão *Deuteromycotina*, Classe *Blastomycetes*, Família *Cryptococcaceae*. Mais de 200 espécies já foram descritas, sendo que somente 10% destas, estão relacionadas a infecções em humanos (EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003).

Candida spp. é considerado um organismo pleomórfico. Apresenta desenvolvimento predominantemente unicelular e normalmente se reproduz por brotamento unilateral (blastoconídeo), correspondente ao estado anamórfico ou imperfeito. A reprodução sexuada, quando presente, é através de ascósporos e corresponde ao estado teleomórfico ou perfeito por permitir maior variabilidade genética para as espécies do gênero (BERMAN; SUDBERY, 2002).

Sua célula apresenta típica estrutura eucariótica. Apresenta parede celular e sua estrutura apresenta de duas a sete camadas, compostas por mananas, glucanas e quitina e pode conter também proteínas enzimaticamente ativas e moléculas de adesão. Lipídios em *Candida* spp. são principalmente fosfolipídeos e esteróis, sendo o ergosterol o principal esterol da membrana plasmática (ANAISSIE; MCGINNIS; PFALLER, 2003).

Candida spp. faz parte da microbiota endógena do trato gastrointestinal e ainda pode colonizar a pele, as mucosas e o trato genitourinário humano. Podem ainda serem encontrados em animais, plantas, objetos inanimados e meio ambiente. Tornam-se patógenos em situações nas quais a resistência do hospedeiro às infecções é diminuída local ou sistematicamente. Deve-se ressaltar, portanto, que a fonte endógena é a de maior importância para o desenvolvimento de doenças em seres humanos (MIRANDA et al., 2009; BOUZA; MUÑOZ, 2008; ANAISSIE; MCGINNIS; PFALLER, 2003).

Os sítios anatômicos mais freqüentemente infectados por *Candida* spp são mucosas, unhas, trato urinário, corrente sanguínea e pulmões (TIRABOSHI et al., 2000). O espectro pode variar de infecções localizadas, infecções de queimaduras, urinárias, etc, até infecções disseminadas, nas formas crônicas ou agudas (VINSONNEAU et al., 2009; SOBEL et al., 2000; EVANS et al., 1991; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010).

A identificação de espécies de *Candida* varia desde métodos tradicionais, como a fermentação e assimilação de açúcares, até métodos automatizados. Tem sido ampla a utilização de meios cromogênicos devido à praticidade e custo (SILVA; CANDIDO, 2005; VALENZA et al., 2008). Técnicas de biologia molecular tem se mostrado cada vez mais úteis, embora praticamente restrita a área de pesquisa (ANAISSIE; MCGINNIS; PFALLER, 2003).

1.2 Frequência de leveduras do Gênero *Candida* em infecções de corrente sanguínea

Infecções da corrente sanguínea por fungos têm recebido destaque devido ao crescente aumento do número de casos de candidemia, considerada a quarta maior causa deste tipo de infecção (CHAKRABARTI; CHATTERJEE; SHIVAPRAKASHI, 2008; PFALLER et al., 1998; FRASER et al., 1992; COLOMBO et al., 2006; PFALLER et al., 2010a). Aumento atribuído, em paralelo, aos avanços médicos, como os procedimentos invasivos, tratamentos imunossupressores para transplantes de órgãos e extenso uso de antibióticos de amplo espectro (NUCCI et al., 1998; BECK-SAGUÉ; JARVIS, 1993).

Os avanços diagnósticos e terapêuticos surgidos nas últimas décadas têm correspondido a maior sobrevivência de pacientes transplantados, onco-hematológicos, portadores de infecções crônicas, recém-nascidos prematuros, queimados, além de pacientes críticos, pacientes cirúrgicos submetidos a cirurgia de alta complexidade e imunodeprimidos em geral etc. Todas essas situações favorecem o aparecimento de

uma população com alto risco para infecções fúngicas oportunistas (BECK-SAGUÉ; JARVIS, 1993).

A espécie *Candida albicans* permanece como o patógeno predominante em casos de infecção da corrente sanguínea (ENWURU et al., 2008; TAN; TAN; TEE, 2008; LEE et al., 2007; MALLIÉ et al., 2005; XAVIER et al., 2008; GOLDANI; MARIO, 2003; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010; YAP et al., 2009). Contudo, a frequência de candidemia por espécies não-*albicans* tem aumentado e até ultrapassado a frequência por *C. albicans* em algumas instituições (LEE et al., 2007; GONZÁLEZ; ELIZONDO; AYALA, 2008; COLOMBO et al., 1999; NUCCI et al., 1998).

As espécies não-*albicans* têm se tornado importantes patógenos nosocomiais por serem capazes de infectar seriamente pacientes hospitalizados, que associado a uma reduzida sensibilidade a drogas azólicas, contribui com o alto índice de mortalidade registrado em infecções hospitalares causadas por estas espécies (YAP et al., 2009; HINRICHSEN et al., 2008).

Dentre as espécies de *Candida* não-*albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae* são reconhecidas como importantes patógenos oportunistas de humanos (ANAISSIE; MCGINNIS; PFALLER, 2003) e nomeadamente, também causadoras de infecções de corrente sanguínea (LEE et al., 2007; BASSETTI et al., 2009; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010; ORTEGA et al., 2009; BOUZA; MUÑOZ, 2008; HINRICHSEN et al., 2008).

A distribuição das espécies de *Candida* isoladas de sangue e de outros sítios estéreis varia consideravelmente com o tempo e também de acordo com a região geográfica. Nguyen et al. (1996), em estudo realizado nos Estados Unidos, averiguaram ao longo do período de 1990 a 1994, uma mudança no percentual de casos de candidemia por *Candida albicans* versus *Candida* não-*albicans*: na primeira fase do estudo, estas, representavam 40%, passando a 53% da etiologia das candidemias na segunda metade do estudo. Estes dados demonstraram, de acordo com o período de tempo, a mudança no perfil da candidemia no país. Esta tendência mostrou-se mundial, no início da década de 90. Foi observada também por pesquisadores brasileiros (NUCCI et al., 1998) e se mantém até atualmente

(BASSETTI et al., 2009; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010; ORTEGA et al., 2009).

Em estudo multicêntrico realizado por Pfaller et al. (2008c), no período de 2001 a 2006, um total de 5.346 isolados foram obtidos de 91 centros médicos na Ásia (16 locais), América Latina (15 locais), Europa (32 locais) e América do Norte (28 locais). *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* as espécies não-*albicans* mais isoladas de infecções de corrente sanguínea na Ásia e na América Latina, mas menos freqüente na Europa e na América do Norte. Outros estudos também demonstraram esta tendência (RODRÍGUEZ et al., 2010; TAN; TAN; TEE, 2008; YAP et al., 2009; KOTHAVADE et al., 2010) e resultados semelhantes foram obtidos por Pfaller et al. (2010a) e Pfaller et al. (2010b) em estudos multicêntricos posteriores, que abrangeram dados até o ano de 2009.

Segundo Lee et al. (2007), diferenças nas populações de pacientes, terapias antifúngicas, práticas de controle de infecção, além de outros fatores específicos dos hospitais, são também importantes na variação do perfil de distribuição das espécies de *Candida*.

No Brasil, Colombo et al. (2006) conduziram um estudo prospectivo de candidemia em onze centros médicos brasileiros a fim de conhecer incidência, distribuição das espécies, frequência de resistência a antifúngicos e fatores de riscos para espécies de *Candida*. Espécies não-*albicans* foram mais frequentemente isoladas (59%) e corresponderam a: *C. tropicalis* (21%), *C. parapsilosis* (21%) e *C. glabrata* (5%). Estes dados ressaltam a importância das espécies não-*albicans*, em especial *C. tropicalis*, como causas de infecções de corrente sanguínea.

Em trabalho realizado por Pereira et al. (2010), *C. tropicalis* foi uma das principais espécies de *Candida* isoladas de infecções de corrente sanguínea, juntamente com *C. parapsilosis* e seguida por *C. albicans*. Outros estudos realizados no Brasil também demonstraram o freqüente isolamento de *C. tropicalis* em infecções de corrente sanguínea (XAVIER et al., 2008; GOLDANI; MARIO, 2003; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010). Embora seja nítido este perfil de ocorrência de candidemia no Brasil, é importante determinar se esta tendência se reproduz em Vitória, Estado do Espírito Santo.

1.3 Fatores de risco para candidemia

As infecções nosocomiais causadas por *Candida* spp. têm predominado principalmente em dois grupos de pacientes: aqueles severamente imunocomprometidos, receptores de transplante de órgãos sólidos ou medula óssea ou portadores de neoplasias, indivíduos considerados persistentemente neutropênicos, como consequência de terapia imunossupressora ou citotóxica; e aqueles pacientes submetidos a cirurgias complexas, como a cardíaca ou abdominal, debilitados, expostos a vários procedimentos invasivos e cuja resposta imune é decrescida pelo uso sistêmicos de corticosteróides (REISS; MORRISON, 1993; JARVIS, 1995; ANAISSIE; BODEY, 1998; BODEY, 1988; VELASCO et al., 2008).

Fatores de risco, comuns a ambos os grupos de pacientes susceptíveis à aquisição de infecções fúngicas nosocomiais, incluem prolongada hospitalização, terapia antimicrobiana de amplo espectro, diabetes *mellitus*, emprego de catéteres, ventilação mecânica, etc (PEREIRA et al., 2010; REISS; MORRISON, 1993; BODEY, 1988; TIRABOSH et al., 2000; RODRIGUEZ et al., 2010b; BORGES et al., 2009).

Especificamente, em candidemia neonatal, Xavier et al. (2008) observaram que as condições de risco mais prevalentes entre os pacientes com infecção da corrente sanguínea foram uso de cateter venoso central e ventilação mecânica, prematuridade, tempo de internação superior a 15 dias, uso de nutrição parenteral, sonda nasogástrica, cefalosporinas de terceira geração, dreno e procedimento cirúrgico.

Chow et al. (2008) realizaram um trabalho na tentativa de definir quais fatores de risco estariam mais relacionados ao desenvolvimento de infecções invasivas por *C. albicans* ou *C. não-albicans*, entre pacientes críticos. Foram encontrados múltiplos fatores de risco em comum como número de dias de hemodiálise e duração da nutrição parenteral, que não puderam ser diferenciados entre os grupos. Por outro lado, Dimopoulos et al. (2008) encontraram diferenças estatísticas significativas

entre os fatores de risco envolvidos na ocorrência de candidemia em pacientes críticos. A administração de esteróides, cateter venoso central (CVC) e candidúria pré-existente foram fatores de risco independentes para candidemia por *Candida não-albicans*.

É válido ressaltar que quando se avalia os fatores de risco para desenvolvimento de candidemia por espécies não-*albicans*, o controle do uso profilático de fluconazol parece estar também relacionado com a redução na incidência deste tipo de infecção por espécies não-*albicans* (BASSETTI et al., 2009).

Nucci et al. (1998) e Colombo et al. (1999) verificaram que o principal fator predisponente para desenvolvimento de candidemia em pacientes com câncer em dois hospitais brasileiros foi o uso profilático ou terapêutico de antibióticos, seguido de cateter venoso central, neutropenia, cirurgia, uso de corticóides e nutrição parenteral. Especificamente, em relação à espécie *C. tropicalis*, Nucci et al. (1998) observaram que cateter venoso central e neutropenia foram os fatores de risco mais freqüentes em pacientes com candidemia por *C. tropicalis*. Outros estudos em pacientes neutropênicos, com doenças hematológicas e previamente expostos a fluconazol também demonstraram que *C. tropicalis* foi a espécie mais frequentemente envolvida em infecções de corrente sanguínea nestes pacientes (YAP et al., 2009; NGUYEN et al., 1996).

Por outro lado, Goldani e Mario (2003) observaram que candidemia por *C. tropicalis* afeta uma crescente porção de pacientes que não possuem doenças hematológicas, e sim que receberam terapia antimicrobiana de amplo espectro, incluindo vancomicina, e o uso de cateter venoso central.

1.4 Mortalidade

Devido à maior ocorrência de infecções por espécies não-*albicans*, a mortalidade atribuída a estas espécies tem também se mostrado maior em comparação com *Candida albicans* (YAP et al., 2009; DIMOPOULOS et al., 2008; NUCCI et al., 1998).

Colombo et al. (2006), em estudo multicêntrico brasileiro, observaram uma mortalidade geral de 54% dentre os pacientes com candidemia. A mortalidade por espécies foi determinada e os percentuais obtidos em pacientes com infecção por *C. glabrata* e *C. tropicalis* foram maiores que por *C. albicans* e *C. parapsilosis* (59% e 61% versus 57% e 45%, respectivamente). Em outro estudo realizado em hospital terciário brasileiro, Goldani e Mario (2003) observaram que a mortalidade geral entre os pacientes com fungemia por *C. tropicalis* foi de 48%, menor que o valor observado por Colombo et al. (2006), porém ainda elevada.

Na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN), a taxa de mortalidade devido a candidemia foi até de 80%, conforme Xavier et al., (2008). Entretanto, atribuição desta frequência à levedura é incerta, pois neonatos frequentemente apresentam problemas associados, como respiratórios, gastrointestinais e outras complicações, que poderiam também estar relacionados ao óbito. Na Unidade de Terapia Intensiva Adulto (UTI), a mortalidade foi de 70% dentre pacientes com candidemia e a taxa atribuída às espécies não-*albicans* foi maior que devido a *C. albicans* (78% versus 63%) (YAP et al., 2009).

1.5 Tratamento

Os azólicos são os antifúngicos mais largamente utilizados. Fluconazol, em particular, é um antifúngico triazólico de largo espectro, com excelente biodisponibilidade e um perfil farmacocinético favorável, utilizado no tratamento de várias infecções por *Candida* spp. e outros fungos. Tem toxicidade negligenciável e um nível moderadamente alto de atividade contra fungos comumente encontrados, como *C. albicans*. Entretanto, o surgimento de espécies resistentes a esta droga tem limitado sua utilização. O novo azólico voriconazol apresenta maior espectro de atividade, estendido a espécies de *Candida* resistentes ao fluconazol (MAERTENS, 2004). Todavia, a maioria dos tratamentos com azólicos apenas suprime, mas não elimina as infecções fúngicas (CANNON; KERRIDGE, 1988).

A atividade destas drogas está baseada na interferência da síntese de ergosterol através da inibição da enzima lanosterol 14- α -demetilase, codificada pelo gene *ERG11*. A função da enzima é converter lanosterol a ergosterol e sua inibição leva à presença de precursores do ergosterol na membrana na célula fúngica, considerados tóxicos (CUENCA-ESTRELLA et al., 2001). A presença do ergosterol é importante na fluidez e permeabilidade da membrana, na morfologia celular, na atividade enzimática e na progressão do ciclo celular (CANNON; KERRIDGE, 1988; DAUM et al., 1998).

Recentemente, uma nova geração de triazólicos, incluído posaconazol, ravuconazol, albaconazol e isavuconazol estão sendo desenvolvidos (SEIFERT et al., 2007; PASQUALOTTO; DENNING, 2008). E diversos trabalhos demonstram que estas drogas são altamente ativas contra isolados de *Candida*, incluindo isolados resistentes e sensíveis ao fluconazol (SEIFERT et al., 2007; CALVO et al., 2003; GUINEA et al., 2008; CUENCA-ESTRELLA et al., 2006; GONZALEZ; ELIZONDO; AYALA, 2008).

Os poliênicos como a anfotericina B e a nistatina pertencem a outra classe de antifúngicos que possuem como alvo, membranas contendo ergosterol. Estas drogas se intercalam nas membranas formando um canal através do qual componentes celulares, principalmente íons potássio, vazam e destroem o gradiente de prótons. A anfotericina B tem sido considerada um dos agentes antifúngico mais eficientes para uso sistêmico; contudo, a toxicidade e a disfunção renal observada têm restringido sua utilização (WHITE; MARR, 1998). Estes problemas têm sido reduzido à medida que são desenvolvidas formulações lipídicas destas drogas (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006).

As equinocandinas, atuam inibindo a síntese de 1,3-D-glucana na parede da célula fúngica. Todas as três equinocandinas disponíveis . Anidalfungina, Caspofungina e Micafungina - apresentam atividade fungicida contra a maioria das espécies de *Candida*, incluindo espécies resistentes a polienos e azólicos (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006).

Embora atualmente o número de drogas antifúngicas disponíveis seja maior, casos de resistência aos agentes antifúngicos são observados e torna cada vez mais

importante a determinação do perfil de suscetibilidade dos agentes etiológicos mais frequentemente relacionados a infecções graves,, através de testes padronizados que possam ser implementados na rotina, assim como são os testes para bactérias (ENWURU et al., 2008).

1.6 Testes de suscetibilidade aos agentes antifúngicos

O método padrão para determinação do perfil de suscetibilidade aos agentes antifúngicos foi estabelecido inicialmente em 1997, pelo *Clinical and Laboratorial Standards Institute* (CLSI), antigo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) e se intitula *Método de Referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras a terapia antifúngica* (documento M27-A). Em 2008, foi publicada a terceira versão do documento, com o objetivo de aperfeiçoamento do teste visando uma melhor reprodutibilidade intra e interlaboratorial e inclusão de novas drogas. Entretanto, alguns aspectos do teste ainda dificultam sua leitura e interpretação, especialmente a avaliação da espécie *C. tropicalis* frente a azólicos (REX et al., 1998; ARTHINGTON-SKAGGS; WARNOCK; MORRISON, 2000; ODABASI et al., 2009; CLSI, 2008).

Os azólicos são os agentes antifúngicos mais utilizados para tratamento de candidíase. Entretanto, carecem de atividade fungicida. *In vitro*, os azólicos falham em realmente suprimir o crescimento fúngico, resultando em um crescimento residual em ensaios de microdiluição em caldo, mesmo em concentrações da droga correspondentes a valores acima da concentração inibitória mínima (CIM). Este fenômeno, denominado crescimento tipo *trailing* ou fenótipo *trailing*, é especialmente observado em testes *in vitro* de suscetibilidade de *Candida tropicalis* a azólicos tornando a leitura do *endpoint* extremamente duvidosa, havendo, assim, uma baixa correlação entre os dados obtidos *in vitro* e a resposta terapêutica *in vivo*, fazendo com que cepas sensíveis a um determinado azólico *in vivo* apresentem valores elevados de CIM *in vitro* (CLSI, 2008; SMITH; EDLIND, 2002; REX et al., 1998).

Uma hipótese para este crescimento residual é a capacidade da célula fúngica de super regulação da transcrição do gene *ERG11* em resposta a exposição à droga. Uma maior transcrição deste gene compensaria o efeito inibidor da síntese do ergosterol por drogas azólicas e, conseqüentemente persistência do crescimento fúngico, mesmo na presença destas drogas. Além disso, outros genes envolvidos na síntese de ergosterol devem ser considerados para avaliar este fenômeno (SONG et al., 2004; HENRY; NICKELS; EDLIND, 2000).

A utilização de compostos químicos, como a tricostatina A (TSA), capazes de interferir na regulação gênica de eucariotos, poderia, hipoteticamente, inibir a super regulação do gene *ERG11* evitando crescimento fúngico residual não correlacionado com resistência a drogas e, portanto favorecer a obtenção de valores de CIM confiáveis (SMITH; EDLIND, 2002).

Já foi demonstrado também que a alteração no pH do meio de cultura utilizado pode influenciar significativamente no resultado do teste de sensibilidade. A utilização do meio RPMI, indicado pelo CLSI, mas com pH ajustado para 5, foi capaz de diminuir o fenômeno do *trailing*, fazendo com que isolados caracterizados como resistentes pelo método padrão possam ser classificados como sensíveis com esta alteração (MARR; RUSTAD; REX, 1999). O ajuste do pH deve ser considerando como alternativa para aprimorar a leitura dos testes de sensibilidade com isolados que apresentam *trailing*.

O mecanismo da redução de *trailing* por meio da alteração do pH não foi ainda bem determinado. Como crescimento fúngico é semelhante (nos poços que representam os controles positivo dos testes) ao utilizar pH 7 e pH 5, a explicação pode envolver mais que alteração na densidade óptica. Possíveis explicações seriam o efeito do pH na morfologia celular e mudanças na expressão de genes envolvidos na resistência a drogas; é possível que o baixo pH favoreça a ação da droga (YAMADA et al., 1997).

O tempo de leitura do teste também é importante para a determinação do *endpoint* para isolados de *Candida* spp. que apresentam crescimento tipo *trailing*. Em geral, os valores de CIM para *Candida* spp. são relativamente baixos a 24 horas e muito elevados com 48 horas de incubação com drogas azólicas. Devido a este problema,

o documento M27-A3 do CLSI indica que em alguns casos, quando se testa fluconazol, a leitura de 24 horas de incubação é mais indicada, pela possibilidade de ter mais correlação com a resposta *in vivo* que a leitura de 48 horas, conforme demonstrado por Rex et al., (1998), em um modelo experimental de candidíase invasiva em animais. Os autores observaram que a resposta *in vivo* não se correlacionou com os valores de CIM obtidos em 48 horas, cujas CIMs foram superestimadas em três dos seis isolados testados; entretanto, com as leituras de 24 horas, houve melhor correlação com a resposta *in vivo*, o que sugere que uma pequena mudança no método poderia otimizar os resultados obtidos. Estes resultados também foram confirmados por Ostrosky-Zeichner et al. (2008). Para itraconazol, ainda mostra-se necessária a avaliação da utilidade das leituras dos valores de concentração inibitória mínima obtidos com 24 horas de incubação (CLSI, 2008).

Além disso, alguns isolados com crescimento tipo *trailing* apresentam tempo de geração menor que os demais isolados (AGRAWAL et al., 2007; COENYE et al., 2008). Esta característica poderia propiciar, para os isolados com este tipo de crescimento, leituras para determinação dos valores de CIM nos testes de suscetibilidade com tempos de incubação inferiores a 24 horas, durante período de menor expressão dos genes envolvidos na biossíntese do ergosterol e, hipoteticamente, redução na expressão do fenótipo *trailing* (SONG et al., 2004; HENRY; NICKELS; EDLIND, 2000).

Outro ponto de destaque é a determinação visual do *endpoint* nos testes de microdiluição, conforme proposto pelo CLSI. Esta leitura, por vezes, é ambígua. Por esse método, o *endpoint* é determinado por comparação do crescimento da levedura na presença e ausência do agente antifúngico, ou seja, o *endpoint* é definido como a menor concentração da droga na qual se observa um decréscimo de aproximadamente 50% na turbidez, comparado ao crescimento no meio controle, livre da droga. Para alguns isolados, esta determinação é duvidosa devido ao crescimento irregular à medida que a concentração da droga aumenta (CLSI, 2008; HENRY; NICKELS; EDLIND, 2000).

Na tentativa de melhorar a determinação dos *endpoints* e tornar estes testes mais adaptáveis para realização em laboratórios clínicos de rotina, alguns autores

propõem a realização de métodos que utilizem compostos colorimétricos (DAVEY et al., 1998; CHEN; WAN; LI, 2004). Para tal, há a incorporação aos testes de compostos indicadores de oxidação-redução, como a resazurina, que permitem a melhor avaliação da viabilidade da célula fúngica quando exposta a drogas e, conseqüentemente, uma determinação mais confiável dos *endpoints*.

Um teste colorimétrico disponível comercialmente é o Sistema Sensititre Yeast One colorimetric plate+ (Trek Diagnostics Systems, Cleveland, Ohio). Este sistema utiliza o indicador colorimétrico de crescimento, Alamar Blue. Contém doze diluições seriadas de cada agente antifúngico (anfotericina B, fluconazol, cetoconazol, itraconazol e flucitosina) e a CIM é determinada como o primeiro poço que apresenta uma mudança de coloração, comparada àquela observada nos poços com crescimento em concentrações mais baixas de droga (ESPINEL-INGROFF et al., 2004).

Contudo, o perfil de suscetibilidade de *C. tropicalis* no sistema Sensititre Yeast One não apresentou boa correlação com os dados obtidos pelo método M27-A3 (DAVEY et al., 1998; ESPINEL-INGROFF et al., 2004). Segundo Espinel-Ingroff et al. (2004), a principal razão para esta discrepância foi que os valores de CIM por método colorimétrico foram obtidos com 48 horas de incubação com os azólicos, o que permitiu a detecção de valores consistentemente maiores que duas diluições, em comparação aos valores obtidos pelo método M27-A3.

Agrawal et al. (2007) avaliaram a sensibilidade de isolados de *Candida* spp. a fluconazol em três temperaturas diferentes de incubação: 35°C (de acordo com o CLSI), 25°C e 42°C. Os isolados que sabidamente exibiam *trailing* perderam este fenótipo nas temperaturas de 25°C e 42°C (demonstraram-se suscetíveis), enquanto que os demais isolados que não exibiam este crescimento residual não sofreram alterações significativas no perfil de suscetibilidade nestas temperaturas. Estas variações provavelmente devem afetar a expressão de genes relacionados com o fenômeno de *trailing*.

1.7 Resistência a antifúngicos

O maior número de isolados de *Candida* spp resistentes ao fluconazol foi recuperado de pacientes com aids, mas o fenômeno da resistência tem também ocorrido em outros pacientes severamente imunocomprometidos, com maior número de relatos em pacientes com candidemia (PRICE et al., 1994; COLOMBO et al., 1999). Embora não se disponha de dados precisos sobre o uso de drogas antifúngicas, estima-se que drogas, como o fluconazol, estejam sendo cada vez mais usadas por diversas razões, incluindo o uso profilático em pacientes transplantados ou como terapêutica empírica em pacientes de alto risco para candidemia em unidades de terapia intensiva. Conseqüentemente, como nos casos de pacientes com aids, o uso extensivo de antifúngicos para profilaxia nestes pacientes tem se tornado importante causa de colonização por espécies de *Candida* não-*albicans* e, conseqüentemente, maior ocorrência de resistência (PERSONS et al., 1991; COLOMBO et al., 1999; KOTHAVADE et al., 2010).

Relatos de alto nível de resistência obtidos por meio de determinação de CIM por método de microdiluição em caldo, segundo Documento M27-A3 do CLSI podem ter sido casos de crescimento residual erroneamente interpretados como resistência *in vitro* e não relacionados à resistência *in vivo*. Entretanto, é bom ressaltar a real existência de resistência *in vitro* e *in vivo* em isolados de *Candida*, principalmente em espécies de *C. não-albicans*. Espécie como *C. krusei* apresenta resistência intrínseca a fluconazol, ao passo que outras, como *C. tropicalis* e *C. glabrata*, têm apresentado crescente resistência adquirida (TAN; TAN; TEE, 2008).

Quando se avalia o perfil de suscetibilidade de *C. tropicalis* a drogas antifúngicas, geralmente não se observa resistência a anfotericina B e o percentual de resistência desta espécie às drogas fluconazol e itraconazol é relativamente baixo (BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010; GONZALEZ; ELIZONDO; AYALA, 2008; BEDINI et al., 2006; QUINDÓS et al., 1999; MUÑOZ et al., 1997), mesmo com a ocorrência de resistência cruzada entre os azólicos (PFALLER et al., 2010a).

Embora não freqüente, resistência de isolados de *C. tropicalis* a caspofungina tem sido relatada (BOURGAULT et al., 2008; PASQUALE et al., 2008), especialmente

em grupo de pacientes receptores de medula óssea (GARCIA-EFFRON et al., 2008). Dentre os novos azólicos, resistência a posaconazol e a voriconazol também tem sido encontrada (BEDINI et al., 2006; BOURGAULT et al., 2008), embora seja menos comum.

Devido à possibilidade de isolamento de cepas de *C. tropicalis* resistentes, em pacientes em tratamento antifúngico (PERSONS et al., 1991; COLOMBO et al., 1999), e até mesmo sem iniciar o tratamento (DESNOS-OLLIVIER et al., 2008), e devido aos relatos de resistência a alguns antifúngicos de recente utilização (PASQUALE et al., 2008; BEDINI et al., 2006), torna-se cada vez mais importante determinar o perfil de suscetibilidade destes isolados. Para tal, o método padrão proposto pelo CLSI requer aprimoramentos para propiciar a determinação de valores de CIM corretos para *C. tropicalis*, posto que esta espécie adicionalmente possa expressar o fenômeno *trailing* quando testada frente aos antifúngicos mais comumente utilizados: fluconazol e itraconazol (SMITH; EDLIND, 2002; REX et al., 1998). Alterações no método padrão poderiam, em hipótese, reduzir este crescimento residual e permitir a seleção adequada de uma destas drogas azólicas, e até mesmo reduzir a probabilidade de expressão de fenótipos de resistência adquiridos mediante exposição decorrente de tratamento com antifúngico inadequado.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estabelecer a ocorrência de candidemia no Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes (HUCAM), Vitória . Espírito Santo, no período de 2006 a 2009, e analisar o perfil de suscetibilidade *in vitro* de isolados de *C. tropicalis* a drogas antifúngicas com diferentes metodologias.

2.2 Objetivos específicos

- Obter dados hospitalares e laboratoriais para calcular a ocorrência de candidemia no HUCAM, em Vitória . Espírito Santo e analisar o perfil de suscetibilidade de isolados clínicos de *C. tropicalis* aos antifúngicos fluconazol, itraconazol e anfotericina B, segundo documento M27-A3 (CLSI, 2008);
- Padronizar testes de suscetibilidade modificados: incubação a 42°C, adição de triscostatina A e de resazurina;
- Testar isolados de *C. tropicalis*, com fenótipo *trailing* ou resistente, aos métodos modificados propostos;
- Estabelecer perfis de concordâncias entre os resultados obtidos com o método referência e os métodos modificados;
- Avaliar a concordância entre formas de leitura visual e espectrofotométrica para a determinação dos valores de concentração inibitória mínima (CIM), em diferentes períodos de incubação;
- Estabelecer a correlação entre o perfil de suscetibilidade obtido *in vitro* e a resposta à terapêutica com fluconazol, para alguns isolados testados.

3 METODOLOGIA

3.1 Hospital do estudo

O hospital incluído no presente estudo foi o Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM). É um hospital terciário público, possui 255 leitos, sendo 40 de UTI. Considerado o maior hospital da rede pública do Espírito Santo, tendo em vista o volume de atendimentos, sobretudo de alta complexidade. Dados referentes às admissões hospitalares e pacientes-dia foram obtidos para o cálculo da ocorrência de candidemia no período analisado.

Três pacientes, dos quais foram obtidos quatro isolados de *C. tropicalis* selecionados para serem avaliados em testes de suscetibilidade pelo método de referência e pelos métodos modificados, tiveram seus prontuários avaliados, segundo protocolo (Anexo 10).

3.2 Comitê de Ética

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santos (UFES), número de registro 185/09, em 30 de setembro de 2009.

3.3 Teste de suscetibilidade *in vitro* a drogas antifúngicas

3.3.1 Isolados e identificação de *Candida* spp.

Todos os isolados de *Candida tropicalis* e demais *Candida* spp. foram previamente obtidos do setor de microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas do hospital envolvido neste estudo, oriundos de diversos espécimes clínicos, principalmente sangue e líquidos cavitários. As cepas foram identificadas novamente no Laboratório de Micologia Clínica do Departamento de Patologia da UFES e mantidas congeladas a -80°C no Núcleo de Doenças Infecciosas da UFES.

Para a identificação, as leveduras foram descongeladas e cultivadas em Agar Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA) e em seguida no meio cromogênico CHROMagar *Candida*® (Instituto Pasteur, França), para diferenciação de algumas espécies de *Candida* spp. Isolados que cresceram com formação de colônias de coloração azul neste meio foram considerados suspeitos de serem da espécie *C. tropicalis*. A identificação de *Candida* spp. e a confirmação da espécie *C. tropicalis* foi realizada através de métodos clássicos, baseados em características fisiológicas, morfológicas e bioquímicas, como assimilação e fermentação de fontes de carbono (SIDRIM; MOREIRA, 1999).

- **Assimilação de fontes de carbono**

Foram preparados 5 mL de suspensão de células de *Candida* spp. na escala 5 de McFarland e 2mL desta suspensão foram depositados em uma placa de Petri estéril de 150 mm de diâmetro e homogeneizada com meio Yast Nitrogen Base (YNB, Difco, referência 0392-15), estabilizado à temperatura de 55°C. Após a solidificação do meio, foram adicionadas as seguintes fontes de carbono: glicose, sacarose, maltose, trealose, lactose, galactose, sorbitol, inositol, xilose, ramnose, celobiose, dulcitol e rafinose. As placas foram incubadas durante 2 a 3 dias à temperatura ambiente e a leitura foi feita pela observação de halos de crescimento da levedura ao redor de diferentes açúcares, indicando assimilação positiva. *C. tropicalis* é capaz de assimilar glicose, maltose, sacarose, galactose, xilose.

- **Fermentação de fontes de carbono**

A partir da suspensão obtida acima, 0,2mL foi inoculado em cada tubo, com diferentes fontes de carbono: glicose, sacarose, lactose, maltose, galactose e trealose. Durante incubação a 35°C, as leituras foram realizadas periodicamente até 1 semana. A presença de bolhas de gás no tubo de Durhan foi considerada como fermentação positiva. *C. tropicalis* é capaz de fermentar glicose, maltose e sacarose e não fermenta lactose.

3.3.2 Meio de cultura

O meio utilizado nos testes de microdiluição em caldo foi o RPMI-1640 (Gibco BRL), com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio, com vermelho de fenol como indicador de pH, suplementado com 0,2% de glicose e tamponado para pH 7,0 com ácido . (N-morfolino) propanosulfônico (MOPS) (Gibco BRL), concentração final de 0,165 mol/l, esterilizado por filtração em membrana de éster de celulose com poro de diâmetro de 0,22µm (Millipore Indústria e Comércio Ltda, Brasil).

3.3.3 Drogas antifúngicas

As drogas testadas, Anfotericina B (Sigma), Fluconazol (Sigma) e Itraconazol (Sigma), foram compradas na forma de pó e solubilizadas em dimetilsulfóxido (Anfotericina B e Itraconazol) ou em água destilada (Fluconazol) para obtenção de solução estoque. Posteriormente, estas soluções foram diluídas em meio RPMI 1640 (Gibco BRL) para obtenção das concentrações determinadas no teste de referência: Anfotericina B de 0,03 a 16 g/mL; Fluconazol de 0,125 a 64 g/mL e Itraconazol 0,007 a 4 g/mL. As diluições das drogas foram distribuídas de modo que 100µl de cada concentração fossem depositados em poços de placas de microdiluição de 96 poços em concentrações crescentes.

3.3.4 Inóculo

O inóculo foi preparado através da coleta com alça bacteriológica de 5 colônias de aproximadamente 1 mm de diâmetro, da cultura de 24 horas de incubação a 35°C em Ágar Sabouraud Dextrose e suspensas em 5 mL de água destilada estéril. A suspensão resultante foi agitada por Vortex durante 15 segundos e a densidade celular foi ajustada por leitura espectrofotométrica (correspondente a transmitância entre 85-90%, a comprimento de onda de 530 nm), correspondendo à escala 0,5 de MacFarland. Com este procedimento foi possível a obtenção de suspensões na concentração de 1 a 5×10^6 células por mL. A suspensão utilizada no teste foi preparada por posterior diluição a 1:50 em água destilada estéril, seguida de diluição 1:20 em meio RPMI 1640, o que resultou em concentração final testada de 5×10^2 a $2,5 \times 10^3$ células por mL.

3.3.5 Método de microdiluição em caldo (Documento M27-A3, CLSI, 2008)

Um volume de 100 µL da suspensão descrita no item anterior foi adicionado a cada poço da placa, onde as concentrações da droga já haviam sido adicionadas. As placas foram incubadas a 35°C e a leitura foi realizada após 24 e 48 horas de incubação. A densidade de crescimento nos poços contendo diferentes concentrações de drogas antifúngicas foi comparada, visualmente, com a densidade de crescimento no poço controle de crescimento (sem agente antifúngico). O valor da CIM foi definido como a menor concentração da droga capaz de causar uma redução de 50% do crescimento da levedura, em relação ao poço controle, sem adição de droga, para os azólicos. Para anfotericina B, o valor de CIM foi definido como a menor concentração da droga capaz de reduzir o crescimento fúngico em 100%, em relação ao poço-controle (YANG et al., 2008).

Adicionalmente, para alguns isolados, foi realizada a leitura através do leitor de Elisa e o valor da CIM foi determinado como a concentração da droga correspondente ao

poço que apresentou uma redução de 50% ou mais na densidade óptica em relação ao poço controle.

O crescimento do tipo *trailing* foi considerado quando se obteve leituras distintas nos dois tempos de incubação: com fluconazol foi definido como valores de CIM $\leq 8\mu\text{g/mL}$ com 24 horas e $\geq 64\mu\text{g/mL}$ com 48 horas e com itraconazol, valores de CIM $\leq 0,125\mu\text{g/mL}$ com 24 horas e $\geq 1\mu\text{g/mL}$ com 48 horas de incubação (CLSI, 2008). Foram também considerados crescimento tipo *trailing* quando o isolado não alterou o seu perfil de suscetibilidade, conforme definido pelo documento M27-A3, mas apresentando crescimento ao longo de concentrações crescentes da droga, que dificultava a leitura dos valores de CIM.

3.3.6 Método de microdiluição em caldo modificado- Temperatura a 42°C

Neste item foi avaliado o crescimento fúngico com temperatura de incubação diferente daquela preconizada no teste de referência (documento M27-A3 do CLSI), conforme descrito no item anterior. Neste teste as placas foram incubadas a 42°C. Foram testados os antifúngicos fluconazol e itraconazol.

As leituras foram visuais e realizadas de 24 a 48 horas de incubação. Alguns isolados (os mesmo pelo método padrão) foram selecionados para terem as CIMs determinadas espectrofotometricamente.

3.3.7 Método de microdiluição em caldo modificado- Método colorimétrico

O teste de suscetibilidade foi realizado conforme proposto pelo documento M27-A3 com a seguinte modificação: após 24 horas de incubação, os poços das placas incubadas a 35°C com os antifúngicos fluconazol e itraconazol, foram adicionados

de 30µl de solução de resazurina (Sigma-Aldrich, Alemanha) a 0.02% (p/v) (MARTIN et al., 2003). Esperaram-se aproximadamente 10 minutos para o desenvolvimento da coloração e a realização da leitura. Mudança de azul para róseo indicou redução da resazurina e, conseqüentemente, crescimento fúngico. O valor da CIM foi definido como a menor concentração da droga que impediu essa mudança de coloração. As leituras foram realizadas visualmente, após 24 e 48 horas de incubação.

3.3.8 Método de microdiluição em caldo modificado- Adição de tricostatina A

As drogas e o inóculo foram preparados como descrito nos itens anteriores, exceto que ao inóculo foi adicionado tricostatina A (Sigma, Sta Loius, USA) para a obtenção de uma concentração final de 3µg/mL (SMITH; EDLIND, 2002). O inóculo assim preparado foi adicionado aos poços contendo o agente antifúngico e as placas foram incubadas a 35°C. As leituras foram realizadas visualmente, após 24 e 48 horas de incubação.

3.3.9 Controle de Qualidade

Para garantir a reprodutibilidade e a acurácia do teste, em cada placa, foram incluídos: o controle positivo, que representa o crescimento do isolado na ausência da droga; e o controle negativo, que consiste apenas no poço contendo meio RPMI 1640, para averiguar sua esterilidade. Além disso, foram incluídas as cepas padrão *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019, com valores de CIM conhecidas, conforme preconizado pelo CLSI.

3.3.10 Pontos de corte para categorização dos isolados

Os isolados testados foram segregados em categorias conforme proposto pelo documento M27-A3, complemento M27. S3 e demonstrado na tabela abaixo (Tabela 1), em Sensível (S), Sensível dependente da dose (SDD) e Resistente (R).

Tabela 1- Valores de CIM estabelecidos para interpretação do teste de sensibilidade aos antifúngicos para *Candida* spp, segundo documento M27-A3.

Droga	Valor de CIM (em g/mL)		
	S	SDD	R
Fluconazol	m8	16-32	≥ 64
Itraconazol	m0,125	0,25 - 0,5	≥ 1
Anfotericina B	m1	-	> 1

3.4 Análise das concordâncias entre as técnicas

Os valores de CIM para fluconazol e itraconazol obtidos pelos métodos modificados foram considerados em **concordância essencial** com o método referência quando as discrepâncias entre os métodos não foram maiores que duas diluições seriadas - \log_2 . Enquanto que a **concordância categórica** ocorreu quando não houve mudanças entre as categorias de interpretação de suscetibilidade aos antifúngicos testados do método modificado em relação ao método referência (ESPINEL-INGROFF et al, 2009).

Quando observados resultados discordantes em relação à categorias de suscetibilidade, estas discordâncias foram classificadas em erros:

- Erro menor: para isolados categorizados como S ou R pela metodologia de referência e resultado SDD pelos métodos modificados, ou, ao contrário, quando obtido resultado SDD pela metodologia referência e resultado S ou R pelos métodos modificados.
- Erro maior: para isolados classificados como S pela metodologia referência e R pelos métodos modificados.
- Erro muito maior: para isolados classificados como R pela metodologia de referência e S pelo método modificado.

4 RESULTADOS

4.1 Ocorrência de candidemia

A frequência de candidemia no HUCAM foi determinada em relação às admissões hospitalares e ao número de pacientes-dia, no período de 2006 a 2009. A frequência de candidemia no HUCAM variou de 1,21 a 1,65 casos/1.000 admissões hospitalares e de 0,16 a 0,25 casos/1.000 pacientes-dia (Figura 1).

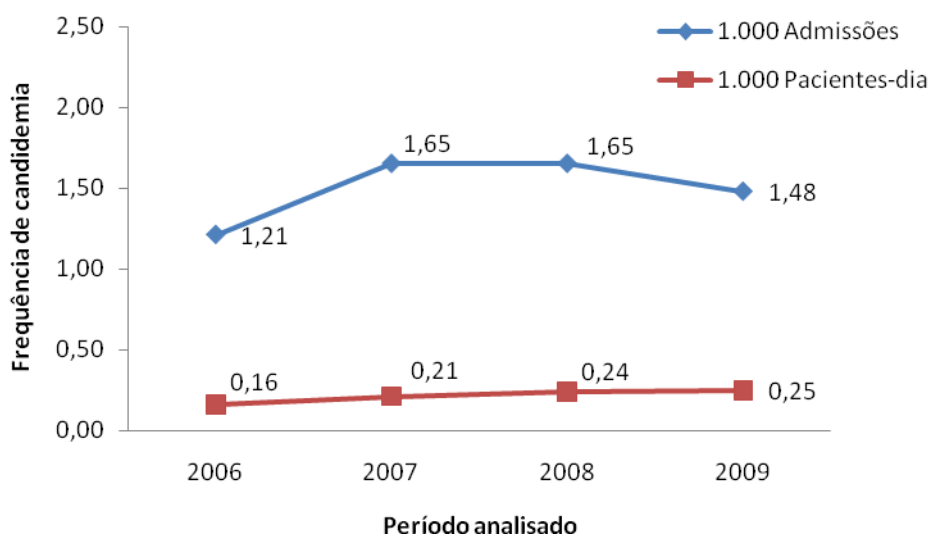


Figura 1- Frequência de Candidemia no HUCAM no período de 2006 a 2009 (por 1.000 admissões hospitalares e 1.000 pacientes-dia).

4.2 Etiologia das candidemias no HUCAM

O número de caso de candidemia devido a *Candida albicans* e *Candida* não-*albicans* (destacando-se a espécie *Candida tropicalis* neste grupo) mostrou oscilação na ocorrência, sendo que a espécie *C. albicans* foi menos freqüente que as espécies não-*albicans* nos anos de 2006, 2008 e 2009, ultrapassando as espécies não-*albicans* somente no ano de 2007 e correspondeu, em média, a 45% da etiologia dos casos. A espécie *C. tropicalis* acompanhou a oscilação observada no grupo das espécies não-*albicans* prevalecendo na média de 43% em relação a freqüência de candidemia causadas por estas espécies. Em 2008 representou 60% das espécies de *C. não-albicans* (Figura 2).

No geral, as espécies não-*albicans* mais frequentes foram: *C. tropicalis* (26%), *C. parapsilosis* (14%), *Candida glabrata* (10%), *Candida Krusei* (2%), *Candida guilliermondii* (1.5%) e *Candida lusitaniae* (0.5%).

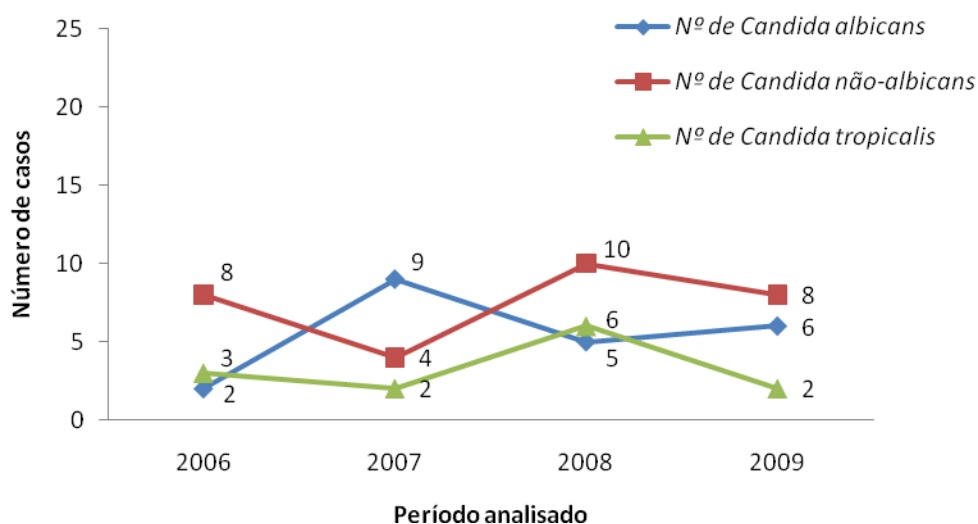


Figura 2- Etiologia das candidemias no HUCAM, de 2006 a 2009.

4.3 Distribuição dos espécimes clínicos dos quais foram obtidos os isolados de *C. tropicalis* para o estudo

Todos isolados recolhidos no Laboratório de Análises Clínicas foram devidamente identificados em nível de espécie no Laboratório de Micologia Clínica do Departamento de Patologia da UFES e armazenados a -80°C até o momento da utilização nos testes de suscetibilidade.

Além dos isolados de *C. tropicalis* oriundos de sangue, isolados obtidos de secreções, líquidos cavitários, dentre outros (conforme indicado na Tabela 2) também foram selecionados para testes. O sangue foi o espécime clínico do qual o maior número de isolados de *C. tropicalis* foram obtidos (51,2%), seguido de líquido peritoneal (22,0%).

Tabela 2- Distribuição dos espécimes clínicos dos quais foram obtidos os isolados de *C. tropicalis* para o estudo

Espécime clínico	Nº	%
Sangue	42	51,2
Líquido peritoneal	18	22,0
Urina	4	4,9
Lavado brônquico	3	3,7
Líquido ascítico	3	3,7
Líquido pleural	3	3,7
Líquido pélvico	2	2,4
Secreção pulmonar	2	2,4
Líquido sinovial	1	1,2
Líquido pericárdico	1	1,2
Líquido retrogátrico	1	1,2
Secreção mediastino	1	1,2
Secreção traqueal	1	1,2
TOTAL	82	100

4.4 Testes de suscetibilidade de *C. tropicalis* a drogas antifúngicas

4.4.1 Teste de suscetibilidade pelo método de referência M27-A3 (CLSI, 2008)

Por este método, a suscetibilidade de 82 isolados de *C. tropicalis* foi avaliada em relação aos antifúngicos fluconazol e itraconazol. Para anfotericina B, foram testados 46 isolados. As leituras foram realizadas visualmente com 24 e 48 horas de incubação.

Para fluconazol, os valores das CIMs variaram de 0,25 μ g/mL a \geq 64 μ g/mL nas leituras realizadas com 24 horas de incubação. Com 48 horas, os valores ficaram entre 0,125 μ g/mL (que corresponde ao isolado que não cresceu com 24 horas de incubação) e \geq 64 μ g/mL (Figura 3).

Para itraconazol, as leituras realizadas com 24 horas de incubação propiciaram uma faixa de valores das CIMs entre 0,015 μ g/mL e 1 μ g/mL. Com 48 horas, os valores das CIMs ficaram entre 0,015 μ g/mL a \geq 4 μ g/mL (Figura 4).

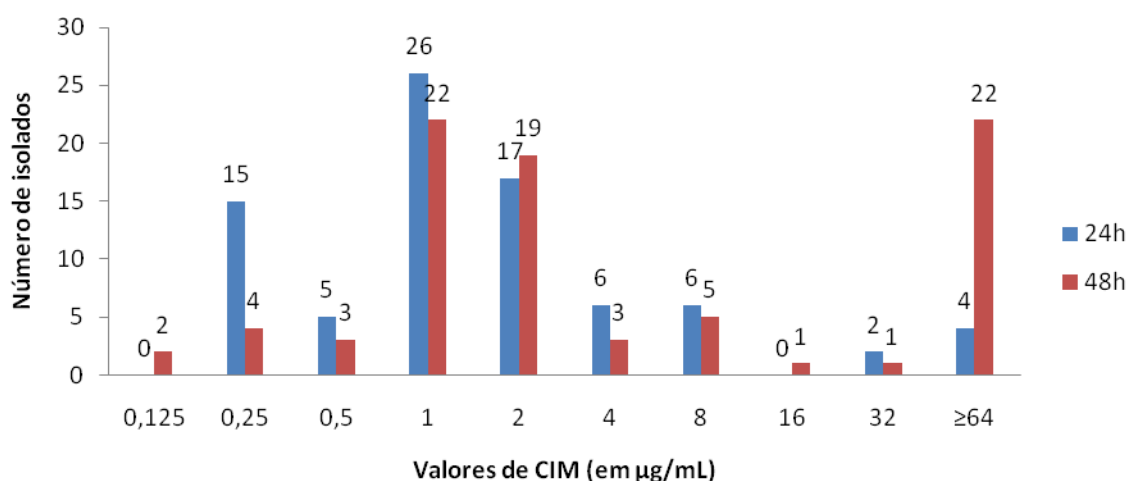


Figura 3- Valores das CIMs de fluconazol obtidos pelo método de referência, com 24 e 48 horas de incubação.

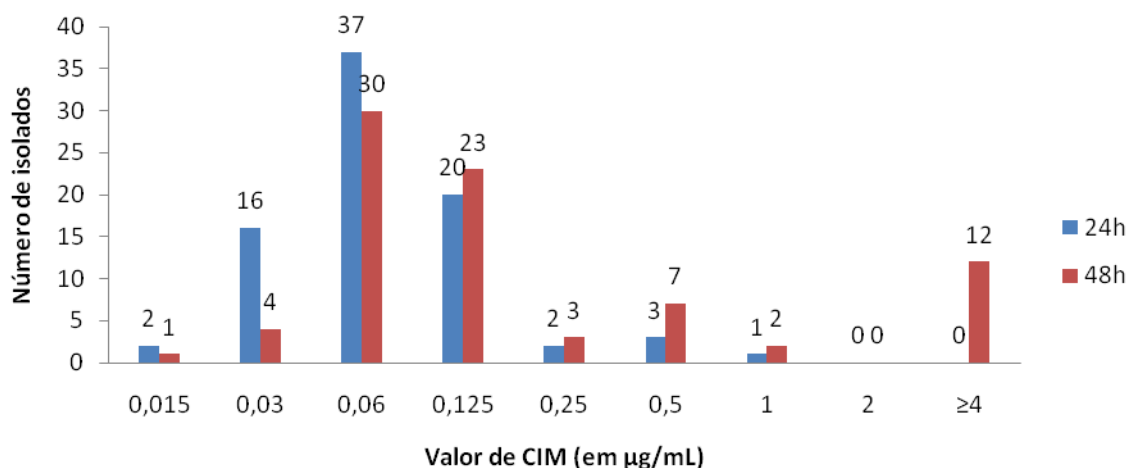


Figura 4- Valores das CIMs de itraconazol obtidos pelo método de referência, com 24 e 48 horas de incubação.

Nos testes de suscetibilidade à anfotericina B, os valores de CIMs oscilaram entre 0,06µg/mL e 0,25µg/mL com 24 horas e com 48 horas, entre 0,06µg/mL e 1µg/mL. Mesmo com alteração nas CIMs após prolongamento da incubação, todos os isolados testados permaneceram sensíveis a anfotericina B (Figura 5).

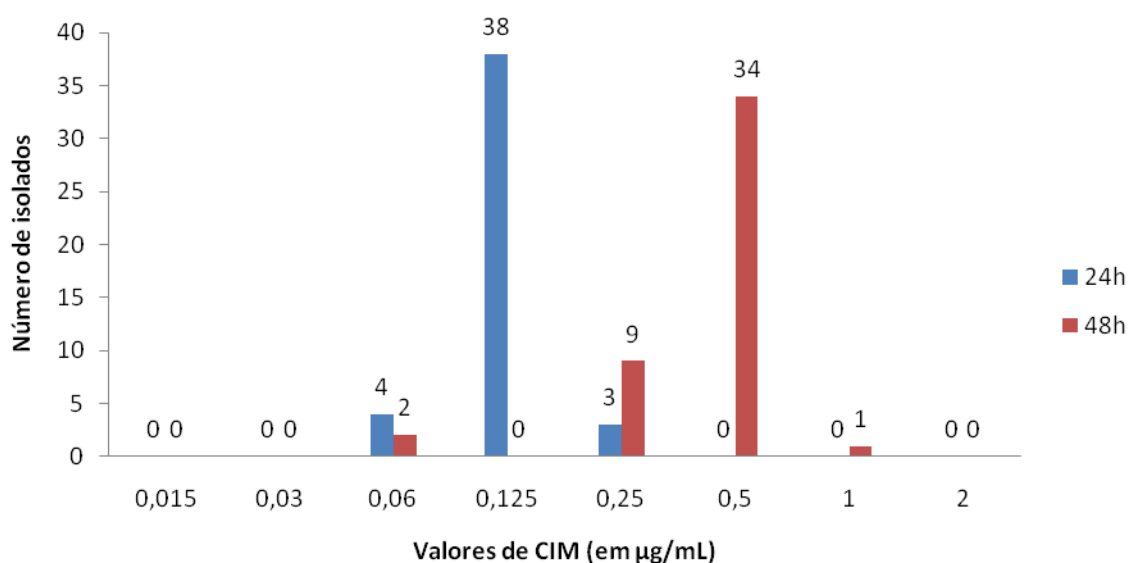


Figura 5- Valores das CIMs de anfotericina B pelo método de referência, com 24 e 48 horas de incubação.

Obteve-se 5% de isolados de *C. tropicalis* resistentes a fluconazol e 1,2% resistentes a itraconazol, com 24 horas de incubação. Com 48 horas de incubação, o percentual de resistência aumentou cerca de cinco vezes para fluconazol (26%) e quase quatorze vezes para itraconazol (17%). A Figura 6 ilustra a variação no número de isolados por categoria, de acordo com o período de incubação e com o antifúngico testado.

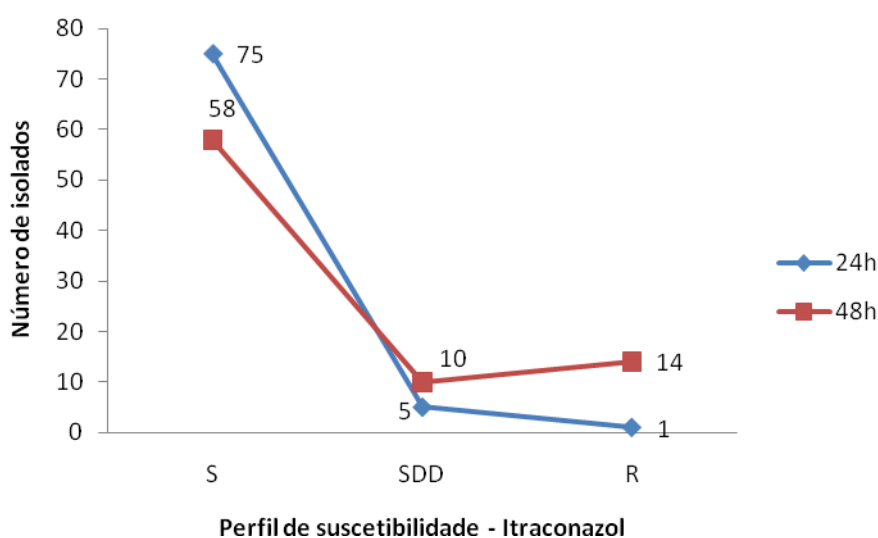
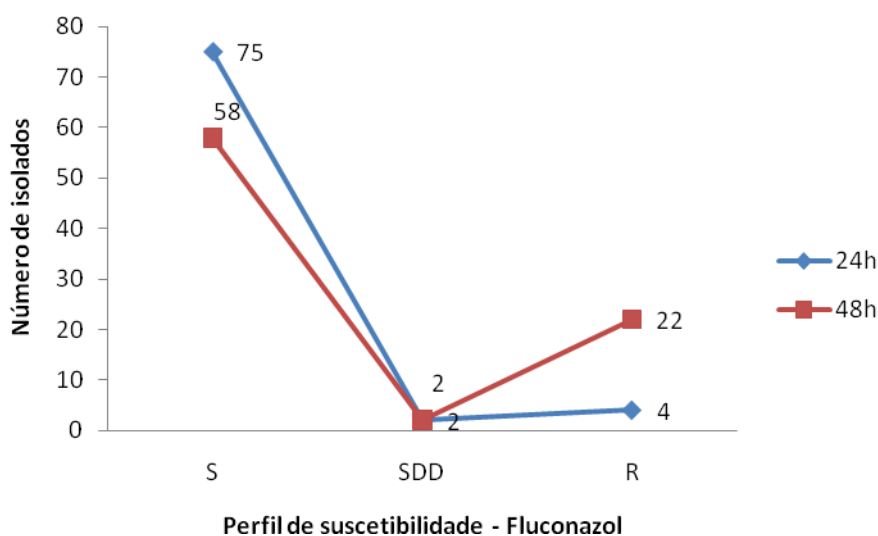


Figura 6- Distribuição do número de isolados por categoria e de acordo com o período de incubação, para os antifúngicos fluconazol e itraconazol. S: sensível; SDD: sensível dependente da dose; R: resistente

Comparando as leituras de 24 horas com 48 horas, o perfil de concordância categórica (quantos isolados permaneceram na mesma categoria de suscetibilidade) para fluconazol foi de 75,31% e para itraconazol foi de 74,07% (Tabela 3).

Os erros menores (variação em apenas uma categoria quando se compara as leituras em diferentes tempos de incubação), foram de 4,94% para fluconazol e 13,58% para itraconazol. Nenhum isolado foi sensível com 48 horas e resistente com 24 horas de incubação, o que representou ausência de erros maiores para fluconazol e itraconazol. Os erros muito maiores (resistente com 48 horas e sensível com 24 horas) corresponderam a 19,75% para fluconazol e a 12,35% para itraconazol.

O perfil de concordância essencial, que avalia os isolados que não apresentaram mais que duas diluições de diferença entre as duas leituras mostrou-se semelhante aos percentuais da concordância categórica, representando 71,6% para fluconazol e 77,8% para itraconazol (Tabela 3).

Tabela 3- Perfis de suscetibilidade de 82 isolados de *C. tropicalis* a fluconazol e itraconazol e representação dos resultados discrepantes e das concordâncias, de acordo com as CIMs obtidas com 24 e 48 horas de incubação

Droga	Nº (%) de isolados por categoria			Nº (%) de isolados com resultados discrepantes (representados por tipos de erros)			Nº (%) de concordância categórica	Nº (%) de concordância essencial
	S	SDD	R	Menor	Maior	Muito maior		
Fluconazol								
24h*	75 (92,59%)	2 (2,47%)	4 (4,94%)	4 (4,94%)	0	16 (19,75%)	61 (75,31%)	58 (71,60%)
48h**	58 (70,73%)	2 (2,44%)	22 (26,83%)					
Itraconazol								
24h*	75 (92,59%)	5 (6,17%)	1 (1,23%)	11 (13,58%)	0	10 (12,35%)	60 (74,07%)	63 (77,78%)
48h**	58 (70,73%)	10 (12,19%)	14 (17,07%)					

* 01 isolado não apresentou crescimento com 24 horas de incubação, logo, o percentual de isolados por categoria para 24 horas, a concordância categórica, essencial e os erros para fluconazol e itraconazol foram calculados com 81 isolados

** R a 48 horas inclui os isolados previamente R a 24 horas

4.4.1.1 Interferência do fenômeno *trailing* nos resultados dos testes de suscetibilidade pelo método de referência M27-A3

O fenômeno de crescimento *trailing* observado para alguns isolados de *Candida* spp., e em especial para *C. tropicalis*, pode ser definido como um crescimento residual que ocorre frente a exposição aos antifúngicos, principalmente azólicos. Este crescimento dificulta e confunde a leitura dos valores de CIM, pois o isolado permanece com o crescimento mesmo em concentrações acima destes valores. Este fenômeno tem grande impacto sobre o tempo de leitura do teste, ao ponto de um isolado S a 24 horas de incubação poder até mesmo se apresentar R com 48 horas.

Nos testes de suscetibilidade realizados de acordo com o método de referência M27-A3, dentre os 82 isolados de *C. tropicalis* testados com as drogas fluconazol e itraconazol, 23 (28,05%) apresentaram o fenômeno *trailing* para uma ou para as duas drogas, com variados perfis de crescimento (conforme Tabela 4). Dentre o total de isolados analisados, 20 (24,39%) apresentaram *trailing* para fluconazol e 18 (21,95%) para itraconazol.

O *trailing* alterou o perfil de suscetibilidade com a leitura com 48 horas de incubação para alguns destes isolados. Para fluconazol, 19,51% (16) dos isolados foram sensíveis ($CIM \leq 8\mu\text{g/mL}$) nas leituras realizadas com 24 horas, mas resistentes ($CIM \geq 64\mu\text{g/mL}$) em 48 horas de incubação. Para itraconazol, este percentual foi menor, sendo que 12,19% (10) dos isolados testados alteraram seus valores de CIM $\leq 0,125\mu\text{g/mL}$ em 24 horas para $\geq 1\mu\text{g/mL}$ em 48 horas (Figura 7). Este fenômeno não foi observado para nenhum isolado testado com anfotericina B.

Tabela 4- Perfis de crescimento de *C. tropicalis* frente aos antifúngicos fluconazol e itraconazol, de acordo com o período de incubação.

Perfis de crescimento observados*	Fluconazol	Itraconazol
S a 24h com t**	11 (55%)	5 (27,77%)
SDD a 24h com t	0	2 (11,11%)
R a 24h com t	0	1 (5,55%)
S a 48h com t	2 (10%)	2 (11,11%)
SDD a 48h com t	0	2 (11,11%)
R a 48h com t	0	2 (11,11%)
S a 24h/ R a 48h (com t a 24h)	10 (50%)	4 (22,22%)
S a 24h/ R a 48h (sem t a 24h)	6 (30%)	5 (27,77%)
SDD a 24h/ R a 48h (com t a 24h)	0	2 (11,11%)
SDD a 24h/ R a 48h (sem t a 24h)	2 (10%)	1 (5,55%)
Total	20	18

*Alguns isolados foram inclusos em mais de uma categoria, por apresentarem um perfil de *trailing* com 24 horas de incubação e outro perfil com 48 horas de incubação.

**t representa a ocorrência do fenômeno *trailing*, crescimento fúngico ao longo de concentrações crescentes da droga

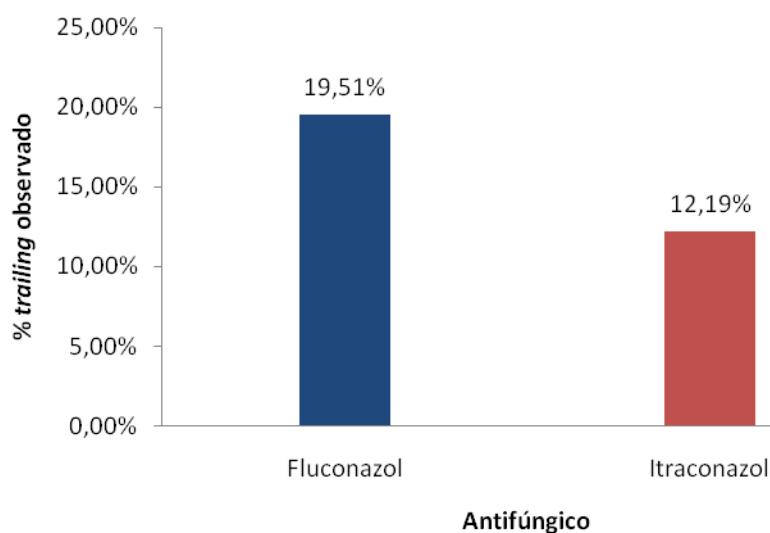


Figura 7- Percentuais de isolados de *C. tropicalis* que apresentaram *trailing* com alteração do perfil de suscetibilidade de S com 24 horas de incubação a R com 48 horas de incubação frente aos antifúngicos fluconazol e itraconazol.

Todos os isolados que apresentaram *trailing* ou resistência para uma ou duas drogas azólicas foram selecionados para serem analisados com testes modificados (isolados com os variados perfis de crescimento apresentados na Tabela 4). Para fluconazol, foram selecionados 20 isolados que apresentaram *trailing* e 4 isolados considerados R com 24 horas de incubação, totalizando 24 isolados. Para itraconazol, foram selecionados 18 isolados que apresentaram *trailing*, sendo que um destes isolados mostrou-se R com 24 horas de incubação.

4.4.2 Testes de suscetibilidade modificados- alteração na temperatura de incubação, adição de tricostatina A e resazurina

Devido às dificuldades na determinação dos valores de CIM para os isolados que apresentaram o fenômeno *trailing*, três principais modificações foram realizadas, separadamente, no intuito de melhorar estas leituras, evidenciando mais claramente as CIMs. Todas as leituras foram realizadas com 24 e 48 horas de incubação e os testes foram realizados com os antifúngicos fluconazol e itraconazol.

A primeira alteração se refere à mudança na temperatura de incubação dos testes: pelo documento M27-A3, as placas devem ser incubadas à temperatura de 35° enquanto que no teste modificado, as placas foram incubadas na temperatura de 42°C; a segunda alteração foi a adição de 3µg/mL de tricostatina A ao inóculo recém-preparado (antes de ser adicionado à placa teste) e a terceira alteração foi a adição de 30µL do composto colorimétrico resazurina a concentração 0,02%(p/v) a cada poço com 24 horas de incubação. Os demais procedimentos para a determinação do perfil de suscetibilidade do teste foram realizados conforme o documento M27-A3 do CLSI.

Pelos métodos modificados houve redução no número de isolados que apresentaram *trailing*, nos variados perfis de crescimento observados (Tabela 5). Todos os três métodos modificados reduziram a ocorrência do fenômeno *trailing* com 24 horas de incubação, em relação ao método M27-A3, com o antifúngico fluconazol. Contudo, somente a incubação a 42°C ou a adição de tricostatina A

estabilizaram este resultado durante prolongamento do tempo de incubação para 48 horas. O método com adição do composto colorimétrico resazurina mostrou porcentagens semelhantes com o método de referência (19 *versus* 22 isolados resistentes em 48 horas de incubação, respectivamente) (Tabela 5).

Da mesma forma, as leituras com itraconazol mostraram similaridades na classificação como resistente dos isolados testados pelo método de referência e pela adição de resazurina, enquanto que no método modificado com incubação a 42°C ou com adição de tricostatina A, nenhum isolado mostrou-se SDD ou resistente, independentemente do período de incubação (Tabela 5).

É válido destacar que a ocorrência do *trailing* sem alteração do perfil de suscetibilidade de S com 24 horas e R com 48 horas foi eliminada pelos métodos a 42°C e com tricostatina A, independente do período de incubação. O método com adição de resazurina eliminou este crescimento com 24 horas, mas não foi capaz de sustentar este perfil com 48 horas de incubação, com ambos antifúngicos. Para tornar possível a determinação dos perfis de concordâncias, foram avaliadas as variações que alteraram o perfil de suscetibilidade de acordo com o período de incubação.

Quando se avalia a redução do *trailing* que altera a categoria do isolado de S com 24 horas a R com 48 horas de incubação, pode-se verificar, conforme a Tabela 6, que os métodos a 42°C e com a adição de tricostatina A foram mais eficazes que o método com adição de resazurina para reduzir este fenômeno.

Tabela 5- Perfis de suscetibilidade de 24 isolados de *C. tropicalis* frente a fluconazol e de 18 isolados de *C. tropicalis* frente a itraconazol, pelo método de referência e pelos métodos modificados, em 24 e 48 horas de incubação.

Método	Fluconazol			Itraconazol		
	Nº (%) de isolados por categoria			Nº (%) de isolados por categoria		
	S	SDD	R	S	SDD	R
CLSI						
24h	18 (75%)	2 (8,33%)	4 (16,67%)	14 (77,78%)	3 (16,67%)	1 (5,56%)
48h	2 (8,33%)	0	22 (91,67%)	2 (11,11%)	2 (11,11%)	14 (77,78%)
42°C						
24h	21 (87,5%)	1 (4,17%)	2 (8,33%)	18 (100%)	0	0
48h	19 (79,17%)	2 (8,33%)	3 (12,5%)	18 (100%)	0	0
Tricostatina A						
24h*	21 (91,30%)	0	2 (8,70%)	17 (100%)	0	0
48h	20 (83,33%)	2 (8,33%)	2 (8,33%)	18 (100%)	0	0
Resazurina						
24h**	21 (87,5%)	1 (4,17%)	2 (8,33%)	16 (94,12%)	0	1 (5,88%)
48h	5 (20,83%)	0	19 (79,17%)	4 (22,22%)	2 (11,11%)	12 (66,67%)

* 01 isolado não cresceu por esta técnica quando testado com os dois antifúngicos; logo, os percentuais para fluconazol foram calculados com 23 isolados e para itraconazol com 17 isolados

**01 isolado não cresceu por esta técnica quando testado com itraconazol; logo, os percentuais para itraconazol foram calculados com 17 isolados

Tabela 6- Análise da redução do *trailing* que levou à alteração da categoria dos isolados de S a R com 48 horas de incubação, que foi obtida através dos métodos modificados.

Método/ Agente antifúngico	Nº (%) de redução de trailing*
42°C	
Fluconazol	14 (87,5%)
Itraconazol	10 (100%)
Tricostatina A	
Fluconazol	15 (93,75%)
Itraconazol	10 (100%)
Resazurina	
Fluconazol	3 (18,75%)
Itraconazol	3 (30%)

*Isolados que eram S com 24 horas e R com 48 horas de incubação pelo método padrão (n= 16 para fluconazol; n= 10 para itraconazol) e que se mostraram S com 48 horas pelo método modificado.

4.5 Análise das concordâncias entre as metodologias

Os métodos modificados foram empregados com o objetivo de aprimorar o método referência, proposto pelo CLSI. Para tal, as concordâncias foram calculadas utilizando-se os resultados de *trailing* observados que alteraram os valores de CIM e da categoria dos isolados de *C. tropicalis* testados.

4.5.1 Concordâncias categóricas

A maior discrepância ocorreu quando foi avaliado o erro muito maior (isolados classificados como R pela metodologia de referência e S pelo método modificado) para 48 horas de incubação com fluconazol. Neste contexto, os métodos a 42°C ou com tricostatina A apresentaram um menor percentual de isolados resistentes com

48 horas de incubação, que somado aos demais erros observados, propiciaram concordâncias categóricas baixas de 20,83% e 16,67%, respectivamente. Entretanto, os resultados foram semelhantes quando se comparou o método de referência com o método com resazurina (Tabela 7 e Figura 8).

Para o antifúngico itraconazol, um perfil semelhante foi observado. Os erros muito maiores foram elevados com os métodos a 42°C e com tricostatina A e a concordância categórica ficou baixa (aproximadamente 11%) (Tabela 8 e Figura 8).

Tabela 7- Determinação dos tipos de erros e de porcentagem de concordância categórica na classificação frente ao fluconazol de 24 isolados de *C. tropicalis* quando se comparou método de referência com métodos modificados

Método	Nº (%) de isolados com resultados discrepantes***						Nº (%) de concordância categórica
	Menor**				Maior (S vs R)**	Muito maior (R vs S)**	
	S vs S-DD	S-DD vs S	S-DD vs R	R vs S-DD			
42°C							
24h	0	1 (4,17%)	0	0	0	2 (8,33%)	21 (87,5%)
48h	0	0	0	2 (8,33%)	0	17 (70,83%)	5 (20,83%)
Tricostatina A							
24h*	0	2 (8,70%)	0	0	0	2 (8,70%)	19 (82,61%)
48h	0	0	0	2 (8,33%)	0	18 (75%)	4 (16,67%)
Resazurina							
24h	0	1 (4,17%)	0	0	0	2 (8,33%)	21 (87,5%)
48h	0	0	0	0	0	3 (12,5%)	21 (87,5%)

* 1 isolado não cresceu com 24h de incubação; logo, os percentuais foram calculados com 23 isolados

** A primeira categoria refere-se ao método de referência

*** Os testes modificados foram comparados com o método padrão de acordo com o período de incubação (24h com 24h; 48h com 48h)

Tabela 8- Determinação dos tipos de erros e de porcentagem de concordância categórica na classificação frente ao itraconazol de 18 isolados de *C. tropicalis* quando se comparou método de referência com métodos modificados.

Método	Nº de isolados com resultados discrepantes***						Nº (%) de concordância categórica
	Menor**				Maior (S vs R)	Muito maior (R vs S)	
	S vs S-DD	S-DD vs S	S-DD vs R	R vs S-DD			
42°C							
24h	0	3 (16,67%)	0	0	0	1 (5,56%)	14 (77,78%)
48h	0	2 (11,11%)	0	0	0	14 (77,78%)	2 (11,11%)
Tricostatina A							
24h*	0	3 (17,65%)	0	0	0	1 (5,88%)	13 (76,47%)
48h	0	2 (11,11%)	0	0	0	14 (77,78%)	2 (11,11%)
Resazurina							
24h*	0	3 (17,65%)	0	0	1 (5,88%)	1 (5,88%)	12 (70,58%)
48h	0	0	2 (11,11%)	2 (11,11%)	1 (5,56%)	3 (16,67%)	10 (55,56%)

* 1 isolado não cresceu com 24h de incubação; logo, os percentuais foram calculados com 17 isolados

** A primeira categoria refere-se ao método de referência

*** Os testes modificados foram comparados com o método padrão de acordo com o período de incubação (24h com 24h; 48h com 48h)

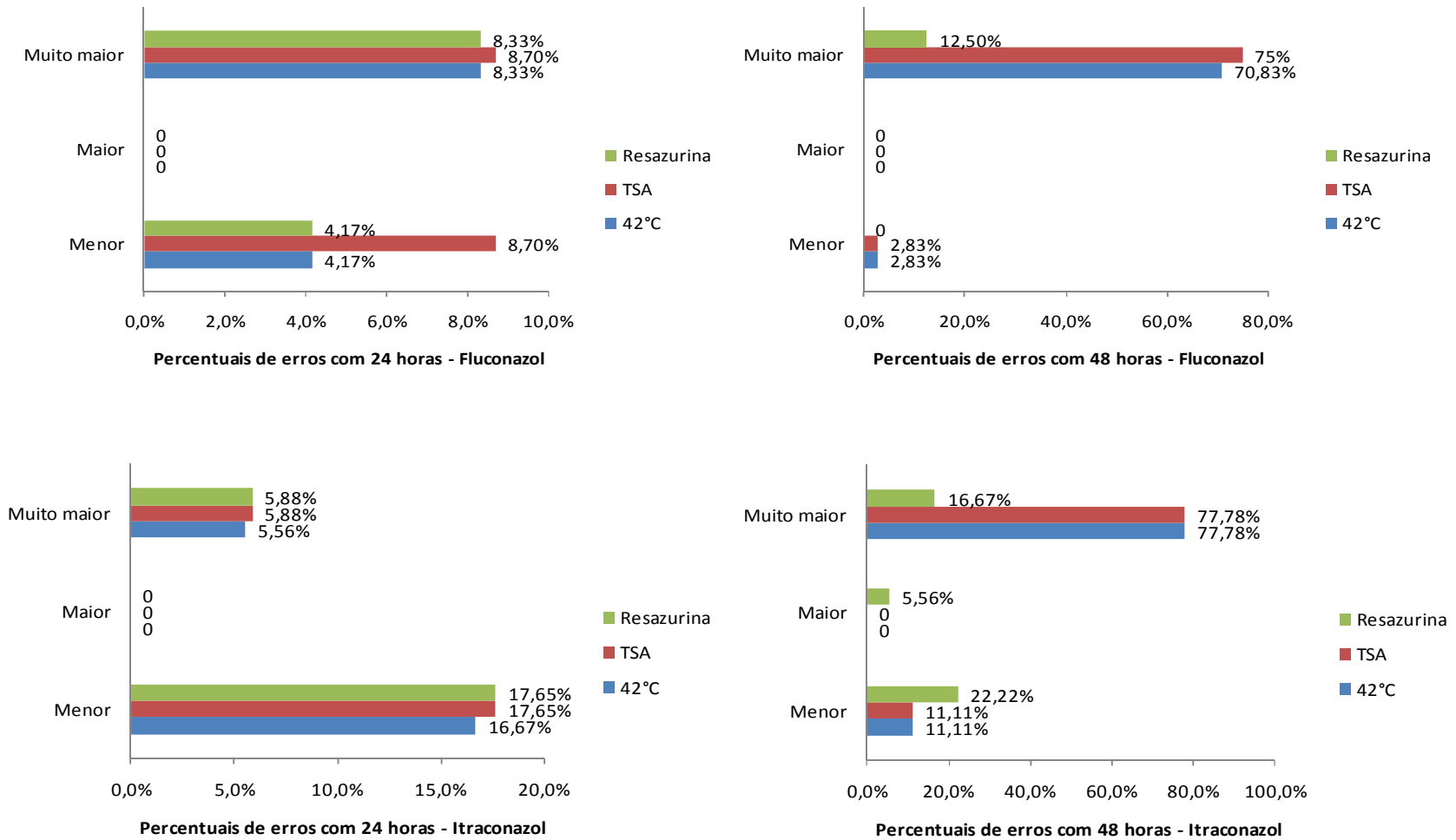


Figura 8- Número de isolados com respectivos perfis de erros em relação à concordância categórica, de acordo com antifúngico testado e o período de incubação.

4.5.2 Concordâncias essenciais

Quando se avalia os métodos de referência e modificados, para os mesmos isolados, em relação às variações maiores que duas diluições a 48 horas, as maiores porcentagens de concordâncias essenciais foram observadas para o antifúngico fluconazol e os métodos que apresentaram menores porcentagens de concordância essencial foram a incubação a 42°C ou a adição de tricostatina A (Tabela 9). Como pode ser observado na Tabela 10, perfil semelhante de resultados foi obtido para itraconazol.

É importante verificar que em todas as análises e para ambos antifúngicos, as concordâncias (categóricas e essenciais) foram mais elevadas com 24 horas do que com 48 horas de incubação. Exceção para a concordância essencial quando se testou o antifúngico fluconazol com a metodologia com adição de resazurina, em que a concordância com 48 horas foi superior à obtida com 24 horas (Figura 9).

Tabela 9- Variações nas CIMs de 24 isolados de *C. tropicalis* e porcentagens de concordância essencial para fluconazol, testados pelo método de referência e pelos métodos modificados

Método	Nº (%) de discrepâncias entre os valores de CIM							Nº (%) de concordância essencial**
	< -2	-2	-1	0	1	2	> +2	
42°C								
24h	2 (8,33%)	1 (4,17%)	3 (12,5%)	7 (29,17%)	3 (12,5%)	5 (20,83%)	3 (12,5%)	19 (79,17%)
48h	0	0	0	5 (20,83%)	0	2 (8,33%)	17 (70,83%)	7 (25,93%)
Tricostatina A								
24h*	3 (13,04%)	2 (8,69%)	4 (17,39%)	8 (34,78%)	1 (4,34%)	3 (13,04%)	3 (13,04%)	18 (78,26%)
48h	0	0	0	6 (25%)	2 (8,33%)	0	18 (75%)	8 (33,33%)
Resazurina								
24h	1 (4,17%)	1 (4,17%)	4 (16,67%)	9 (37,5%)	3 (12,5%)	3 (12,5%)	3 (12,5%)	20 (83,33%)
48h	0	0	2 (8,33%)	19 (79,17%)	0	0	3 (12,5%)	21 (87,5%)

* 1 isolado não cresceu com 24h de incubação; logo, os percentuais foram calculados com 23 isolados

** A concordância essencial foi calculada considerando a variação até de 2 diluições

Tabela 10- Variações nas CIMs de 18 isolados de *C. tropicalis* e porcentagens de concordância essencial para itraconazol, testados pelo método de referência e pelos métodos modificados

Método	N° (%) de discrepâncias entre os valores de CIM							N° (%) de concordância essencial
	< -2	-2	-1	0	1	2	> +2	
42°C								
24h	0	0	2 (11,11%)	10 (55,55%)	2 (11,11%)	2 (11,11%)	2 (11,11%)	16 (88,89%)
48h	0	0	1 (5,55%)	0	1 (5,55%)	1 (5,55%)	15 (83,33%)	3 (16,67%)
Tricostatina A								
24h*	0	0	2 (11,76%)	3 (17,64%)	7 (41,18%)	1 (5,88%)	4 (23,53%)	13 (76,47%)
48h	0	3 (16,67%)	1 (5,55%)	0	1 (5,55%)	1 (5,55%)	15 (83,33%)	3 (16,67%)
Resazurina								
24h*	1 (5,88%)	0	3 (17,64%)	8 (47,06%)	1 (5,88%)	2 (11,76%)	2 (11,76%)	14 (82,35%)
48h	3 (16,67%)	1 (5,55%)	0	9 (50%)	0	0	5 (27,78%)	10 (55,5%)

* 1 isolado não cresceu com 24h de incubação; logo, os percentuais foram calculados com 23 isolados

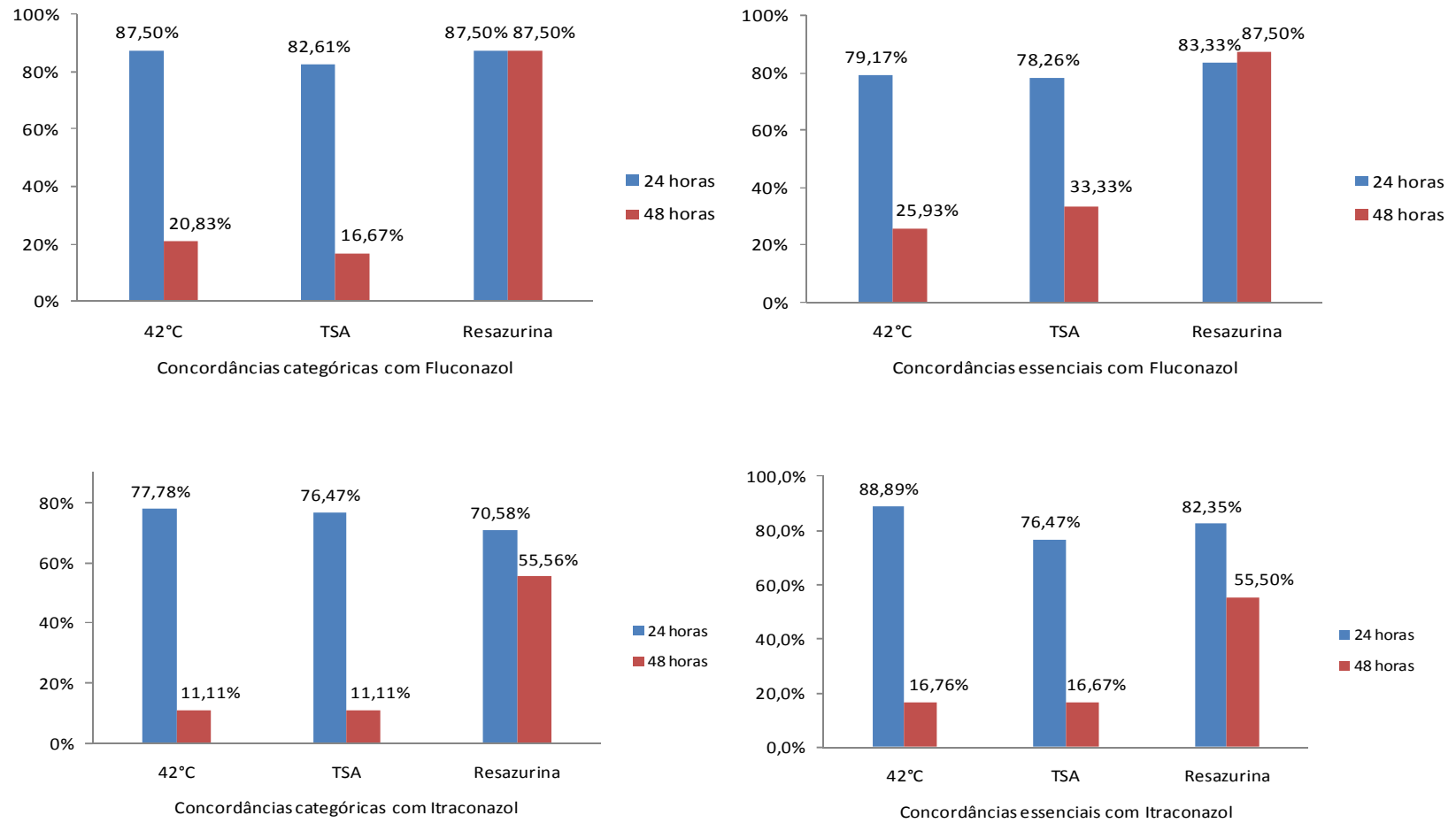


Figura 9- Concordâncias categóricas e essenciais obtidas em relação à metodologia padrão com os métodos modificados para fluconazol e itraconazol, de acordo com o período de incubação

4.6 Análise das leituras por método visual e espectrofotométrico e em diferentes períodos de incubação

Foi avaliado adicionalmente o efeito de diferentes tempos de incubação: 18, 20, 22, 24 e 48 horas na determinação dos valores das CIM de isolados de *C. tropicalis* para fluconazol e itraconazol, através de leituras visuais ou espectrofotométricas, empregando-se o método CLSI e o método modificado a 42°C. Os isolados selecionados foram os mesmos para as duas técnicas, considerando o mesmo agente antifúngico.

Pelo método M27-A3 e com o antifúngico fluconazol, a concordância geral entre as formas de leitura nos períodos testados variou de 84 a 96%, sendo que a melhor concordância foi obtida com um período de incubação de 20 horas (96%). Concordância semelhante foi obtida entre as formas de leitura nos tempos de 24 e 48 horas. Os resultados estão demonstrados na Tabela 11.

Pelo método M27-A3 e com o antifúngico itraconazol, os perfis de concordância entre as formas de leitura foram de 88% para 18 horas e de 92% para os demais tempos de incubação (Tabela 12).

Tabela 11- Percentuais de concordância na categorização da suscetibilidade de 25 isolados de *C. tropicalis* ao antifúngico Fluconazol, de acordo com a forma de leitura (visual ou espectrofotométrica) e o tempo de incubação, pelo método M27-A3

Tempo de incubação (h)	Tipo de leitura	Nº (%) de isolados por categoria			% de concordância entre os métodos
		S	SDD	R	
18	Visual ***	23 (92%)	0	0	
18	Espectrofotométrica	24 (96%)	1 (4%)	0	92%
	% de discrepância entre as leituras	4	4	0	
20	Visual *	21 (84%)	2 (8%)	1 (4%)	
20	Espectrofotométrica	22 (88%)	2 (8%)	1 (4%)	96%
	% de discrepância entre as leituras	4	0	0	
22	Visual	22 (88%)	2 (8%)	1 (4%)	
22	Espectrofotométrica	21 (84%)	3 (12%)	1 (4%)	92%
	% de discrepância entre as leituras	4	4	0	
24	Visual	21 (84%)	1 (4%)	3 (12%)	
24	Espectrofotométrica	20 (80%)	3 (12%)	2 (8%)	84%
	% de discrepância entre as leituras	4	8	4	
48	Visual	10 (40%)	0	15 (60%)	
48	Espectrofotométrica	11 (44%)	1 (4%)	13 (52%)	84%
	% de discrepância entre as leituras	4	4	8	

*01 isolado não cresceu

**3 isolados não cresceram

***2 isolados não cresceram

Tabela 12 - Percentuais de concordância na categorização da suscetibilidade de 26 isolados de *C. tropicalis* ao antifúngico itraconazol, de acordo com a forma de leitura (visual ou espectrofotométrica) e o tempo de incubação pelo método do CLSI.

Tempo de incubação (h)	Tipo de leitura	Nº (%) de isolados por categoria			% de concordância entre os métodos
		S	SDD	R	
18	Visual	23 (88,46%)**	0	0	
18	Espectrofotométrica	25 (96,15%)	1 (3,85%)	0	88%
	% de discrepância entre as leituras	7,69	3,85	0	
20	Visual	25 (96,15%)	1 (3,85%)	0	
20	Espectrofotométrica	26 (100%)	0	0	92%
	% de discrepância entre as leituras	3,85	3,85	0	
22	Visual	25 (96,15%)	1 (3,85%)	0	
22	Espectrofotométrica	24 (92,31%)	2 (7,69%)	0	92%
	% de discrepância entre as leituras	3,84	3,84	0	
24	Visual	24 (92,31%)	2 (7,69%)	0	
24	Espectrofotométrica	24 (92,31%)	1 (3,85%)	1 (3,85%)	92%
	% de discrepância entre as leituras	0	3,84	3,85	
48	Visual	13 (50%)	4 (15,38%)	9 (34,62%)	
48	Espectrofotométrica	14 (53,85%)	3 (11,54%)	9 (34,62%)	92%
	% de discrepância entre as leituras	3,85	3,84	0	

*01 isolado não cresceu

**3 isolados não cresceram

***2 isolados não cresceram

Adicionalmente, foi avaliada a influência da forma de leitura, de acordo com o tempo de incubação na metodologia a 42°C. Para fluconazol, a concordância entre as formas de leitura foi de 100% com 24 horas de incubação e o percentual de concordância mais baixo encontrado (84%) foi com 18 horas de incubação (Tabela 13). Neste mesmo método, foram obtidos os melhores graus de concordância para itraconazol, com valores na faixa de 92% (para as leituras realizadas com 18 horas

de incubação) a 100% (para a leitura realizada com 48 horas de incubação) (Tabela 14).

Tabela 13- Percentuais de concordância na categorização da suscetibilidade de 25 isolados de *C. tropicalis* ao antifúngico fluconazol, de acordo com a forma de leitura (visual ou espectrofotométrica) e o tempo de incubação pelo método modificado, com temperatura de incubação de 42°C.

Tempo de incubação (h)	Tipo de leitura	Nº (%) de isolados por categoria			% de concordância entre os métodos
		S	SDD	R	
18	Visual	21 (84%)*	3 (12%)	0	
18	Espectrofotométrica	22 (88%)*	1 (4%)	1 (4%)	84%
	% de discrepância entre as leituras	4	8	4	
20	Visual	21 (84%)*	3 (12%)	0	
20	Espectrofotométrica	21 (84%)*	2 (8%)	1 (4%)	92%
	% de discrepância entre as leituras	0	4	4	
22	Visual	21 (84%)*	3 (12%)	0	
22	Espectrofotométrica	21 (84%)*	2 (8%)	1 (4%)	92%
	% de discrepância entre as leituras	0	4	4	
24	Visual	21 (84%)*	2 (8%)	1 (4%)	
24	Espectrofotométrica	21 (84%)*	2 (8%)	1 (4%)	100%
	% de discrepância entre as leituras	0	0	0	
48	Visual	20 (80%)	2 (8%)	3 (12%)	
48	Espectrofotométrica	20 (80%)	3 (12%)	2 (8%)	92%
	% de discrepância entre as leituras	0	4	4	

*01 isolado não cresceu

**3 isolados não cresceram

***2 isolados não cresceram

Tabela 14- Percentuais de concordância na categorização da suscetibilidade de 26 isolados de *C. tropicalis* ao antifúngico itraconazol, de acordo com a forma de leitura (visual ou espectrofotométrica) e o tempo de incubação pelo método modificado, com temperatura de incubação de 42°C.

Tempo de incubação (h)	Tipo de leitura	Nº (%) de isolados por categoria			% de concordância entre os métodos
		S	SDD	R	
18	Visual	24 (92,31%)***	0	0	
18	Espectrofotométrica	25 (96,15%)	1 (3,85%)	0	92%
	% de discrepância entre as leituras	3,84	3,85	0	
20	Visual	25 (96,15%)*	0	0	
20	Espectrofotométrica	25 (96,15%)	1 (3,85%)	0	96%
	% de discrepância entre as leituras	0	3,85	0	
22	Visual	25 (96,15%)*	0	0	
22	Espectrofotométrica	25 (96,15%)	1 (3,85%)	0	96%
	% de discrepância entre as leituras	0	3,85	0	
24	Visual	24 (92,31%)*	1 (3,85%)	0	
24	Espectrofotométrica	25 (96,15%)	1 (3,85%)	0	96%
	% de discrepância entre as leituras	3,84	0	0	
48	Visual	24 (92,31%)	2 (7,69%)	0	
48	Espectrofotométrica	24 (92,31%)	2 (7,69%)	0	100%
	% de discrepância entre as leituras	0	0	0	

*01 isolado não cresceu

**3 isolados não cresceram

***2 isolados não cresceram

Em geral, para fluconazol, as melhores correlações entre as formas de leitura visual e espectrofotométrica foram obtidas no tempo de 20 horas de incubação a 35°C (96%) e de 24 horas de incubação com o método modificado, com incubação a 42°C (100%), enquanto que para itraconazol, as melhores correlações foram nos tempos de 20, 22, 24 e 48h (92%) com incubação de 35°C e no tempo de 48h (100%) com incubação de 42°C (100%) (Figura 10).

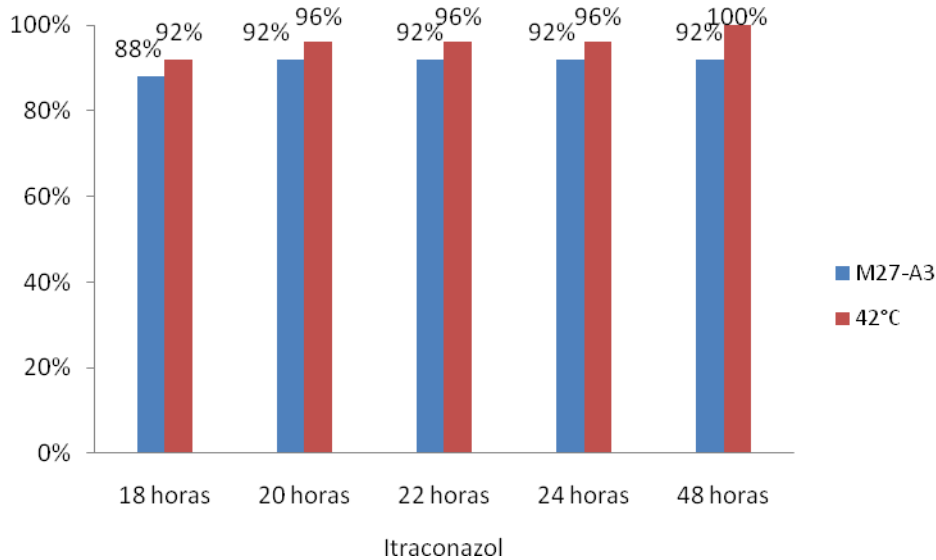
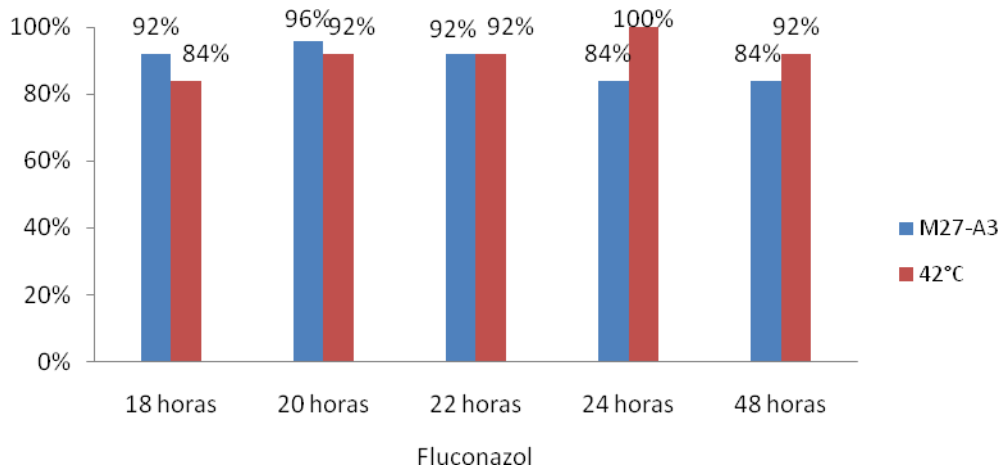


Figura 10- Concordância entre as formas de leitura, de acordo com o período de incubação e com a metodologia realizada, para fluconazol e itraconazol.

4.7 Análise da resposta à terapia antifúngica dos pacientes dos quais foram obtidos os isolados de *C. tropicalis* para os métodos modificados

Foram analisados 03 prontuários (Anexo 10) referentes aos 04 isolados de *C. tropicalis* que apresentaram sensibilidade, crescimento tipo *trailing* e resistência nos

testes de suscetibilidade pelo método referência e que levaram à sua seleção para os métodos modificados.

O isolado número 432 apresentou crescimento tipo *trailing* no teste de suscetibilidade realizado segundo metodologia M27-A3, foi classificado como sensível nos testes modificados e, segundo análise de prontuário, respondeu à terapia com fluconazol. O isolado 449 foi um isolado com perfil sensível *in vitro* e com resposta eficaz à terapêutica com fluconazol. Os isolados 2483A/2483B foram resistentes *in vitro* a fluconazol pelo método de referência e pelos métodos modificados e não responderam ao tratamento *in vivo* (Tabela 15).

Tabela 15- Análise da resposta à terapia antifúngica com fluconazol de 03 pacientes cujos prontuários foram analisados.

Nº de identificação	Perfil de suscetibilidade <i>in vitro</i> com Fluconazol*	Perfil de suscetibilidade a Fluconazol com metodologias modificadas	Perfil de suscetibilidade <i>in vitro</i> com Itraconazol*	Primeiro antifúngico utilizado	Resposta terapêutica
432	<i>trailing</i>	Sensível	<i>trailing</i>	Fluconazol	Sucesso
449	Sensível	Não realizado	Sensível	Fluconazol	Sucesso
2483A/2483B	Resistente	Resistente	Sensível	Fluconazol	Falência**

* Segundo M27-A3

**Seguido por Anfotericina B

5 DISCUSSÃO

A incidência de infecções de corrente sanguínea causadas por *Candida* spp. tem aumentado nas últimas décadas e ganhado destaque como importante causa de infecções nosocomiais, com crescente ocorrência de espécies não-*albicans* (HORN et al., 2009; SIPSAS et al., 2009; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010; PFALLER et al., 2010a; PFALLER et al., 2010b; PEREIRA et al., 2010; RODRÍGUEZ et al., 2010).

A taxa de candidemia varia entre os hospitais analisados. No presente estudo, a ocorrência média de candidemia no HUCAM foi de 1,50 casos de candidemia/1.000 admissões hospitalares e 0,21 casos/ 1.000 pacientes-dia. Ocorrência maior foi observada por Colombo et al. (2006) em estudo realizado em hospital brasileiro, com 2,49 casos de candidemia/1.000 admissões hospitalares e 0,37 casos/1.000 pacientes-dia e semelhante aos dados de Pereira et al. (2010). Em estudo posterior, Colombo et al. (2007) obtiveram ocorrência menor de candidemia, perfazendo 1,66 casos/1.000 admissões hospitalares, ocorrência menor que aquela verificada por Hinrichsen et al. (2008), em que taxa foi de 3,9/1.000 admissões hospitalares. Esses dados destacam a importância de *Candida* spp. como patógeno em infecções de corrente sanguínea e expõem as variações na ocorrência destas infecções de acordo com a população e a região estudada.

No que se refere à etiologia da candidemia, foi observado no HUCAM que *C. albicans* respondeu por 45% dos casos de candidemia no período analisado, sendo que em alguns anos as espécies do grupo não-*albicans* perfizeram percentual maior em relação a *C. albicans*. Do grupo não-*albicans*, a espécie *C. tropicalis* foi a mais frequentemente isolada, seguida de *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. As espécies *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae* perfizeram menor número de casos de infecções de corrente sanguínea.

Estudos realizados em hospitais brasileiros indicam perfil de ocorrência comparável aos encontrados neste estudo. Fatores em comum nestes estudos incluem a crescente ocorrência de *Candida* não-*albicans*, com destaque para a espécie *C. tropicalis* (FRANÇA; RIBEIRO; QUEIROZ-TELLES, 2008; COLOMBO et al., 2007;

COLOMBO et al., 2006; COLOMBO et al., 1999; NUCCI; COLOMBO, 2007; NUCCI et al., 1998; PEREIRA et al., 2010). Goldani e Mario (2003), ao avaliar 101 casos de candidemia no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, obtiveram *C. albicans* como a espécie mais freqüente; seguido de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Bruder-Nascimento et al. (2010) demonstraram resultados semelhantes. É nítido que *C. tropicalis* representa a segunda ou terceira espécie de *Candida* mais frequente em infecções de corrente sanguínea no Brasil, sendo suplantada pela espécie *C. parapsilosis* em situações específicas, conforme verificado por Xavier et al. (2008) ao avaliarem candidemia neonatal em hospital público do Mato Grosso do Sul, em que a espécie *C. parapsilosis* foi a *Candida* não-*albicans* mais freqüente, seguida de *C. tropicalis*. Demais países da América Latina e da Ásia demonstram perfil semelhante na etiologia de candidemias (YAP et al., 2009; TORRES et al., 2009; FRANCO e col., 2008; PFALLER et col., 2010a; RODRIGUEZ et al., 2010a).

Em estudo multicêntrico realizado por Pfaller et al. (2010a) é nítida a prevalência da espécie *C. albicans* em infecções de corrente sanguínea, sendo que *C. tropicalis* destaca-se dentre as espécies não-*albicans* como a primeira ou segunda espécie mais isolada, com exceção da América do Norte, onde geralmente é a terceira espécie causadora destas infecções.

Recentemente, a incidência aumentada de doenças fúngicas invasivas e o crescente problema de resistências às drogas antifúngicas têm ressaltado a necessidade de aprimorar testes de suscetibilidade aos antifúngicos que possam predizer, confiavelmente, a resposta da terapia *in vivo*. Fluconazol representa o tratamento de escolha para infecções por *C. albicans* porque esta droga oferece, tanto em formulação oral ou parenteral, excelente biodisponibilidade e baixo nível de toxicidade. Pelo fato dos azólicos serem fungistáticos e não fungicidas, a determinação dos valores de CIM *in vitro* usando método padrão pode ser complicada pelo excessivo crescimento residual ou crescimento tipo *trailing*. Este fenômeno, conforme definido pelo documento M27-A3, representa inibição parcial do crescimento fúngico dentro de uma ampla faixa de concentração do agente antifúngico. O crescimento pode ser tão pronunciado que pode tornar um isolado categorizado como sensível com 24 horas de incubação, como resistente se a leitura for realizada com 48 horas (CLSI, 2008).

Com isso, a versão A3 do documento M27 do CLSI sugere que as leituras dos testes de suscetibilidade com o antifúngico fluconazol possam ser realizadas com 24 horas de incubação e teriam maior relevância clínica, conforme demonstrado por Rex et al. (1998). Estes autores, ao examinarem modelo de candidíase murina invasiva, observaram que os resultados dos testes de suscetibilidade com fluconazol *in vitro* obtidos em 24 horas de incubação se correlacionam melhor com a resposta *in vivo* que as leituras realizadas em 48 horas de incubação, o que também foi verificado por Ostrosky-Zeichner et al. (2008). Desta forma, é aceitável a leitura do teste com o antifúngico fluconazol em 24 horas de incubação, caso o crescimento fúngico tenha sido adequado. Análise de concordâncias entre as leituras de 24 e 48 horas fizeram com que Pfaller et al. (2008b) também sugerissem leitura com 24 horas de incubação para fluconazol. Para itraconazol, a utilidade da determinação do valor de CIM com este período de incubação ainda precisa ser avaliada (CLSI, 2008).

É relevante ressaltar que mesmo com as leituras realizadas com 24 horas de incubação, para alguns isolados é possível verificar a ocorrência de *trailing*, ou seja, crescimento ao longo de concentrações crescentes de agente antifúngico, o que dificulta e confunde a determinação dos valores de CIM. Com isso, somente a alteração do tempo de leitura não poderia promover leituras confiáveis, o que torna necessário maiores modificações nos testes de suscetibilidade.

Mesmo com as dificuldades inerentes à determinação do perfil de suscetibilidade dos isolados, os resultados dos testes são essenciais para orientar a terapêutica. Rex e Pfaller (2002) discutem que a suscetibilidade *in vitro* pode prever a resposta à infecção segundo a seguinte regra 90-60±: infecções por isolados sensíveis respondem à terapêutica em cerca de 90% dos casos, enquanto isolados resistentes respondem em 60% dos casos à terapia. Desta forma, resultados dos testes de suscetibilidade a antifúngicos devem ser apropriadamente utilizados na rotina para orientar o tratamento às infecções fúngicas.

No intuito de aprimorar o método padrão proposto pelo CLSI, os testes foram realizados neste trabalho conforme documento M27-A3 e alguns isolados, com perfis de resistência e com crescimento tipo *trailing*, foram selecionados para os métodos modificados aqui propostos.

Os testes realizados, conforme metodologia padrão preconizada pelo CLSI (2008), utilizando isolados de *C. tropicalis*, produziram resultados com diferentes faixas de valores das CIMs para fluconazol e para itraconazol, de acordo com o período de incubação, em concordância com alguns achados de Arthington-Skaggs, Warnock e Morrison, (2000). Os testes realizados com anfotericina B propiciaram nítidos valores de CIM, independente do período de incubação, não sendo verificada a ocorrência de crescimento *trailing*. No entanto, Johnson et al. (2008) ao realizar teste de suscetibilidade e utilizar diferentes espécies de *Candida*, obtiveram nas leituras realizadas com 48 horas de incubação com anfotericina B isolados com fenótipo de resistência. De forma semelhante, Yang et al. (2008) demonstraram resistência a anfotericina B em 4,9% dos isolados de *C. tropicalis* e Messer et al. (2009) em 2% dos isolados testados.

A resistência a fluconazol com 24 horas de incubação foi verificada em 04 (5%) isolados de *C. tropicalis* (sendo 02 do mesmo paciente), ao passo que com 48 horas este número foi de 22 (26%) isolados resistentes. Para itraconazol, apenas 01 (1,2%) isolado mostrou-se resistente com 24 horas de incubação; entretanto, com 48 horas, 14 (17%) isolados foram resistentes. Os resultados apresentados comparam-se aos resultados observados por Arthington-Skaggs, Warnock e Morrison (2000). Devido à ocorrência de crescimento tipo *trailing*, o período de incubação no qual a leitura é realizada é fator determinante para este brusco aumento no número de isolados sensíveis com 24 horas e resistentes com 48 horas de incubação.

Percentuais de resistência elevados, nos testes de suscetibilidade realizados com 48 horas de incubação, também foram verificados por Bruder-Nascimento et al. (2010) com isolados de *C. tropicalis* em hospital público terciário brasileiro, com 18% de resistência a fluconazol e 21% a itraconazol.

Os perfis de resistência de *C. tropicalis* aos azólicos variam de acordo com a população em estudo e com o método utilizado. Menezes, Mendes e Cunha (2009), em estudo realizado em hospital brasileiro, verificaram que cerca de 6% dos isolados de *C. tropicalis* testados apresentaram resistência a fluconazol e a itraconazol, utilizando testes de disco difusão e leituras realizadas com 24 horas de incubação. Por outro lado, utilizando o método proposto pelo CLSI, Colombo et al.

(2006, 2007) não observaram resistência de *C. tropicalis* aos dois azólicos supracitados.

No trabalho de Yang et al. (2008), a resistência a fluconazol foi mais freqüente em isolados de *C. tropicalis* (46,5%) que em *C. albicans* (36,8%) e até mesmo que em *C. glabrata* (30,8%), sendo que esta última espécie frequentemente apresenta elevados níveis de resistência a fluconazol (PFALLER et al., 2010b).

Estudos demonstram boa atividade dos novos azólicos frente a *C. tropicalis*, inclusive contra isolados resistentes a fluconazol (LABBÉ et al., 2009; PFALLER et al., 2001; GUINEA et al., 2008; MALLIÉ et al., 2005; CUENCA-ESTRELLA et al., 2006). Entretanto, Swinne, Watelle e Nolard (2005) observaram a ocorrência de resistência de *C. tropicalis* a voriconazol (valor de CIM $>2\mu\text{g/mL}$). Pfaller et al. (2010a) acharam 5,4% dos isolados de *C. tropicalis* foram resistentes a fluconazol e, dentre os isolados resistentes a fluconazol, cerca de 67% também mostraram-se resistentes a voriconazol. Com exceção dos isolados oriundos da região entre a África e Oriente Médio, *C. tropicalis* apresentou resistência levemente maior a voriconazol que a fluconazol. Em estudo multicêntrico posterior, Pfaller et al. (2010b) observaram que 3,2% dos isolados de *C. tropicalis* foram resistentes fluconazol e 2,9% a voriconazol. Adicionalmente, também foi verificada resistência cruzada entre fluconazol e voriconazol e entre outros azólicos, para isolados de *C. tropicalis* da América Latina.

A emergência de perfis de resistência a diversos antifúngicos tem sido observada para isolados de *C. tropicalis*, especialmente para fluconazol e itraconazol (PFALLER et al., 2010a; FRANCO e col., 2008; LEROY et al., 2010; ENWURU et al., 2008; YANG et al., 2008; TAN; TAN, TEE e col., 2008; SWINNE et al., 2005; LABBÉ et al., 2005; CALVO et al., 2003; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010). A distribuição das espécies e a suscetibilidade a antifúngicos observadas neste estudo confirmaram características comuns a outros hospitais de países da América Latina (PFALLER et al., 2010a).

Com os resultados dos testes de suscetibilidade, conforme CLSI, foi observado que 23 (28,05%) dos isolados testados apresentaram o fenômeno *trailing* para uma ou para as duas drogas azólicas testadas, sendo de 24% para fluconazol e de 22% para

itraconazol, incluindo os isolados que apresentaram fenótipo *trailing* que alterou a categoria de sensível a resistente, com o tempo de incubação, e isolados que apresentaram crescimento ao longo de concentrações crescentes das drogas, apenas dificultando a determinação dos valores de CIM.

Embora alguns estudos demonstrem que o fenótipo *trailing* ocorra apenas em reduzido número de isolados de *Candida* spp. (LEE et al., 2006; CHOU et al., 2007), os valores encontrados neste estudo, embora elevados, estão ainda abaixo dos observados por Arthington-Skaggs et al. (1999), em que 59,3% dos isolados de *C. tropicalis* apresentaram *trailing* com 48 horas de incubação (isolados que se demonstraram sensíveis a 24 horas) para fluconazol e 29,7% para itraconazol.

Yang et al. (2008) ao avaliaram a ocorrência do fenômeno *trailing*, evidenciaram que 72,7% dos isolados de *C. tropicalis* testados, de diferentes espécimes clínicos, apresentavam este tipo de crescimento. Os autores destacam a necessidade de avaliar cautelosamente se os demais isolados que apresentaram valores de CIM $\geq 64\mu\text{g/mL}$ são realmente resistentes.

O período de incubação nos testes de suscetibilidade pode gerar importantes variações da determinação dos valores de CIM. Para comparar os resultados obtidos com 24 *versus* 48 horas de incubação nos testes de suscetibilidade *in vitro*, foram determinadas as concordâncias entre os tempos de incubação. A percentagem de concordância categórica para fluconazol foi de 75% e para itraconazol de 74%. Para fluconazol, a concordância essencial foi de 72% e para itraconazol, de 78%. Espinel-Ingroff et al. (2009) ao fazerem a mesma análise de correlação, mas com os testes realizados com voriconazol, obtiveram para *C. tropicalis* concordância essencial de 77% e concordância categórica de 86%, estando entre os valores de concordância mais baixos obtidos dentre os isolados de *Candida* spp. e demais fungos testados. Utilizando disco-difusão e isolados de *Candida* spp., Pfaller et al. (2008b) encontraram 93,8% de concordância categórica entre as leituras com 24 e com 48 horas de incubação e 99,6% de concordância essencial com o antifúngico fluconazol.

É válido destacar que para alguns isolados de *C. tropicalis*, analisados neste estudo, apenas a redução do período de incubação não seria suficiente para propiciar leitura

clara dos valores de CIM, uma vez que crescimento tipo *trailing* pode ocorrer com 24 horas de incubação, sem alterar o perfil de suscetibilidade do isolado, mas dificultar a leitura dos valores de CIM.

Na tentativa de entender como ocorre o fenômeno *trailing*, Henry, Nickels e Edlind (2000) demonstraram que em resposta à exposição aos azólicos, ocorre super regulação de genes *ERG* (*ERG9*, *ERG1*, *ERG7*, *ERG25*, *ERG3* e *ERG11*) e *CDR1* em *C. albicans*, o que resulta em crescimento fúngico na presença de drogas azólicas. A super regulação do gene *ERG11* já foi observada em *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. Song et al. (2004) observaram que crescimento na presença de drogas azólicas afeta a regulação transcricional do promotor de *ERG11*. Outras drogas também inibidoras da biossíntese de esterol na célula fúngica têm efeitos similares.

Uma característica adicional, que pode se avaliada para identificar e distinguir isolados que apresentam crescimento tipo *trailing* dos demais, é o menor tempo de geração comparado com isolados que não apresentam este fenótipo (AGRAWAL et al., 2007; COENYE et al., 2008).

Em suma, apesar de não totalmente compreendido, o fenômeno *trailing* tem impacto sobre a leitura dos testes de suscetibilidade, tornando-os por vezes duvidosos e com grandes variações, de acordo com o período de incubação. Determinar a melhor forma de testar e reportar o perfil de suscetibilidade de isolados com *trailing* pode aprimorar a correlação entre o teste *in vitro* e a resposta clínica do paciente.

Alguns fatores são conhecidos e estão relacionados a alterações no crescimento de isolados de *Candida spp.* nos testes de suscetibilidade. Embora a exata causa do fenômeno *trailing* não seja conhecida, tem sido sugerido que fatores como o pH do meio, a concentração de glicose, o tamanho do inóculo e características dependentes do isolado, como regulação da expressão de genes de resistência possam estar envolvidos (MARR, RUSTAD e REX, 1999; NGUYEN et al., 1996). É válido pontuar que o *trailing* não é observado quando o método de referência é baseado no *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), com a leitura realizada com 24 horas de incubação, como recomendado. Além da concentração de glicose, Coenye et al., (2008) demonstraram que o uso de placas

com poços de fundo plano podem suprimir o fenótipo *trailing*; estas placas são utilizadas quando se realiza o método segundo o EUCAST.

Uma das modificações realizadas no presente estudo foi a alteração da temperatura de incubação. Agrawal et al. (2007) demonstraram que temperaturas de 25°C e 42°C eliminaram a ocorrência de crescimento tipo *trailing* nos isolados *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. glabrata*, que sabidamente exibiam este perfil. Nossos resultados demonstraram que a elevação da temperatura de incubação para 42°C teve a habilidade de reduzir em 87,5% o *trailing* com fluconazol em 100% com itraconazol. É importante destacar que o crescimento tipo *trailing* observado ao longo de concentrações crescentes do antifúngico foi completamente eliminado com a alteração da temperatura, o que facilitou a leitura e possibilitou a distinção entre isolados realmente resistentes e isolados sensíveis, mas erroneamente classificados como resistentes com 48 horas devido a este fenômeno supracitado.

Outra alteração nos testes foi a adição do composto tricostatina A, um inibidor da desacetilação de histonas (HDA). Estes compostos são importantes ferramentas para o estudo experimental da acetilação e desacetilação de histonas e incluem além da tricostatina A (TSA), butirato de sódio, apicidina e trapoxina. Eles afetam a atividade da HDAs, mediada por elementos estruturais relacionados que mimetizam a cadeia de lisina. Os grupos ϵ . amino dos resíduos de lisina, juntamente com as porções amino-terminais do core das histonas são alvos primários para a acetilação. Essas modificações reduzem a interação eletrostática entre as histonas e o DNA e, então, ativam a transcrição por aumento da exposição de uma região promotora da RNA polimerase e fatores associados (SMITH; EDLIND, 2002).

No presente trabalho, a adição de TSA reduziu em 93,75% o *trailing* dos isolados frente a fluconazol e em 100% frente a itraconazol. Esta modificação propiciou resultados semelhantes aos obtidos com o método modificado com incubação a 42°C e com os resultados de Smith e Edlind (2002). Segundo estes pesquisadores, isolados que apresentam fenômeno *trailing* podem aumentar o valor de CIM com 48 horas de incubação, em relação a 24 horas, em cem vezes. Além disso, é válido destacar que isolados resistentes, tanto neste trabalho quanto no realizado por Smith e Edlind (2002), não sofrem efeitos significativos da adição de TSA.

Simonetti et al. (2007) avaliaram os efeitos de inibidores de desacetilação de histonas na expressão de fenótipos de *C. albicans* relacionados a virulência e patogenicidade e observaram que TSA foi capaz de reduzir a adesão fúngica às células de cultura e a formação do tubo germinativo. Os dados experimentais sugerem que estes compostos podem representar futuramente uma possibilidade terapêutica, conforme também proposto por Pfaller et al. (2009), ao verificarem efeito sinérgico de um inibidor de desacetilação de histonas com azólicos em testes de suscetibilidade *in vitro*.

A última modificação no teste de suscetibilidade proposta refere-se à adição do composto colorimétrico resazurina, com 24 horas de incubação. A resazurina é um indicador de oxidação-redução que, na presença de organismos crescendo ativamente, muda a coloração de azul profundo a róseo. Na leitura, com a adição de resazurina, considerou-se como valor de CIM a concentração de droga presente no primeiro poço da placa onde houve alteração na coloração de róseo a ligeiramente roxo ou azul, em comparação com a cor do controle positivo. A coloração roxa é desenvolvida quando ocorre crescimento fúngico parcial na presença do indicador, geralmente por crescimento tipo *trailing*.

Nos testes com adição de resazurina, a redução do *trailing* foi baixa para os dois antifúngicos testados: 19% para fluconazol e 30% para itraconazol. A incubação por 48 horas da placa sob teste não permitiu o desenvolvimento de coloração ou a permanência desta. Entretanto, a adição deste composto eliminou o fenótipo *trailing* com 24 horas de incubação dos isolados que mostraram dificuldades nas leituras dos valores de CIM.

Kauffman e Zarins (1999) realizaram teste de suscetibilidade de macrodiluição com adição de composto colorimétrico para avaliar a suscetibilidade de isolados de *Candida spp.* a voriconazol, fluconazol e itraconazol. Pelo método proposto, o indicador foi incluído no teste no mesmo momento que o inóculo, e a coloração não foi observada com 24 horas, ocorrendo apenas com 48 horas de incubação. Os autores sugeriram que não seria possível realizar o teste com composto colorimétrico se a incubação fosse por 24 horas. Entretanto, no presente estudo a adição do composto colorimétrico foi com 24 horas de incubação e a coloração desenvolveu-se em torno de 10 minutos, na temperatura ambiente. Demonstramos,

desta forma, uma maneira fácil e objetiva de realizar teste de suscetibilidade com composto colorimétrico.

Braga-Siva et al. (2009) sugeriram que um período de incubação de 24 horas sob as condições do método padrão de suscetibilidade pode não propiciar crescimento satisfatório para isolados com fenótipo *trailing*. Destacamos dois isolados sem crescimento satisfatório com 24 horas de incubação, perfazendo 2,44% dos isolados testados. Nestes casos, torna-se imprescindível a leitura com 48 horas de incubação.

Para avaliar o desempenho dos testes modificados, foram avaliadas as concordâncias categóricas e essenciais entre as técnicas. As concordâncias neste estudo foram calculadas comparando-se os resultados obtidos pelo método padrão com os obtidos pelo método modificado, de acordo com o período de incubação (24 *versus* 24 horas e 48 *versus* 48 horas). Como a proposta foi reduzir ou eliminar a ocorrência do fenótipo *trailing*, é esperado que metodologias com esta habilidade propiciem baixas correlações com o método referência.

A concordância categoria entre o método padrão e os métodos modificados, analisando *C. tropicalis* e fluconazol, foi de 82% a 87% para leituras realizadas com 24 horas e de cerca de 18%, para leituras com 48 horas de incubação; com exceção do método com adição de resazurina, onde este valor ficou em torno de 87% em 48 horas de incubação.

No período de 24 horas de incubação, os resultados com erros muito maiores (isolados resistentes pelo método padrão e sensíveis pelo método modificado) foi em torno de 8% enquanto que com 48 horas, os erros muito maiores foram elevados, com porcentagens de 70% e 75% com adição de TSA e com incubação a 42°C, respectivamente, uma vez que estas modificações introduzidas, reduziram efetivamente o *trailing*, responsável pelas leituras errôneas no teste padrão. Por outro lado, a adição de resazurina ao teste de suscetibilidade não alterou significativamente a ocorrência do *trailing* com 48 horas de incubação, permitindo que erros muito maiores ocorressem, com conseqüente concordância categórica elevada com o teste padrão

Foram também encontrados nos três métodos propostos, erros menores, relacionados a alteração na classificação do isolado como sensível dose-dependente pelo método padrão para sensível pelo método modificado, com 24 horas de incubação. Também neste caso, erros menores ocorreram, com alteração na classificação de resistente para sensível dose-dependente, com 48 horas de incubação.

Resultados semelhantes para as concordâncias categóricas foram encontrados com a utilização de itraconazol, destacando-se a ocorrência dos erros muito maiores, especialmente nas leituras realizadas com 48 horas de incubação com os métodos modificados TSA e a 42°C, onde todos os isolados testados frente a itraconazol foram sensíveis, independente do período de incubação. O método colorimétrico proposto apresentou resultados semelhantes aos obtidos com a realização do método segundo o CLSI.

Verifica-se com a análise das concordâncias categóricas, para ambos antifúngicos, que os métodos com TSA e a 42°C foram mais eficazes para reduzir o número de isolados com fenótipo de crescimento tipo *trailing*, além de tornar as leituras dos valores de CIM mais nítidas, independente do período de incubação. Esta habilidade propiciou a ocorrência mais elevada de erros muito maiores e baixas concordâncias categóricas.

No que se refere às concordâncias essenciais, foram avaliadas as variações nas diluições dos antifúngicos testados e a concordância, considerando variação de duas diluições entre os métodos e de acordo com os períodos de incubação de 24 ou de 48 horas. As concordâncias essenciais com período de incubação de 24 horas e com fluconazol foram maiores em relação a 48 horas. A exceção foi a técnica com adição de resazurina, que propiciou resultados com 48 horas semelhantes a 24 horas, em relação ao método segundo documento M27-A3. Perfil semelhante foi encontrado na análise dos testes realizados com itraconazol. A capacidade dos métodos com incubação a 42°C e com TSA de reduzir o fenótipo *trailing* com 48 horas de incubação em todas análises realizadas gerou concordâncias baixas, e esperadas, em relação ao método padrão. Foram verificadas, freqüentemente, variações nas diluições entre os valores de CIM quando os métodos foram comparados.

Atualmente, é comercializado um sistema colorimétrico para determinar a suscetibilidade de *Candida spp.* a antifúngicos, denominado Sensititre Yeast One (Trek Diagnostic Systems, Reino Unido). Trata-se de um procedimento em microplaca que incorpora um indicador de oxidação-redução para teste de suscetibilidade *in vitro* a agentes antifúngicos. Davey et al. (1998) compararam os resultados obtidos pelo método segundo o CLSI com os resultados do método colorimétrico comercial. Concordância geral dos resultados dos dois métodos foi superior a 90% para a maioria das espécies testadas; a exceção foi *C. tropicalis* que propiciou os piores valores de correlação frente a três azólicos. Considerando concordância essencial de ± 2 diluições, a concordância entre os dois métodos para o antifúngico fluconazol foi de 75% e para itraconazol de 70%. As leituras foram realizadas com 48 horas de incubação. No presente estudo e no mesmo período de incubação supracitado, o método colorimétrico mostrou concordância de 87,5% para fluconazol e de 55,5% para itraconazol. Como concordâncias mais baixas, no nosso caso, relacionam-se à habilidade do método colorimétrico em reduzir o *trailing*, esta modificação proposta foi mais eficaz na redução deste tipo de crescimento com itraconazol que com fluconazol.

Em estudo multicêntrico, também com a finalidade de comparar o Sensititre Yeast One com a método padrão, Espinel-Ingroff et al. (2004) obtiveram melhor correlação entre os métodos. Com o antifúngico fluconazol, a correlação entre as leituras de 24 horas foi de 96% e com 48 horas foi de 94%, para isolados de *C. tropicalis*.

Quando a concordância entre o método Sensititre e o método padrão é avaliada, mas com outros antifúngicos, correlação maior freqüentemente é encontrada. Pfaller et al. (2008a) obtiveram 100% de concordância essencial para todos os isolados testados frente às equinocandinas, incluindo *C. tropicalis*.

Outros métodos colorimétricos foram propostos para determinar o perfil de suscetibilidade de isolados de *Candida spp.* Shin et al. (2004) não verificaram *trailing* em método colorimétrico proposto, embora as leituras tenham sido realizadas com 48 horas de incubação; a concordância essencial com o método referência para itraconazol de 83%. Chen, Wan e Li (2004) observaram concordância essencial do teste com *C. tropicalis* frente a fluconazol de 88,2% e com itraconazol de 94,1%.

Diferente do presente estudo, onde a concordância essencial com fluconazol foi maior que com itraconazol.

É interessante notar que foram boas as concordâncias com 24 horas de incubação entre os métodos. A maior dificuldade nas análises se relaciona ao período de incubação. O documento M27-A3 torna aceitável a leitura com 24 horas para fluconazol, mas verificamos que para alguns isolados, o *trailing* pode ocorrer mesmo com este período de incubação e os três métodos propostos mostraram-se eficazes na redução deste fenômeno. Resultados similares foram encontrados com itraconazol e, embora a leitura com 24 horas de incubação ainda não tenha sido estabelecida pelo CLSI, é nítida a necessidade de aprimorar o teste de suscetibilidade também para este antifúngico.

Outro ponto avaliado neste estudo foi a viabilidade das leituras realizadas espectrofotometricamente. Isolados com variáveis perfis de suscetibilidade tiveram os valores de CIM determinados de forma visual e por meio de leitor de Elisa em diferentes períodos de incubação, com os antifúngicos fluconazol e itraconazol, comparando ainda a metodologia padrão com a metodologia modificada instituindo-se temperatura de incubação de 42°C. As concordâncias foram calculadas através da correlação entre os percentuais de categorização dos isolados, de acordo com o tempo de leitura.

Com o método de referência, as duas formas de leituras avaliadas tiveram melhor concordância para fluconazol com 20 horas de incubação (96% de concordância) inferindo-se que o fenômeno *trailing* possa começar a ocorrer em períodos de incubação acima de 20 horas, o que por gerar dificuldade na leitura propiciou concordâncias mais baixas, de 84%, entre as formas de leitura nos períodos de incubação de 24 e 48 horas. Por outro lado, para itraconazol, as leituras com 18 horas de incubação apresentaram concordância entre si de 88%; as leituras em tempos de incubação mais prolongados apresentaram concordância na categorização dos isolados em 92% das análises. Os resultados obtidos com itraconazol não seguiram o mesmo raciocínio proposto para fluconazol.

Espinel-Ingroff et al. (2005) compararam as leituras dos testes de suscetibilidade conforme proposto pelo documento M27 (leituras visual com 48 horas de incubação)

realizados com azólicos frente a diferentes espécies de *Candida*, com leituras visual com 24 horas de incubação e espectrofotométrica com 48 horas. Para *C. tropicalis*, as leituras pelo método padrão em relação às leituras pelo método visual com 24 horas de incubação para fluconazol e itraconazol apresentaram 100% de concordância; para posaconazol de 97% e para voriconazol de 93%. A concordância categórica entre as leituras com 48 horas, visual e espectrofotométrica, foi de 97% para os quatro azólicos testados, superior aos valores encontrados no presente estudo.

Quando o método foi modificado, e os testes foram realizados por meio de incubação a temperatura de 42°C, destacou-se para itraconazol a concordância na categorização dos isolados com 48 horas de incubação, que foi de 100%. Como já discutido, esta modificação no método mostrou-se altamente eficaz em eliminar o *trailing*, e os resultados se refletem na melhor concordância entre as formas de leitura realizadas. Para fluconazol, a concordância entre as leituras foi de 92% em 48 horas e, de 100% no período de incubação de 24 horas. É possível concluir que a mudança no método para determinar o perfil de suscetibilidade foi ponto importante na maior correlação verificada entre as formas de leitura, com o período de incubação de 24 e de 48 horas, uma vez que as leituras foram visualmente mais nítidas e objetivas. Devido às oscilações nos percentuais de correlação, não é possível inferir que períodos de incubação inferiores a 24 horas seriam viáveis para facilitar a determinação dos valores de CIM.

Na tentativa de correlacionar os dados obtidos nos testes de suscetibilidade com a resposta terapêutica com fluconazol, foram verificados os prontuários de três pacientes, cujos isolados de *C. tropicalis* foram submetidos às metodologias padrão e modificadas propostas.

O prontuário do paciente do qual foram obtidos isolados sequenciais (números 2483A e 2483B) que apresentaram resistência *in vitro* a fluconazol pela metodologia padrão e métodos modificados, independentemente do período de incubação, apresentaram resistência *in vivo* à terapia com fluconazol. Todas as variações metodológicas testadas para determinar perfil de suscetibilidade para estes isolados os categorizaram como resistentes. Estes dados estão de acordo com os observados por Smith e Edlind (2002) e por Agrawal et al. (2007), em que a adição

de TSA e a alteração da temperatura de incubação para 42°C, respectivamente, não alteraram o perfil de suscetibilidade *in vitro* de isolados sabidamente resistentes.

Conforme esperado, o isolado número 449 classificado como sensível a fluconazol em todos os testes realizados, apresentou sucesso à terapia com este antifúngico.

No que se refere ao isolado número 432, com crescimento tipo *trailing*, houve resposta ao tratamento com fluconazol. De fato, Rex et al (1998) e Odabasi et al. (2009) demonstraram que isolados com fenótipo *trailing* foram sensíveis a fluconazol e itraconazol em modelos experimentais em animais. É válido pontuar que o método a 42°C e com adição de TSA (ambos com 24 e com 48 horas de incubação), além do método com resazurina com 24 horas de incubação classificaram o isolado 432 como sensível.

Este estudo permite inferir que as modificações metodológicas propostas são relevantes para facilitar a leituras dos valores de CIM e, em especial, a alteração da temperatura de incubação para 42°C, pela facilidade e viabilidade de execução, para ambos antifúngicos. Para itraconazol, destacamos a importância das leituras realizadas com 24 horas de incubação, com menor interferência do fenômeno *trailing*.

6 CONCLUSÕES

As infecções da corrente sanguínea por *Candida* spp. (candidemia) ocorreram durante todos os anos inseridos no período observado, mantendo uma frequência estável.

Em geral, espécies não-*albicans* de *Candida* foram mais frequentes que a espécie *Candida albicans* na etiologia das infecções de corrente sanguínea. *Candida albicans* só foi mais prevalente que as espécies não-*albicans* no HUCAM no ano de 2007. *C. tropicalis* foi a espécie não-*albicans* mais isolada no HUCAM.

Segundo a metodologia padrão (M27-A3), 5% dos isolados de *C. tropicalis* foram resistentes a fluconazol e 1,2% resistentes a itraconazol, com 24 horas de incubação. Com 48 horas de incubação estas porcentagens se elevaram para 26% e 17%, respectivamente.

As metodologias propostas, que incluíram a incubação a 42°C, adição de TSA e do composto colorimétrico resazurina foram eficazes na redução do *trailing* com 24 horas de incubação, mas com 48 horas de incubação apenas os dois primeiros métodos supracitados reduziram o fenótipo *trailing*.

As formas de leitura (visual e espectrofométrica) apresentaram melhores concordâncias com a metodologia a 42°C, em relação à metodologia referência demonstrando a capacidade do método modificado em reduzir o *trailing* e facilitar a determinação dos valores de CIM.

Foi possível estabelecer correlação entre resposta terapêutica e CIMs para fluconazol quando se empregou métodos modificados.

7 REFERÊNCIAS

AGRAWAL, D. et al. *Trailing end-point phenotype of Candida spp. in antifungal susceptibility testing to fluconazole is eliminated by altering incubation temperature*. JMM correspondence, p.55-56, 2007.

ANAISSE, E; BODEY, G. P. *Nosocomial fungal infections: old problems and new challenges*. Infect Dis Clin North Am, v.3, p.867-82, 1998.

ANAISSE, E. J.; MCGINNIS, M. R.; PFALLER, M. A. *Clinical Micology*. United States of America. Elsevier Science, 1º ed., p.608, 2003.

ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; WARNOCK, D. W.; MORRISON, C. J. *Quantitation of Candida albicans Ergosterol Content Improves the Correlation between In Vitro Antifungal Susceptibility Test Results and In Vivo Outcome after Fluconazole Treatment in a Murine Model of Invasive Candidiasis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.44, p.2081-2085, 2000.

ARTHINGTON-SKAGGS, B. et al. *Quantitation of Ergosterol Content: Novel Method for Determination of Fluconazole Susceptibility of Candida albicans*. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol 37 (10), p. 3332-3337, 1999.

BASSETTI, M. et al. *Incidence of candidaemia and relationship with fluconazole use in an intensive care unit*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v.64, p.625-629, 2009.

BECK-SAGUÉ, C.; JARVIS, W. R. *Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990*. National Nosocomial Infections Surveillance System. J Infect Dis, v.167(5), p.1247-51, 1993.

BEDINI, A. et al. *Epidemiology of candidaemia and antifungal susceptibility patterns in an Italian tertiary-care hospital*. Clin Microbiol Infect, v.12, p.75-80, 2006.

BERMAN, J.; SUDBERY, P. E. *Candida albicans: a molecular revolution built on lessons from budding yeast*. Nat Rev Genet, v.3, p.918-932, 2002.

BODEY, G. P. *The emergence of fungi as major hospital pathogens*. J Hosp Infect, v.11 suppl. A, p.411-426, 1988.

BORGES, R. M. et al. *Fatores de risco associados à colonização por Candida spp em neonatos internados em uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal brasileira*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.42(4), p.431-435, 2009.

BOUZA, E.; MUNÓZ, P. *Epidemiology of candidemia in intensive care units*. International Journal of Antimicrobial Agents, v.32 suppl. 2, p.S87-S91, 2008.

BRAGA-SILVA, L. A. et al. *Trailing end-point phenotype antibiotic-sensitive strains of Candida albicans produce different amounts of aspartyl peptidases*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.42, p.765-770, 2009.

BRUDER-NASCIMENTO, A. et al. *Species distribution and susceptibility profile of Candida species in a Brazilian public tertiary hospital*. BMC Research Notes, v.3(1), 2010.

CALVO, M. C. R. et al. *Actividad in vitro de fluconazol, voriconazol e posaconazol frente a Candida spp*. Ver. Esp. Quimioterap, v.16(2), p.227-232, 2003.

CANNON, R. D.; KERRIDGE, D. *Correlation between the sterol composition of membranes and morphology in Candida albicans*. J Med Vet Mycol., v.26(1), p.57-65, 1988.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J. et al. *Antifungal agents: mode of action in yeast cells*. Rev Esp Quimioterap, v.19(2), p.130-139, 2006.

CHAKRABARTI, A.; CHATTERJEE, S. S.; SHIVAPRAKASHI, M. R. *Overview of opportunistic fungal infection in India*. J Med Mycol, v.49, p.165-172, 2008.

CHEN, J.; WAN, Z.; LI, R. *Modified colorimetric assay for susceptibility testing of azole antifungal drugs against Candida species*. Journal of Clinical Microbiology, v.42, p.1790-1793, 2004.

CHOU, H. et al. *Multilocus sequence typing of Candida tropicalis shows clonal cluster enriched in isolates with resistance or trailing growth of fluconazole*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v.58, p.427-433, 2007.

CHOW, J. K. et al. *Risk factors for albicans and non-albicans candidemia in the intensive care unit*. Crit Care Med, v.36(5), 2008.

COENYE, T. et al. *Factors influencing the trailing endpoint observed in Candida albicans susceptibility testing using the CLSI procedure*. Clin Microbiol Infect, v.14, p.495-497, 2008.

COLOMBO, A. L. et al. *High Rate of Non-albicans Candidemia in Brazilian Tertiary Care Hospitals*. Diagn Microbiol Infect Dis, v.34, p.281-286, 1999.

COLOMBO, A. L. et al. *Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers*. Journal of Clinical Microbiology, v.44(8), p.2816-2823, 2006.

CUENCA-ESTRELLA, M. et al. *Influence of glucose supplementation and inoculum size on growth kinetics and antifungal susceptibility testing of Candida spp.* Journal Clinical Microbiology, v.39, p.525-532, 2001.

CUENCA-ESTRELLA, M. et al. *Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 Spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.50(3), p.917-921, 2006.

DAUM, G. et al. *Cell biology and molecular biology of lipids of Saccharomyces cerevisiae.* YEAST, v.14(16), p.1471-1510, 1998.

DAVEY, K. G. et al. *Comparison of a new commercial colorimetric microdilution method with a standart method for in vitro susceptibility testing of Candida spp. and Cryptococcus neoformans.* Journal of Antimicrobial Chemoterapy, v.42, p.439-444, 1998.

DESNOS-OLLIVIER, M. et al. *Clonal Population of flucytosine-resistant Candida tropicalis from blood cultures, Paris, France.* Emerging Infectious Diseases, v.14(4), p.557-565, 2008.

DIMOPOULOS, G. et al. *Candida albicans versus non-albicans intensive care unit-acquired bloodstream infections: differences in risk factors and outcome.* Critical Care and Trauma, v.106(2), p.523-529, 2008.

EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. *Epidemiology of Candida species infections in critically ill non-immunosuppressed patients.* The Lancet Infectious Disease, v.3, p.685-702, 2003.

ENWURU, C. A. et al. *Fluconazole resistant opportunistic oro-pharyngeal candida and non-candida yeast-like isolates from HIV infected patients attending ARV clinics in Lagos, Nigeria.* African Health Sciences, v.8(3), p.142-148, 2008.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. *Multicenter comparison of the sensititre yeastone colorimetric antifungal panel with the NCCLS M27-A2 reference method for testing new antifungal agents against clinical isolates of Candida spp.* Journal Of Clinical Microbiology, v.42(2), p.718-721, 2004.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. *Comparison of Visual 24-Hour and Spectrophotometric 48-Hour MICs to CLSI Reference Microdilution MICs of Fluconazole, Itraconazole, Posaconazole, and Voriconazole for Candida spp.: a Collaborative Study.* Journal of Clinical Microbiology, v.43, p.4535-4540, 2005.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. *Comparison of 24-Hour and 48-Hour Voriconazole MICs as Determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute Broth Microdilution Method (M27-A3 Document) in Three Laboratories: Results Obtained with 2,162 Clinical Isolates of Candida spp. and Other Yeasts.* Journal of Clinical Microbiology, v.47, p.2766-2771, 2009.

EVANS, T. G. et al. *Fluconazole failure in treatment of systemic mycoses.* J Infect Dis, v.164, p.1232-1235, 1991.

FRANÇA, J. C. B.; RIBEIRO, C. E. L.; QUEIROZ-TELLES, F. *Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos.* Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.41(1), p.23-28, 2008.

FRANCO, M. E. D. et al. *Distribución y sensibilidad a los antifúngicos de aislamientos clínicos de Candida en seis centros de salud del área metropolitana de Caracas, Venezuela (años 2003-2005).* Rev Iberoam Micol, v.25, p.17-21, 2008.

FRASER, V. J. et al. *Candidemia in a Tertiary Care Hospital: Epidemiology, Risk Factors, and Predictors of Mortality.* Clinical Infectious Diseases, v.15, p.414-421, 1992.

GARCIA-EFFRON, G. et al. *Caspofungin-resistant Candida tropicalis strains*

causing breakthrough fungemia in patients at high risk for hematologic malignancies. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, v.52(11), p.4181-4183, 2008.

GOLDANI, L. Z.; MARIO, P. P. S. *Candida tropicalis Fungemia in a Tertiary Care Hospital. Journal of Infection*, v.46, p.155-160, 2003.

GONZALEZ, G. M.; ELIZONDO, M.; AYALA, J. *Trends in species distribution and susceptibility of bloodstream isolates of Candida collected in Monterrey, Mexico, to seven antifungal agents: results of a 3-year (2004 to 2007) surveillance study. Journal of Clinical Microbiology*, v.46(9), p.2902-2905, 2008.

GUINEA, J. et al. *In vitro antifungal activities of Isavuconazole (BAL4815), Voriconazole, and Fluconazole against 1,007 Isolates of Zygomycete, Candida, Aspergillus, Fusarium, and Scedosporium species. Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, v.52(4), p.1396-1400, 2008.

HENRY, K. W.; NICKELS, J. T.; EDLIND, T. D. *Upregulation of ERG genes in Candida species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.44(10), p.2693-2700, 2000.

HINRICHSEN, S. L. et al. *Candidemia em hospital terciário do nordeste do Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.41(4), p.394-398, 2008.

HORN, D. L. et al. *Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. Clinical Infectious Diseases*, v.48, p.1695-1703, 2009.

JARVIS, W. R. *Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on Candida species. Clin Infect Dis*, v.20, p.1526-1530, 1995.

JOHNSON, E. et al. *Activity of voriconazole, itraconazole, fluconazole and amphotericin B in vitro against 1763 yeasts from 472 patients in the voriconazole*

phase III clinical studies. International Journal of Antimicrobial Agents, v.32, p.511-514, 2008.

KAUFFMAN, C. A.; ZARINS, L. T. *Colorimetric method for susceptibility testing of voriconazole and other triazoles against Candida species*. Mycoses, v.42, p.539-542, 1999.

KOTHAVADE et al. *Candida tropicalis: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole*. Journal of Medical Microbiology, v.59, p.873-880, 2010.

LABBÉ, A. et al. *A single-centre 10-year experience with Candida bloodstream infections*. Can J Infect Dis Med Microbiol, v.20(2), p.45-50, 2009.

LEE, J. et al. *Species Distribution and Susceptibility to Azole Antifungals of Candida Bloodstream Isolates from Eight University Hospitals in Korea*. Yonsei Med J, v.48(5), p.779-786, 2007.

LEE, M. et al. *Susceptibility and trailing growth of Candida albicans to fluconazole: results of a Korean multicentre study*. Mycoses, vol. 50, p. 148-149, 2006.

LEROY, O. et al. *Comparison of albicans vs. non-albicans candidemia in French intensive care units*. Critical Care, v.14(R98), 2010.

MAERTENS, J. A. *History of the development of azole derivatives*. Clin Microbiol Infect, v.10 (Suppl. 1), p.1-10, 2004.

MALLIÉ, M. et al. *In vitro susceptibility testing of Candida and Aspergillus spp. To voriconazole and other antifungal agents using Etest®: results of a French multicentre study*. International Journal of Antimicrobial Agents, v.25, p.321-328, 2005.

MARR, K. A.; RUSTAD, T. R.; REX, J. H. *The trailing end point phenotype in*

antifungal susceptibility testing is pH dependent. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.43(6), p.1383-1386, 1999.

MARTIN, A. et al. *Resazurin Microtiter Assay Plate Testing of Mycobacterium tuberculosis Susceptibilities to Second-Line Drugs: Rapid, Simple, and Inexpensive Method. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.47, p.3616-3619, 2003.

MENEZES, E. A.; MENDES, L. G.; CUNHA, F. A. *Resistência a antifúngicos de Candida tropicalis isoladas no Estado do Ceará. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.42(3), p.354-355, 2009.

MESSER, S. A. et al. *Activity of Contemporary Antifungal Agents, Including the Novel Echinocandin Anidulafungin, Tested against Candida spp., Cryptococcus spp., and Aspergillus spp.: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006 to 2007). Journal of Clinical Microbiology*, v.47, p.1942-1946, 2009.

MIRANDA, L. A. et al. *Candida colonisation as a source for candidaemia. Journal of Hospital Infection*, v.72, p.9-16, 2009.

MUÑOZ, A. J. C. et al. *Resistencia in vitro al fluconazol e itraconazol en aislamientos clínicos de Candida spp y Cryptococcus neoformans. Rev Iberoam Micol*, v.14, p.50-54, 1997. 50

NGUYEN, M. H. et al. *The changing face of candidemia: emergence of non-candida albicans species and antifungal resistance. Excerpta Medica*, v.100, p.617-623, 1996.

NUCCI, M. et al. *Fungemia in cancer patients in Brazil: Predominance of non-albicans species. Mycopathologia*, v.141(65), p.65-68, 1998.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L. *Candidemia due to Candida tropicalis: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in*

tertiary care hospitals. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v.58, p.77-82, 2007.

ODABASI, Z. et al. *Lack of correlation of 24- vs. 48-h itraconazole minimum inhibitory concentrations with microbiological and survival outcomes in a guinea pig model of disseminated candidiasis*. Blackwell Verlag GmbH Mycoses, v.53, p.438-442, 2009.

ORTEGA, M. et al. *Candida spp. bloodstream infection: influence of antifungal treatment on outcome*. J Antimicrob Chemother, 2009.

OSTROSKY-ZEICHNER, L. et al. *Rationale for Reading Fluconazole MICs at 24 Hours Rather than 48 Hours When Testing Candida spp. by the CLSI M27-A2 Standard Method*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.52, p.4175-4177, 2008.

PASQUALE, T. et al. *Emergence of Candida tropicalis resistant to caspofungin*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v.61, p.219-229, 2008.

PASQUALOTTO, A. C.; DENNING, D. W. *New and emerging treatments for fungal infections*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v.61 (Suppl. 1), p.i19-i30, 2008.

PEREIRA, G. H. et al. *Five-year evaluation of bloodstream yeast infections in a tertiary hospital: the predominance of non-C. albicans Candida species*. Medical Mycology, 2010.

PERSONS, D. A. et al. *Fluconazole and Candida albicans fungemia*. N Engl J Med, v.325, p.1315, 1991.

PFALLER, M. A. et al. *National surveillance of nosocomial blood stream infection due to Candida albicans: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program*. Diagn Microbiol Infect Dis., v.31(1), p.327-32, 1998.

PFALLER, M. A. 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*. Journal of Clinical Microbiology, v.39, p.3254-3259, 2001.

PFALLER, M. A. et al. *Clinical Evaluation of the Sensititre YeastOne Colorimetric Antifungal Panel for Antifungal Susceptibility Testing of the Echinocandins Anidulafungin, Caspofungin, and Micafungin*. Journal of Clinical Microbiology, v.46, p.2155-2159, 2008a.

PFALLER, M. A. et al. *Validation of 24-Hour Fluconazole MIC Readings versus the CLSI 48-Hour Broth Microdilution Reference Method: Results from a Global Candida Antifungal Surveillance Program*. J. Clin. Microbiol, v.46, p.3585-3590 2008b.

PFALLER, M. A. et al. *In vitro susceptibility of invasive isolates of candida spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance*. Journal of Clinical Microbiology, v.46(1), p.150-156, 2008c.

PFALLER, M. A. et al. *Activity of MGCD290, a Hos2 Histone Deacetylase Inhibitor, in Combination with Azole Antifungals against Opportunistic Fungal Pathogens*. J. Clin. Microbiol, v.47, p. 3797-3804, 2009.

PFALLER, M. A. et al. *Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-Year Analysis of Susceptibilities of Candida Species to Fluconazole and Voriconazole as Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion*. Journal of Clinical Microbiology, v. 48(4), p.1366-1377, 2010a.

PFALLER, M. A. et al. *Geographic Variations in Species Distribution and Echinocandin and Azole Antifungal Resistance Rates Among Candida*

Bloodstream Infection Isolates: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). J. Clin. Microbiol, 2010b.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; SHEEHAN, D. J. *Interpretive breakpoints for fluconazole and Candida revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing*. Clinical Microbiology Reviews, v.19(2), p.435-447, 2002.

PRICE, M. F.; LAROCCO, M. T.; GENTRY, L. O. *Fluconazole susceptibility of Candida species and contribution of species recovered from blood over a 5-years period*. Antimicrob Agents Chemother, v.38, p.1422-1427, 1994.

QUINDÓS, G. et al. *Multicenter survey of in vitro antifungal resistance in yeasts of medical importance isolated from Spanish patients*. Rev Iberoam Micol, v.16, p.97-100, 1999.

REISS, E.; MORRISON, C. J. *Nonculture methods for diagnosis of disseminated candidiasis*. Clin Microbiol Rev, v.6, p.311-323, 1993.

REX, J. H. et al. *Optimizing the correlation between results of testing in vitro and therapeutic outcome in vivo for fluconazole by testing critical isolates in a murine model of invasive candidiasis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.42, p.129-134, 1998.

REX, J. H.; PFALLER, M. A. *Has Antifungal Susceptibility Testing Come of Age?* Clinical Infectious Diseases, v.35, p.982-989, 2002.

RODRIGUEZ, A. Z. et al. *Sensibilidad a fluconazol y voriconazol de especies de Candida aisladas de pacientes provenientes de unidades de cuidados intensivos em Medellin, Colombia (2001-2007)*. Rev IberoamMicol, v.27(3), p.125-129, 2010a.

RODRIGUEZ, D. et al. *Predictors of candidaemia caused by non-albicans Candida species: results of a population-based surveillance in Barcelona, Spain*.

Clinical Microbiology and Infection, 2010b.

SEIFERT, H. et al. *In vitro activities of isavuconazole and other antifungal agents against Candida bloodstream isolates*. Antimicrobial Agents And Chemotherapy, v.51(5), p.1818-1821, 2007.

SHIN, J. H. et al. *Evaluation of a Colorimetric Antifungal Susceptibility Test by Using 2,3-Diphenyl-5-Thienyl-(2)-Tetrazolium Chloride*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.48, p.4457-4459, 2004.

SILVA, J. O.; CANDIDO, R. C. *Avaliação do sistema API20C AUX na identificação de leveduras de interesse clínico*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.38(3), p.261-263, 2005.

SIMONETTI, G. et al. *Histone deacetylase inhibitors may reduce pathogenicity and virulence in Candida albicans*. FEMS Yeast Res, v.7, p.1371-1380, 2007.

SIDRIM, J.J.C.; MOREIRA, J.L.B. *Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

SIPSAS, N. V. et al. *Candidemia in patients with hematologic malignancies in the era of new antifungal agents (2001-2007)*. Cancer, v.115, p.4745-4752, 2009.

SMITH, W. L.; EDLIND, T. D. *Histone deacetylase inhibitors enhance Candida albicans sensitivity to azoles and related antifungals: correlation with reduction in CDR and ERG upregulation*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.46, p.3532-3539, 2002.

SOBEL, J. D. et al. *A randomized, double-blind study of treatment with fluconazole and placebo*. Clin Infect Dis, v.30, p.19-24, 2000.

SONG, J. L. et al. *The Candida albicans lanosterol 14- -demethylase (erg11) gene promoter is maximally induced after prolonged growth with antifungal drugs*.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.48(4), p.1136-1144, 2004.

SWINNE, D.; WATELLE M.; NOLARD, N. *In vitro activities of voriconazole, fluconazole, itraconazole and amphotericin B against non Candida albicans yeast isolates*. Rev Iberoam Micol, v.22, p.24-28, 2005.

TAN, T. Y.; TAN, A. L.; TEE, N. W. S. *A Retrospective Analysis of Antifungal Susceptibilities of Candida Bloodstream Isolates From Singapore Hospitals*. Ann Acad Med Singapore, v.37(10), p.835-840, 2008.

TIRABOSHI, I. N. et al. *Deep Candida infections in the neutropenic and non-neutropenic host: an ISHAM symposium*. Med Mycol, v.38(1), p.199-204, 2000.

TORRES, N. A. et al. *Evaluación mediante tres técnicas de susceptibilidad a fluconazol en especies de Candida aisladas en pacientes com infecciones invasoras. Bogotá - Colombia*. Rev Chil Infect, v.26(2), p.135-143, 2009.

VALENZA, G. et al. *Evaluation of New Colorimetric Vitek 2 Yeast Identification Card by Use of Different Source Media*. Journal of Clinical Microbiology, v.46, n.11, p.3784-3787, 2008.

VELASCO, E.; BIGNI, R. *A prospective cohort study evaluating the prognostic impact of clinical characteristics and comorbid conditions of hospitalized adult and pediatric cancer patients with candidemia*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, v.27, p.1071-1078, 2008.

VINSONNEAU, C. et al. *Effects of candidaemia on outcome of burns*. v.35, p.561-564, 2009.

WHITE, T. C.; MARR, K. A. *Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance*. Clinical Microbiology Reviews, v.11(2), p.382-402, 1998.

XAVIER, P. C. N. et al. *Candidemia neonatal, em hospital público do Mato Grosso do Sul*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.41(5), p.459-463, 2008.

YAMADA, H. et al. *Fungicidal mechanism of action of D0870 against Cryptococcus neoformans under acidic conditions*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.41(12), p.2710-2713, 1997.

YANG, Y. et al. *Susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of Candida species in Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance of Yeasts 2006*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v.61, p.175-180, 2008.

YAP, H. I. et al. *Epidemiology and outcome of Candida bloodstream infection in an intensive care unit in Hong Kong*. Hong Kong Med J, v.15, p.255-61, 2009.

8 ANEXOS

Anexo 1 . Meios de cultura utilizados

a) Composição do meio RPMI 1640* (com glutamina e vermelho de fenol, sem bicarbonato de sódio) e forma de preparo

Constituinte	g/l de água	Constituinte	g/l de água
L-arginina (base livre)	0,2000	Biotina	0,0002
L-aspargina (anidra)	0,0500	D-pantotênico	0,0003
L-aspártico, ácido	0,0200	Colina, cloreto de	0,0030
L-cistina, 2HCL	0,0652	Fólico, ácido	0,0010
L-glutâmico, ácido	0,0200	Mioinositol	0,0350
L-glutamina	0,3000	Niacinamida	0,0010
Glicina	0,0100	PABA	0,0010
L-histidina (base livre)	0,0150	Piridoxina HCl	0,0010
L-hidroxiprolina	0,0200	Riboflavina	0,0002
L-isoleucina	0,0500	Tiamina HCl	0,0010
L-leucina	0,0500	Vitamina B 12	0,000005
L-lisina HCl	0,0400	Nitrato de cálcio x H ₂ O	0,1000
L-metionina	0,0150	Cloreto de potássio	0,4000
L-fenilalanina	0,0150	Sulfato de magnésio (anidro)	0,048840
L-prolina	0,0200	Cloreto de sódio	6,0000
L-serina	0,0300	Fosfato de sódio dibásico anidro	0,8000
L-treonina	0,0200	D-glicose	2,0000
L-triptofano	0,0050	Glutathione, reduzida	0,0010
L-tirosina 2Na	0,0288	Vermelho de fenol, Na	0,0053
L-valina	0,0200		

Este meio é adquirido na forma desidratada. Após a solubilização em água destilada e ajuste do pH para 7,0 com MOPS (3- [N-morpholino] propanesulfonic acid), o meio é esterilizado por filtração e armazenado em geladeira.

b) Composição do meio ágar Sabouraud e forma de preparo

Constituinte	g/l de água
Peptona bacteriológica	5
Hidrolisado enzimático de caseína	5
Dextrose	40
Ágar	15
Água	Para 1l

Este meio é adquirido na forma desidratada. O meio é pesado de acordo com a determinação do fabricante, para preparo de 1 litro de meio. Para dissolução, o meio é levado ao microondas para fundir o Agar e posteriormente é esterilizado pelo calor, em autoclave. Após resfriamento, cerca de 25mL de meio são adicionados em cada placa. As placas passam por teste de esterilidade e são guardadas identificadas na geladeira. pH $5,6 \pm 0,2$.

c) Composição do meio para congelamento e forma de preparo

Constituinte	g/L de água
Peptona	10
Glicose	20
Glicerina	200
Água	Para 1l

Os constituintes são pesados conforme tabela acima, homogeneizados e esterilizados por.pelo calor, em autoclave. O meio é armazenado em geladeira e para congelamento dos isolados é utilizado 1mL deste meio.

d) Meio para assimilação de fontes de carbono

Fórmula*	
YNB**	6,7g
Ágar	10g
Água destilada	1000mL

*Este meio é esterilizado por filtração

**YNB= Yeast Nitrogen Base (Difco Reg 0392-15)

e) Meio para fermentação de fontes de carbono

Fórmula	
Extrato de levedura	0,5g
Peptona	0,5g
Açúcar	2,0g
Água destilada	100mL

Os açúcares (glicose, sacarose, lactose, maltose, galactose e trealose) foram adicionados separadamente, de forma a corresponder a 2% do volume do meio. Os meios com diferentes açúcares foram distribuídos em camada alta em tubos de ensaio, contendo cada um o tubo de Durhan invertido, para coleta de gás.

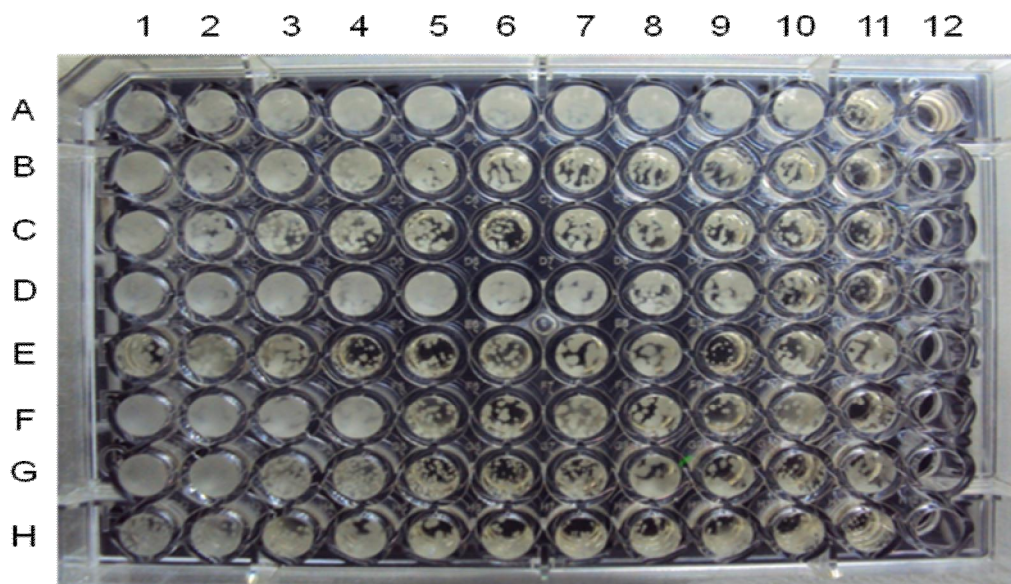
Anexo 2- Montagem da placa para teste de microdiluição em caldo

As drogas foram dispensadas de forma de forma a se obter concentrações crescentes das drogas, nos poços das fileiras de 2 a 11.

A coluna 1 representa o controle positivo do teste: contém o meio de cultura e a levedura, sem adição de droga.

A coluna 12 representa o controle negativo do teste: contém apenas o meio de cultura, sem levedura e sem droga.

Nas fileiras das letras A a F foram adicionadas as leveduras a serem testadas. As fileiras das letras G e H contiveram as leveduras para Controle de Qualidade (*Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258).



Anexo 3 - Controle de qualidade dos testes. Faixas das leituras das CIMs ($\mu\text{g/mL}$) obtidas para cepas-padrão, nos períodos de 24 e 48 horas de incubação.

Cepas Controle de Qualidade	Droga antifúngica	Faixa de valor de CIM (em $\mu\text{g/mL}$) para os antifúngicos testados	
		24 horas	48 horas
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	Fluconazol	2,0 - 4,0	2,0 - 8,0
	Itraconazol	0,125 - 0,25	0,125 - 0,25
	Anfotericina B	0,25 - 0,5	0,5 - 1,0
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	Fluconazol	16 . 64	≥ 64
	Itraconazol	0,125 - 0,25	0,25 - 0,5
	Anfotericina B	0,5 - 1,0	0,5 - 1,0

Anexo 4 - Fotos das placas de teste de suscetibilidade

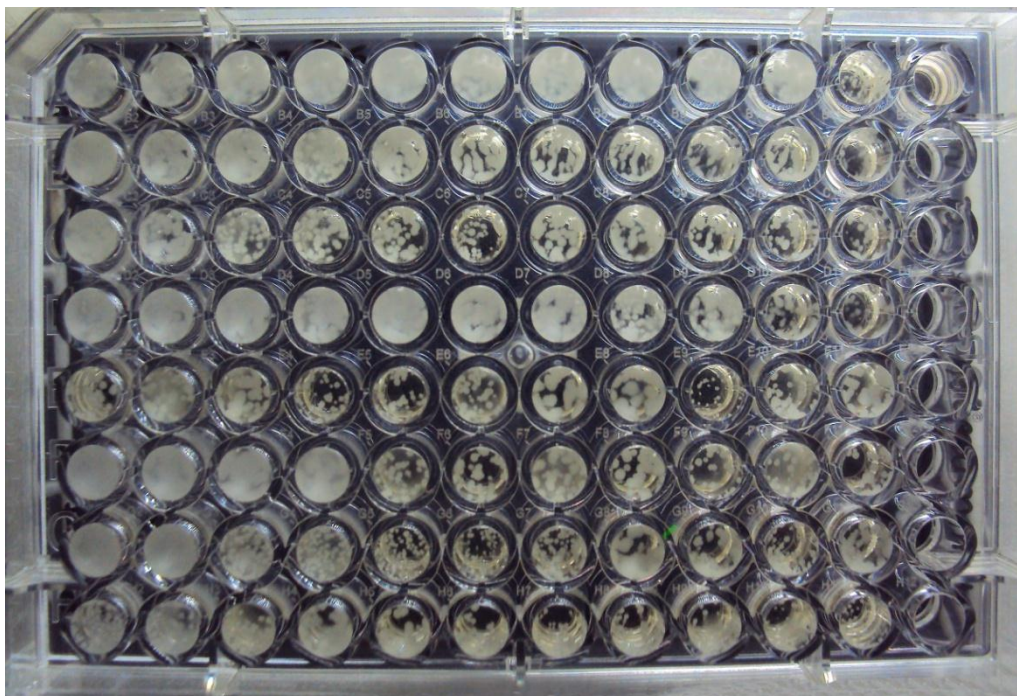


Foto 1- Método M27-A3, com 24 horas de incubação

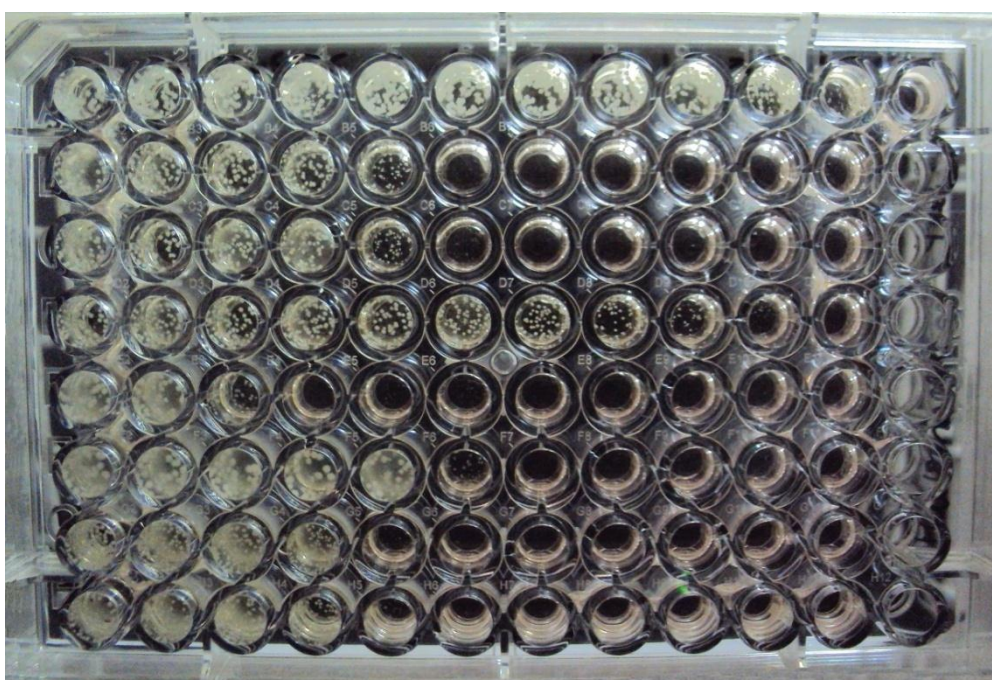


Foto 2- Método a 42°C, com 24 horas de incubação

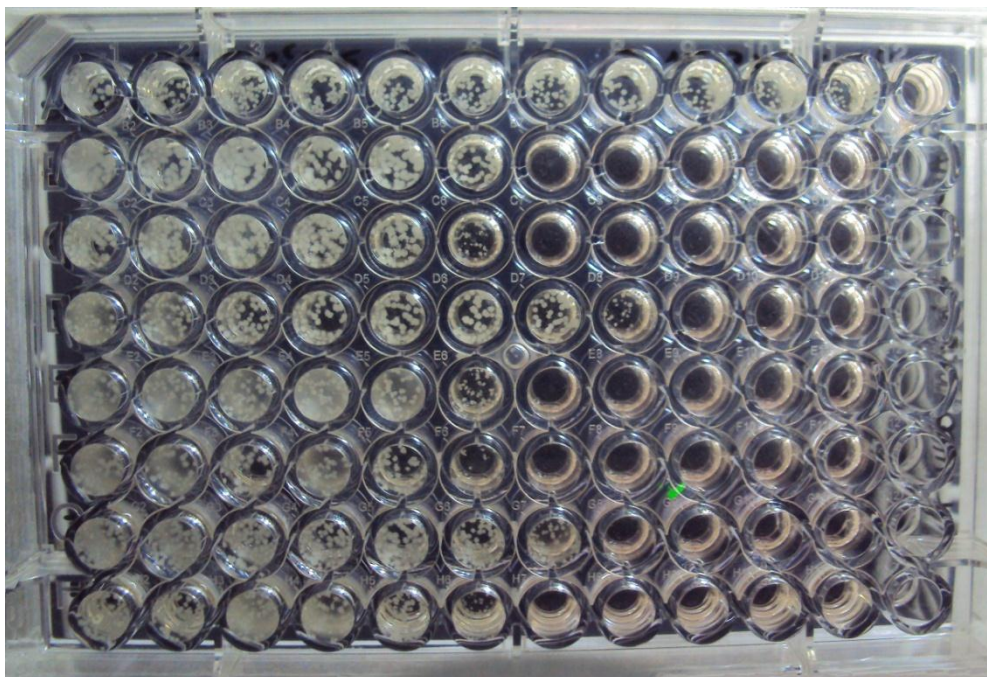


Foto 3- Método com TSA, com 24 horas de incubação

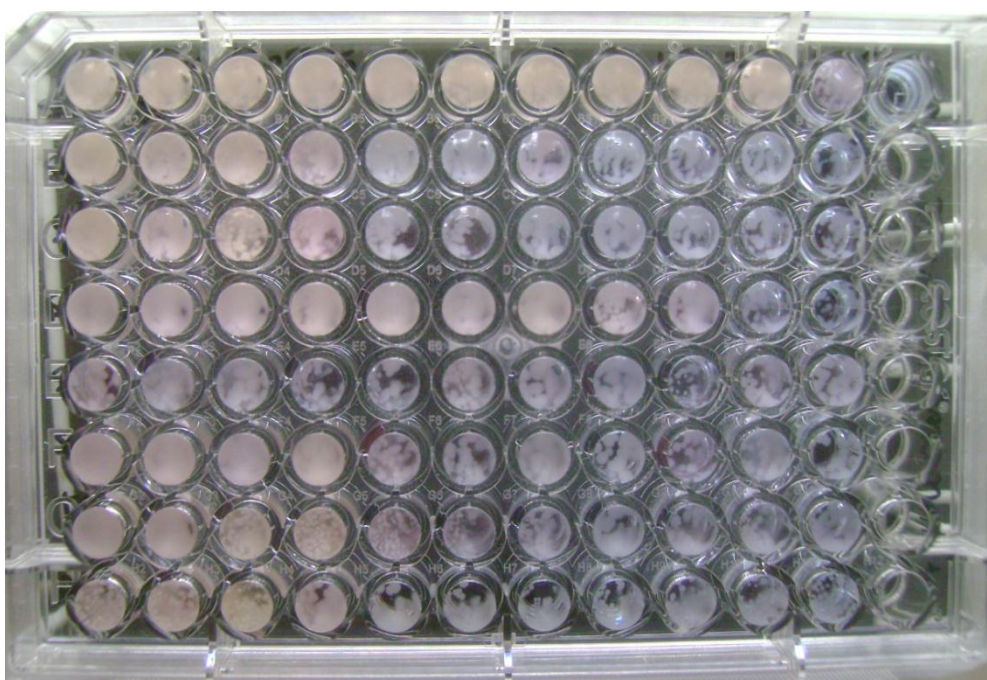


Foto 4- Método com resazurina, com 24 horas de incubação

Anexo 6 - Perfis de suscetibilidade para fluconazol e para itraconazol e espécime clínico dos quais foram obtidos os 82 isolados de *C. tropicalis* utilizados neste estudo

Número de identificação do isolado	Valor de CIM ($\mu\text{g/mL}$) para Fluconazol		Valor de CIM ($\mu\text{g/mL}$) para Itraconazol		Espécime clínico
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	
417	0,5	1	0,06	0,06	Sangue
421	1	1	0,125	0,125	Líquido peritoneal
423	1	2	0,06	0,06	Líquido peritoneal
432	1 . T	≥ 64	0,06	0,5 - T	Líquido peritoneal
448	2	2	0,06	0,06	Urina
449	8	8	0,06	0,06	Líquido peritoneal
481	1	2	0,06	0,06	Sangue
487	4	4	0,06	0,06	Sangue
508	1	1	0,06	0,06	Sangue
510	1	2	0,06	0,06	Sangue
513	1	1	0,06	0,06	Sangue
517	4 . T	≥ 64	0,5	≥ 4	Sangue
520	1	1	0,06	0,06	Líquido peritoneal
521	1	1	0,06	0,25	Sangue
529	1 . T	≥ 64	0,06	0,5 - T	Sangue
534	8	≥ 64	0,25 . T	≥ 4	Sangue
550	2	≥ 64	0,06 . T	≥ 4	Líquido ascítico
554	0,5	0,5	0,125	0,06	Sangue
555	2 . T	≥ 64	0,03	0,25	Lavado brônquico
556	2	2	0,06	0,06	Sangue
558	8	1	0,06	0,125	Sangue
559	0,5	≥ 64	0,06-T	1 - T	Sangue
564	NÃO CRESCER	0,125	NÃO CRESCER	0,06	Líquido pleural
569	0,5	0,5	0,06	0,125	Sangue
631	1	1	0,125	0,125	Sangue
651	2	2	0,06	≥ 4	Líquido peritoneal
672	0,25	1	0,125	0,125	Sangue
694	1 . T	≥ 64	0,25-T	≥ 4	Sangue
695	2	2	0,06	0,5	Sangue
715	0,25	2	0,03	0,06	Líquido peritoneal
720	0,25	0,25	0,03	0,06	Líquido peritoneal
722	0,25 . T	≥ 64	0,06 - T	≥ 4	Sangue
726	2	≥ 64	0,03	≥ 4	Sangue
A126	1	1	0,06	0,06	Sangue
A140	8	≥ 64	0,06	≥ 4	Sangue
A142	2	8	0,06	0,125	Sangue
A163	1	≥ 64	0,125	0,125	Sangue
A172	0,25	2	0,06	0,125	Líquido peritoneal
A173	0,25	2	0,125	0,125	Sangue
A231	0,25	2	0,06	0,06	Líquido pélvico
A24	2	4	0,125	0,06	Sangue
A34	2	1	0,125	0,06	Lavado brônquico
A351	2	2 - T	0,06	0,06	Líquido peritoneal
A356	2	8	0,06	0,06	Líquido peritoneal
A371	4	8	0,06	0,5	Líquido peritoneal
A394	8	32	0,03	0,125	Sangue

Anexo 6 - Perfis de suscetibilidade para fluconazol e para itraconazol e espécime clínico dos quais foram obtidos os 82 isolados de *C. tropicalis* utilizados neste estudo (continuação)

Número de identificação do isolado	Valor de CIM ($\mu\text{g/mL}$) para Fluconazol		Valor de CIM ($\mu\text{g/mL}$) para Itraconazol		Espécime clínico
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	
A403	1	1	0,125	0,125	Sangue
A452	2-T	2 - T	0,125	0,125	Líquido ascítico
A454	4 . T	≥ 64	0,03	≥ 4	Sangue
A604	1	1	0,125	0,125	Líquido peritoneal
A610	0,25	0,125	0,015	0,03	Líquido pélvico
A612	0,25	0,25	0,03	0,03	Líquido retrogátrico
A613	2	0,25	0,03	0,125	Secreção mediastino
A614	2	2	0,03	0,125	Líquido peritoneal
A615	0,25	0,25	0,03	0,125	Líquido ascítico
A626	≥ 64	≥ 64	1 - T	≥ 4	Sangue
A93	2	2	0,06	0,06	Sangue
I475	8	16	0,03	0,06	Sangue
E10	1	1	0,03	0,03 - T	Líquido pericárdico
T11	1	1	0,06	0,06	Sangue
1033	1	1	0,06	0,06	Sangue
1405	0,5	0,5	0,015	0,015	Sangue
2483 ^a	≥ 64	≥ 64	0,06	0,06	Sangue
2483B	≥ 64	≥ 64	0,06	0,125	Sangue
670	≥ 64	≥ 64	0,03	≥ 4	Sangue
872	32	≥ 64	0,125	0,5	Sangue
SR2	1	4	0,06	0,06	Sangue
T244	0,25	2	0,125	0,125	Líquido pleural
T267	0,25	1	0,03	0,06	Sangue
T272	4	8	0,5	0,5	Líquido peritoneal
T284	0,25	1	0,06	0,06	Secreção pulmonar
T303	1	2	0,125	0,5	Lavado brônquico
T304	0,25	1	0,125	0,125	Líquido sinovial
T362	1	1	0,125	0,125	Líquido peritoneal
T382	1 . T	≥ 64	0,03 - T	1 - T	Líquido peritoneal
T46	2	2	0,125	0,125	Líquido pleural
T462	1	1	0,03	0,03	Líquido peritoneal
T572	32	≥ 64	0,125	≥ 4	Secreção traqueal
T573	0,25 . T	≥ 64	0,125	0,125	Secreção pulmonar
T62	1	2	0,5	0,25	Urina
T63	4 . T	≥ 64	0,125	0,125	Urina
T65	1	1	0,06	0,06	Urina

Anexo 7 . Perfil de suscetibilidade a anfotericina B de 46 isolados de *C. tropicalis*

Isolado	Valor de CIM (em µg/mL) para Anfotericina B	
	24 horas	48 horas
564	NÃO CRESCEU	0,25
569	0,125	0,5
631	0,125	0,06
651	0,125	0,5
672	0,25	0,5
694	0,125	0,5
695	0,125	0,25
A142	0,06	0,5
A126	0,125	0,5
A140	0,125	0,5
A163	0,125	0,5
A172	0,125	0,5
A173	0,125	0,25
A231	0,125	0,25
A24	0,06	0,5
A34	0,125	0,5
A351	0,125	0,5
A356	0,25	1
A371	0,06	0,25
A394	0,125	0,25
A403	0,125	0,5
A452	0,125	0,5
A454	0,125	0,5
A604	0,125	0,25
A93	0,125	0,25
I475	0,06	0,06
T11	0,125	0,5
2483A	0,125	0,5
1033	0,125	0,5
1405	0,125	0,25
2483B	0,125	0,5
670	0,125	0,5
872	0,125	0,5
T244	0,125	0,5
T267	0,25	0,5
T272	0,125	0,5
T284	0,125	0,5
T303	0,125	0,5
T304	0,125	0,5
T362	0,125	0,5
T382	0,125	0,5
T46	0,125	0,5
T462	0,125	0,5
T62	0,125	0,5
T63	0,125	0,5
T65	0,125	0,5

Anexo 8 . Perfil de suscetibilidade a fluconazol dos isolados submetidos aos métodos modificados

Isolados selecionados	Valor de CIM (em µg/mL) para fluconazol					
	42°C		Tricostatina A		Resazurina	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
2483B	64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64
517	1	4	4	8	1	≥64
555	1	4	4	8	1	≥64
872	32	64	8	32	32	≥64
559	0,5	4	2	8	0,5	≥64
529	2	4	2	4	2	≥64
T382	2	2	8	8	2	≥64
A454	1	2	4	8	1	≥64
534	2	8	4	4	4	≥64
550	2	4	2	2	2	≥64
670	2	4	1	2	4	≥64
2483A	64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64
432	4	16	4	4	1	≥64
T63	1	16	1	2	4	≥64
A140	2	4	2	2	2	≥64
A163	1	8	2	4	2	4- T
A351	2	2	2	2	2	4- T
A452	1	2	2	2	2	4- T
A626	2	4	2	8	2	2-T
T572	2	2	2	2	1	≥64
T573	2	2	2	4	1	≥64
694	2	2	2	4	2	≥64
722	2	4	não cresceu	2	2	0,5
726	1	4	2	32	1	≥64

Anexo 9 . Perfil de suscetibilidade a itraconazol dos isolados submetidos aos métodos modificados

Isolados selecionados	Valor de CIM (em µg/mL) para itraconazol					
	42°C		Tricostatina A		Resazurina	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
670	0,06	0,06	0,03	0,06	0,06	≥4
517	0,06	0,06	0,03	0,06	0,06	≥4
534	0,06	0,06	0,03	0,06	0,06	≥4
550	0,06	0,06	0,03	0,125	0,06	≥4
432	0,06	0,125	0,03	0,125	0,06	≥4
529	0,06	0,06	0,03	0,06	0,06	≥4
559	0,06	0,06	0,03	0,06	0,06	≥4
651	0,06	0,06	0,03	0,06	0,06	≥4
T382	0,03	0,06	0,06	0,125	0,06	0,06-T
E10	0,03	0,06	0,03	0,06	≥4	≥4
A140	0,06	0,06	0,03	0,06	0,06	≥4
A452	0,03	0,06	0,03	0,06	0,06	0,125-T
A454	0,03	0,06	0,03	0,125	0,06	0,25-T
A626	0,03	0,06	0,03	0,06	0,06	0,25-T
T572	0,06	0,06	0,03	0,06	0,06	≥4
694	0,06	0,06	0,03	0,06	0,06	≥4
722	0,06	0,06	não cresceu	0,06	não cresceu	0,125
726	0,06	0,06	0,06	0,125	0,03	0,03-T

Anexo 10 . Prontuários analisados

PROJETO BRASIL DE VIGILÂNCIA DE CANDIDEMIAS No. do paciente **08-0033-01**

Nome do Hospital: Hospital Universitário . Universidade Federal do Espírito Santo

Código do Hospital **08**

Número do prontuário: **652342**

No. do paciente **08-0033-01**

Isolados de Candida desse paciente:

data **8/12/2006** No. isolado no lab. do hospital **11516** No. isolado no estudo **08-0033-01-1 (2483A)**
 data **10/12/2006** No. isolado no lab. do hospital **11585** No. isolado no estudo **08-0033-01-2 (2483B)**

1) INFORMAÇÃO DEMOGRÁFICA

1.1 Data do Nascimento: **19/04/1975**

1.2 Sexo: Masculino Feminino

1.3 Raça: Branco Negro Mulato/ Pardo Asiático Índio Outro Desconhecido

1.4 De que cidade é o hospital?

São Paulo Rio de Janeiro Brasília Vitória Belo Horizonte
 Campinas Ribeirão Preto Santa Maria Curitiba Recife Fortaleza

1.5 Sistema de cobertura do paciente na instituição: Privado Público Desconhecido

2) INFORMAÇÃO MICROBIOLÓGICA

PARA A DATA DA CANDIDEMIA INCIDENTE (@24 HORAS ANTES DA COLHEITA DA HEMOCULTURA)

2.1 Data da colheita da hemocultura da candidemia incidente: **08/12/2006**

Mesmo dia da hemocultura da candidemia incidente (X)	Até 14 dias ANTES da candidemia incidente (X)	
	X	Staphylococcus aureus

2.2 Espécie de Candida (marque todas que se apliquem):

C. albicans C. parapsilosis C. krusei C. tropicalis C. lusitaniae
 C. rugosa C. glabrata Outra, especifique: _____

2.3 Local de colheita da hemocultura incidente: Punção venosa Através de cateter Não sei

ATÉ 14 DIAS ANTES DA CANDIDEMIA INCIDENTE:

2.4 O paciente teve alguma bacteremia entre 0 e 14 dias ANTES da candidemia incidente?

Sim Não Não sei

2.4.1 Se sim, especifique que bactéria e quando marque X):

PROJETO BRASIL DE VIGILÂNCIA DE CANDIDEMIAS No. do paciente **08-0033-01**

Nos 14 dias antes da candidemia incidente,

2.5 Havia outras culturas positivas para *Candida* (de qualquer lugar)? Sim Não Não sei

ATÉ 30 DIAS DEPOIS DA CANDIDEMIA INCIDENTE:

Durante os 30 dias DEPOIS da candidemia incidente,

2.6 Houve alguma outra hemocultura positiva para *Candida*? Sim Não Não sei

2.6.1 Se Sim, indique data(s) da cultura e espécie:

data: **10/12/2006**

Espécie: **C. tropicalis**

3) HISTÓRIA DE MEDICAÇÃO

ATÉ 14 DIAS ANTES DA CANDIDEMIA INCIDENTE:

Nos 14 dias antes da candidemia incidente, o paciente estava ou tinha recebido algum dos seguintes?

3.1 Antibiótico (oral ou IV) por >24 horas? Sim Não Não sei

3.1.1 Se sim, especifique: 1 a 2 antibióticos
 3 a 4 antibióticos
 5 a 6 antibióticos
 7 ou mais antibióticos

3.2 Corticosteróides sistêmicos (oral ou IV)? Sim Não Não sei

3.3 Outras drogas imunossupressoras? Sim Não Não sei

3.4 Quimioterapia contra o câncer? Sim Não Não sei

3.5 Terapia anti-retroviral? Sim Não Não sei

3.6 Bloqueadores H2? Sim Não Não sei

3.7 O paciente recebeu ou estava recebendo drogas antifúngicas?

Sim Não Não sei

ATÉ 30 DIAS APÓS A CANDIDEMIA INCIDENTE:

3.8 O paciente recebeu algum tratamento antifúngico para ESTE episódio de candidemia?

Sim Não Não sei

Se sim, indique o código de antifúngico(s), data em que o tratamento foi iniciado, e data da última dose para tratamento desta candidemia.

Código	Data do início (DD/MM/YYYY)	Data da última dose (DD/MM/YYYY)
05	10/12/2006	12/12/2006
05	14/12/2006	16/12/2006
01	18/12/2006	02/01/2007
	__/__/____	__/__/____

Código Antifúngico

- 01 Anfotericina B
- 02 Ambisome
- 03 Abelcet
- 04 Amphocyl
- 05 Fluconazol
- 06 Itraconazol
- 07 Voriconazol
- 08 Posaconazol
- 09 Caspofungina
- 10 Fluorocitosina
- 11 Micafungina
- 12 Outro

4) INFORMAÇÃO SOBRE A EVOLUÇÃO**ATÉ 30 DIAS DEPOIS DA CANDIDEMIA INCIDENTE:**

4.1 Nos 30 dias depois da primeira hemocultura positiva (candidemia incidente), houve sinais de envolvimento de órgãos pela infecção pela Candida? (NOTA: Evidência inclui resultados de métodos de imagem, como TC, ecocardiograma, histopatologia, exame físico, como em endoftalmite, ou cultura de um local *estéril*).

Sim Não Não sei

4.2 O paciente recebeu alta após esta hospitalização?

Sim Não Não foi internado Não sei

4.2.2 Se sim, qual foi a data da alta? : **17/01/2007**

Não recebeu alta até 30 dias após a candidemia incidente
 Não sei

4.3 O paciente foi transferido para outra instituição?

Sim Não Não foi hospitalizado Não sei

4.4 O paciente sobreviveu >30 dias da data da candidemia incidente? Sim Não Não sei

PROJETO BRASIL DE VIGILÂNCIA DE CANDIDEMIAS No. do paciente **08-0009-01-01**

Nome do Hospital: Hospital Universitário . Universidade Federal do Espírito Santo

Código do Hospital **08**

Número do prontuário: **2924455**

No. do paciente **08-0009-01-01**

Isolados de Candida desse paciente:

data **30/04/07** No. isolado no lab. do hospital: **5823** No. isolado no estudo **08-0009-01-01 (449)**

1) INFORMAÇÃO DEMOGRÁFICA

1.1 Data do Nascimento: **09/11/1952**

1.2 Sexo: Masculino Feminino

1.3 Raça: Branco Negro Mulato/ Pardo Asiático Índio Outro Desconhecido

1.4 De que cidade é o hospital?

São Paulo Rio de Janeiro Brasília Vitória Belo Horizonte
 Campinas Ribeirão Preto Santa Maria Curitiba Recife Fortaleza

1.5 Sistema de cobertura do paciente na instituição: Privado Público Desconhecido

2) INFORMAÇÃO MICROBIOLÓGICA

PARA A DATA DA CANDIDEMIA INCIDENTE (@24 HORAS ANTES DA COLHEITA DA HEMOCULTURA)

2.1 Data da colheita da hemocultura da candidemia incidente: **30/04/2007**

2.2 Espécie de Candida (marque todas que se apliquem):

C. albicans C. parapsilosis C. krusei C. tropicalis C. lusitaniae
 C. rugosa C. glabrata Outra, especifique: _____

2.3 Local de colheita da hemocultura incidente: Punção venosa Através de cateter Não sei

ATÉ 14 DIAS ANTES DA CANDIDEMIA INCIDENTE:

2.4 O paciente teve alguma bacteremia entre 0 e 14 dias ANTES da candidemia incidente?

Sim Não Não sei

2.4.1 Se sim, especifique que bactéria e quando marque X):

Mesmo dia da hemocultura da candidemia incidente (X)	Até 14 dias ANTES da candidemia incidente (X)	
	X	Staphylococcus aureus
		Staphylococcus, coagulase negativa
		Outros aeróbicos gram positivos
		E. coli
		Pseudomonas aeruginosa
		Outros aeróbicos gram negativos
		Anaeróbios
		Outros

PROJETO BRASIL DE VIGILÂNCIA DE CANDIDEMIAS No. do paciente **08-0009-01-01**

Nos 14 dias antes da candidemia incidente,

2.5 Havia outras culturas positivas para *Candida* (de qualquer lugar)? Sim Não Não sei

ATÉ 30 DIAS DEPOIS DA CANDIDEMIA INCIDENTE:

Durante os 30 dias DEPOIS da candidemia incidente,

2.6 Houve alguma outra hemocultura positiva para *Candida*? Sim Não Não sei

3) HISTÓRIA DE MEDICAÇÃO

ATÉ 14 DIAS ANTES DA CANDIDEMIA INCIDENTE:

Nos 14 dias antes da candidemia incidente, o paciente estava ou tinha recebido algum dos seguintes?

3.1 Antibiótico (oral ou IV) por >24 horas? Sim Não Não sei

3.1.1 Se sim, especifique: 1 a 2 antibióticos
 3 a 4 antibióticos
 5 a 6 antibióticos
 7 ou mais antibióticos

3.2 Corticosteróides sistêmicos (oral ou IV)? Sim Não Não sei

3.3 Outras drogas imunossupressoras? Sim Não Não sei

3.4 Quimioterapia contra o câncer? Sim Não Não sei

3.5 Terapia anti-retroviral? Sim Não Não sei

3.6 Bloqueadores H2? Sim Não Não sei

3.7 O paciente recebeu ou estava recebendo drogas antifúngicas?

Sim Não Não sei

ATÉ 30 DIAS APÓS A CANDIDEMIA INCIDENTE:

3.8 O paciente recebeu algum tratamento antifúngico para ESTE episódio de candidemia?

Sim Não Não sei

Se sim, indique o código de antifúngico(s), data em que o tratamento foi iniciado, e data da última dose para tratamento desta candidemia.

Código	Data do início (DD/MM/YYYY)	Data da última dose (DD/MM/YYYY)
05	02/05/2007	14/05/2007

Código	Antifúngico
01	Anfotericina B
02	Ambisome
03	Abelcet
04	Amphocyl
05	Fluconazol
06	Itraconazol
07	Voriconazol
08	Posaconazol
09	Caspofungina
10	Fluorocitosina
11	Micafungina
12	Outro
13	Paciente em estudo cego (droga desconhecida)

4) INFORMAÇÃO SOBRE A EVOLUÇÃO**ATÉ 30 DIAS DEPOIS DA CANDIDEMIA INCIDENTE:**

4.1 Nos 30 dias depois da primeira hemocultura positiva (candidemia incidente), houve sinais de envolvimento de órgãos pela infecção pela Candida? (NOTA: Evidência inclui resultados de métodos de imagem, como TC, ecocardiograma, histopatologia, exame físico, como em endoftalmite, ou cultura de um local *estéril*).

Sim Não Não sei

4.2 O paciente recebeu alta após esta hospitalização?

Sim Não Não foi internado Não sei

4.2.2 Se sim, qual foi a data da alta? **30/05/2007**

Não recebeu alta até 30 dias após a candidemia incidente

Não sei

4.3 O paciente foi transferido para outra instituição?

Sim Não Não foi hospitalizado Não sei

4.4 O paciente sobreviveu >30 dias da data da candidemia incidente? Sim Não Não sei

PROJETO BRASIL DE VIGILÂNCIA DE CANDIDEMIAS No. do paciente **08-0010-01**

Nome do Hospital: Hospital Universitário . Universidade Federal do Espírito Santo

Código do Hospital **08**

Número do prontuário: **521574**

No. do paciente **08-0010-01**

Isolados de Candida desse paciente:

data **09/06/2006** No. isolado no lab. do hospital **7554** No. isolado no estudo **08-0010-01 (432)**

1) INFORMAÇÃO DEMOGRÁFICA

1.1 Data do Nascimento: **01/06/2006**

1.2 Sexo: Masculino Feminino

1.3 Raça: Branco Negro Mulato/ Pardo Asiático Índio Outro Desconhecido

1.4 De que cidade é o hospital?

São Paulo Rio de Janeiro Brasília Vitória Belo Horizonte
 Campinas Ribeirão Preto Santa Maria Curitiba Recife Fortaleza

1.5 Sistema de cobertura do paciente na instituição: Privado Público Desconhecido

2) INFORMAÇÃO MICROBIOLÓGICA

PARA A DATA DA CANDIDEMIA INCIDENTE (@24 HORAS ANTES DA COLHEITA DA HEMOCULTURA)

2.1 Data da colheita da hemocultura da candidemia incidente: **09/06/2006**

2.2 Espécie de Candida (marque todas que se apliquem):

C. albicans C. parapsilosis C. krusei C. tropicalis C. lusitaniae
 C. rugosa C. glabrata Outra, especifique: _____

2.3 Local de colheita da hemocultura incidente: Punção venosa Através de cateter Não sei

ATÉ 14 DIAS ANTES DA CANDIDEMIA INCIDENTE:

2.4 O paciente teve alguma bacteremia entre 0 e 14 dias ANTES da candidemia incidente?

Sim Não Não sei

2.4.1 Se sim, especifique que bactéria e quando marque X):

Mesmo dia da hemocultura da candidemia incidente (X)	Até 14 dias ANTES da candidemia incidente (X)	
		Staphylococcus aureus
		Staphylococcus, coagulase negativa
		Outros aeróbicos gram positivos
		E. coli
	X	Pseudomonas aeruginosa
	X	Outros aeróbicos gram negativos (K. pneumoniae)
		Anaeróbios
		Outros

PROJETO BRASIL DE VIGILÂNCIA DE CANDIDEMIAS No. do paciente **08-0010-01**

Nos 14 dias antes da candidemia incidente,

2.5 Havia outras culturas positivas para *Candida* (de qualquer lugar)? Sim Não Não sei

ATÉ 30 DIAS DEPOIS DA CANDIDEMIA INCIDENTE:

Durante os 30 dias DEPOIS da candidemia incidente,

2.6 Houve alguma outra hemocultura positiva para *Candida*? Sim Não Não sei

3) HISTÓRIA DE MEDICAÇÃO

ATÉ 14 DIAS ANTES DA CANDIDEMIA INCIDENTE:

Nos 14 dias antes da candidemia incidente, o paciente estava ou tinha recebido algum dos seguintes?

3.1 Antibiótico (oral ou IV) por >24 horas? Sim Não Não sei

3.1.1 Se sim, especifique: 1 a 2 antibióticos
 3 a 4 antibióticos
 5 a 6 antibióticos
 7 ou mais antibióticos

3.2 Corticosteróides sistêmicos (oral ou IV)? Sim Não Não sei

3.3 Outras drogas imunossupressoras? Sim Não Não sei

3.4 Quimioterapia contra o câncer? Sim Não Não sei

3.5 Terapia anti-retroviral? Sim Não Não sei

3.6 Bloqueadores H2? Sim Não Não sei

3.7 O paciente recebeu ou estava recebendo drogas antifúngicas?

Sim Não Não sei

ATÉ 30 DIAS APÓS A CANDIDEMIA INCIDENTE:

3.8 O paciente recebeu algum tratamento antifúngico para ESTE episódio de candidemia?

Sim Não Não sei

Se sim, indique o código de antifúngico(s), data em que o tratamento foi iniciado, e data da última dose para tratamento desta candidemia.

Código	Data do início (DD/MM/YYYY)	Data da última dose (DD/MM/YYYY)
05	11/06/2006	26/06/2006

Código _____ Antifúngico

- 01 Anfotericina B
- 02 Ambisome
- 03 Abelcet
- 04 Amphocyl
- 05 Fluconazol
- 06 Itraconazol
- 07 Voriconazol
- 08 Posaconazol
- 09 Caspofungina
- 10 Fluorocitosina
- 11 Micafungina
- 12 Outro
- 13 Paciente em estudo cego (droga desconhecida)

4) INFORMAÇÃO SOBRE A EVOLUÇÃO**ATÉ 30 DIAS DEPOIS DA CANDIDEMIA INCIDENTE:**

4.1 Nos 30 dias depois da primeira hemocultura positiva (candidemia incidente), houve sinais de envolvimento de órgãos pela infecção pela Candida? (NOTA: Evidência inclui resultados de métodos de imagem, como TC, ecocardiograma, histopatologia, exame físico, como em endoftalmite, ou cultura de um local *estéril*).

Sim Não Não sei

3.2 O paciente recebeu alta após esta hospitalização?

Sim Não Não foi internado Não sei

3.2.2 Se sim, qual foi a data da alta? : **27/06/2006**

Não recebeu alta até 30 dias após a candidemia incidente

Não sei

3.3 O paciente foi transferido para outra instituição?

Sim Não Não foi hospitalizado Não sei

3.4 O paciente sobreviveu >30 dias da data da candidemia incidente? Sim Não Não sei

3.4.2 Foi realizada necrópsia? Sim Não Não sei