

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

ALINE DIAS RIBEIRO

**OCORRÊNCIA DE INFECÇÃO NOSOCOMIAL POR *Candida spp.* NO HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO CASSIANO ANTONIO DE MORAES (HUCAM) E AVALIAÇÃO
DAS DROGAS ANFOTERICINA B E VORICONAZOL NA INIBIÇÃO DE
FORMAÇÃO DE BIOFILME PELAS ESPÉCIES ISOLADAS**

VITÓRIA
2013

ALINE DIAS RIBEIRO

OCORRÊNCIA DE INFECÇÃO NOSOCOMIAL POR *Candida* spp. NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO CASSIANO ANTONIO DE MORAES (HUCAM) E AVALIAÇÃO DAS DROGAS ANFOTERICINA B E VORICONAZOL NA INIBIÇÃO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME PELAS ESPÉCIES ISOLADAS

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: Profa. Dra Mariceli Lamas de Araújo

VITÓRIA
2013

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

R484o Ribeiro, Aline Dias, 1984-
Ocorrência de infecção nosocomial por *Candida spp.* no Hospital Universitário Cassiano Antonio de Moraes (HUCAM) e avaliação da anfotericina b e voriconazol na inibição de formação de biofilme pelas espécies isoladas / Aline Dias Ribeiro. – 2013.
89 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. Biofilme. 3. Anfotericina B. 4. Voriconazol. 5. Candidemia. 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
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

A mestranda ALINE DIAS RIBEIRO apresentou a dissertação intitulada “OCORRÊNCIA DE INFECÇÃO NOSOCOMIAL POR *Candida* spp. NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO CASSIANO ANTONIO DE MORAES (HUCAM) E AVALIAÇÃO DAS DROGAS ANFOTERICINA B E VORICONAZOL NA INIBIÇÃO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME PELAS ESPÉCIES ISOLADAS” em sessão pública, no dia 09 de agosto de 2013, 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 decidiu **aprovar** () **reprovar** a dissertação para habilitar a farmacêutica ALINE DIAS RIBEIRO a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 09 de agosto de 2013

Prof. Dra. Tânia Regina Grão Velloso
(Membro Externo)

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira
(Membro Interno)

Prof. Dra. Mariceli Lamas de Araujo
(Orientadora)

Aos meus pais, Gerson e Elídia, ao meu esposo Gustavo e a minha filha Lara pelo amor incondicional e suporte que sempre me deram.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por toda sua bondade e fidelidade, que me permitiram chegar até aqui.

Agradeço muito ao meu esposo Gustavo porque sempre com muito amor e paciência soube entender e aceitar minhas faltas e reclusões durante todos os momentos desta jornada.

Agradeço ao amor da minha vida, minha filha Lara, que ingressou nessa jornada junto comigo ainda bebê e aprendeu a entender, respeitar e admirar todos os meus momentos de estudo.

Sou muito grata aos meus pais, Gerson e Elídia, pelo incentivo em todos esses anos de estudo, pelo amor, apoio e reconhecimento. Sou grata a minha mãe por ter me ensinado a vencer batalhas. É uma grande guerreira. Ao meu irmão Marcelo agradeço por todas as risadas e por ter gerado um dos grandes amores da minha vida, minha sobrinha Lívia, que me fez rir na maior parte do tempo junto dela e mesmo longe, com suas lembranças.

À professora Mariceli, minha orientadora, a quem tanto admiro, sou extremamente grata por todo carinho e sabedoria que utilizou para me orientar nesta dissertação.

Às minhas amigas-irmãs: Bruna, Vanesa e Monique, agradeço por toda a diversão, leveza e principalmente por terem me ensinado que amizade se constrói com confiança, companheirismo e com muito amor. Principalmente a Bruna que, com seu estudo anterior, me forneceu dados preciosos de candidemia no HUCAM.

Agradeço a minha amiga Bruna Caldeira por todo suporte emocional durante toda essa caminhada.

Aos meus colegas de laboratório Simone e Mauro e pela disponibilidade e ensinamentos e principalmente a Roberta pelo cuidado, coleguismo e atenção. Agradeço a colega Jaqueline Rueda pelos dados fornecidos sobre candidemia no HUCAM.

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

RESUMO

INTRODUÇÃO: Infecções de corrente sanguínea por fungos têm se destacado principalmente pelo crescente número de casos de candidemia (infecções por *Candida* spp neste sítio). Atualmente, este fungo figura como um dos sete patógenos mais comuns em infecções nosocomiais, apresentando taxas de mortalidade bruta entre 40 e 70% e atribuída, de 50%. Formação de biofilme é frequentemente associada a persistente infecção por *Candida* spp. e dificulta o tratamento devido à elevada resistência que as células fúngicas adquirem a drogas antifúngicas, nestas circunstâncias. **OBJETIVOS:** Determinar a incidência de candidemias no Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM), entre 1º de março de 2011 a 30 de dezembro de 2012; determinar as taxas de prevalência das espécies de *Candida* spp.e testar a potencial atividade das drogas anfotericina B e voriconazol na inibição de formação de biofilme pelas espécies isoladas. **MATERIAIS e MÉTODOS:** Informações sobre o número total de admissões e de pacientes-dia, na UTI e UTIN do HUCAM foram fornecidos pelo setor de estatística e as 32 cepas de *Candida* spp., obtidos de sangue, urina e ponta de cateter foram isoladas no laboratório de Análises Clínicas deste hospital. Para as análises de inibição de formação de biofilme foram utilizados os testes estatísticos de Wilcoxon, de Sinais e de Mann-Whitney. **RESULTADOS:** O setor do HUCAM com maior incidência de candidemia foi a UTIN (8,6/10.000 pacientes-dia e 14,2/1.000 internações). *Candida* spp foi 5º microrganismo mais isolado das ICS, com predomínio de espécies não-*albicans* (81%), sendo *C. parapsilosis* a espécie mais frequente. Na UTIN, a frequência de candidemia por *C. albicans* foi de 67% e a única espécie não-*albicans* isolada foi *Candida parapsilosis*. Na avaliação da inibição de formação de biofilme foi constatado que as concentrações de anfotericina B estatisticamente significantes foram: 128 µg/mL para as espécies *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* e 64 µg/mL para as espécies agrupadas em “outros”. Voriconazol foi capaz de inibir formação de biofilme apenas para isolados da espécie *C. albicans* e na maior concentração testada (16 µg/mL). **CONCLUSÕES:** A maior incidência de candidemia no HUCAM foi encontrada para recém-nascidos internados na UTIN. A distribuição das espécies de *Candida* variou de acordo com setores do hospital, mas sofreu pouca alteração em relação ao período estudado. No geral, anfotericina B foi mais eficaz que voriconazol na inibição de formação de biofilme por espécies de *Candida*.

Palavras-chave: *Candida* spp., candidemia, biofilme, anfotericina B, voriconazol

ABSTRACT

INTRODUCTION: Bloodstream fungi infections have highlighted mainly by the growing number of cases of candidemia (infections by *Candida* spp this site). Currently, this fungus figure as one of seven most common pathogens in nosocomial infections, presenting mortality rates gross between 40 and 70%, and attributed of 50%. Biofilm formation is often associated with the persistent *Candida* spp. infection and it complicates the treatment due to high resistance that fungal cells acquire to antifungal drugs, in these circumstances. **OBJECTIVES:** Establish the candidemias incidence in University Hospital Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM), between 1 ° of March 2011 to December 30 2012; establish prevalence rates of *Candida* spp. species e test the potential drug activity of amphotericin B and voriconazole in the inhibition of biofilm formation by the species isolated. **MATERIALS AND METHODS:** Information on the total number of admissions and patient-days in the ICU and NICU's HUCAM were provided by statistics sector and 32 *Candida* spp. strains obtained from blood, urine and catheter tip were isolated in Laboratory of Clinical Analysis of the hospital. Inhibition of biofilm formation tests were analyzed using statistical of Wilcoxon, of Signs and of Mann-Whitney. **RESULTS:** HUCAM's sector with greater incidence of candidemia was the NICU (8.6 / 10,000 patients-day and 14,2 / 1,000 hospitalizations). *Candida* spp was the fifth most isolated microorganism of BSI, with predominance of non-albicans species (81%), being *C. parapsilosis* the species most frequent. In NICU, the frequency of candidemia by *C. albicans* was 67% and the only non-albicans specie isolated was *Candida parapsilosis*. In the evaluation of biofilm formation inhibition was evidenced that the concentrations of amphotericin B statistically significant were: 128 µg / mL for the species *C. albicans* studied, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* and 64 µg / mL for the species grouped into "others". Voriconazole was able to inhibit biofilm formation only for isolates of the species *C. albicans* and at the highest concentration tested (64 µg / ml). **CONCLUSIONS:** The highest incidence of candidemia in HUCAM was found for neonates interned in NICU. The distribution of *Candida* species ranged according with sectors the hospital, but suffered little alteration in relation to period studied. Overall, amphotericin B was more effective than voriconazole in the inhibition of biofilm formation by *Candida* species.

Keywords: *Candida* spp., Candidemia, biofilm, amphotericin B, voriconazole

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise do teste de Sinais para anfotericina B.....	51
Tabela 2 – Análise do teste de Sinais para voriconazol.....	54
Tabela 3 – Análise do teste de Mann-Whitney para anfotericina B.....	55
Tabela 4 – Análise do teste de Mann-Whitney para voriconazol.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Taxas de incidência de candidemia na UTIN e no HUCAM por 1.000 internações e 10.000 pacientes-dia.....	38
Figura 2 – Taxas de incidência de candidemia na UTIN e no HUCAM por períodos (por 1.000 internações).....	39
Figura 3 – Taxas de incidência de candidemia na UTIN e no HUCAM por períodos (por 10.000 pacientes-dia).....	40
Figura 4 – Taxas de incidência de infecção de corrente sanguínea no HUCAM por 1.000 internações e 10.000 pacientes-dia.....	41
Figura 5 – Taxas de incidência de candidemia na UTIN e no HUCAM por 1.000 internações e 10.000 pacientes-dia no período de 2006 a 2012.....	42
Figura 6 – Percentagem de ocorrência das diferentes espécies de <i>Candida</i> no HUCAM no período estudado.....	44
Figura 7 - Leituras de densidades óticas para as concentrações de 128 µg/ml (linha contínua) e de 0,5 µg/ml (linha pontilhada) de anfotericina B.....	45
Figura 8 – Leituras de densidades óticas para as concentrações de 16 µg/ml (linha contínua) e de 0,125 µg/ml (linha pontilhada) de voriconazol.....	46
Figura 9 – Formação de biofilme em decrescentes concentrações de anfotericina B em relação à origem das amostras clínicas.....	47
Figura 10 – Formação de biofilme em decrescentes concentrações de voriconazol em relação à origem das amostras clínicas.....	48
Figura 11 – Análise do teste de Wilcoxon na análise da inibição de biofilme para diferentes espécies de <i>Candida</i> spp. na presença de anfotericina B.....	50
Figura 12 - Análise do teste de Wilcoxon na análise da inibição de biofilme para diferentes espécies de <i>Candida</i> spp. na presença de voriconazol.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASD – Agar Sabouraud Dextrose

ATCC – American Type Culture Collection

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CNA – *Candida não-albicans*

CVC – Cateter Venoso Central

DMSO - Dimetilsulfóxido

DO – Densidade óptica

et al. - e outros

EUA – Estados Unidos da América

HIV – Human immunodeficiency vírus (vírus da imunodeficiência humana)

HUCAM – Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes

ICS – Infecção de corrente sanguínea

MBP – Muito Baixo Peso

MOPS– 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (Ácido N-morfolino propanosulfônico)

NPT – Nutrição Parenteral Total

PBS – Phosphate Buffered Saline (Tampão fosfato salina)

q.s.p. – quantidade suficiente para

rpm – rotações por minuto

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

UTI – Unidade de terapia Intensiva

UTIN – Unidade de terapia Intensiva Neonatal

YPD – Yeast Peptone Dextrose

LISTA DE SÍMBOLOS

% – porcentagem

= – igual a

> - maior que

< – menor que

± – mais ou menos

°C – Graus Celsius

mg/ mL – miligrama por mililitro

µg/ mL – micrograma por mililitro

µL – microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 O Gênero <i>Candida</i>	17
3.2 As espécies de maior interesse médico.....	19
3.3 Fatores de risco para candidemia.....	20
3.4 Mortalidade.....	21
3.5 Panorama de candidemia de origem nosocomial no mundo.....	21
3.6 Panorama de candidemia de origem nosocomial no Brasil.....	24
3.7 Biofilmes.....	26
3.7.1 Biofilme e antifúngicos	28
4 METODOLOGIA.....	33
4.1 Hospital de estudo.....	33
4.2 Microrganismo.....	33
4.3 Meios de Cultura.....	34
4.4 Drogas antifúngicas	34
4.5 Biofilme	34
4.5.1 Preparo do inóculo	34
4.5.2 Formação do biofilme	35
4.5.3 Leituras.....	35
4.6 Análise dos dados	36
5 RESULTADOS	38
5.1 Ocorrência de candidemia.....	38
5.2 Etiologia de candidemia.....	42

5.3 Biofilme	44
5.3.1 Inibição da formação de biofilme	44
6. DISCUSSÃO	58
6.1 Candidemia	58
6.2 Biofilme	60
7. CONCLUSÕES	63
8. REFERÊNCIAS	65
9 ANEXOS	80

1 INTRODUÇÃO

Candida spp. faz parte da microbiota endógena do trato gastrointestinal. Pode colonizar a pele e mucosas da cavidade oral, trato intestinal e genitourinário (Miranda et al., 2009; Edwards Jr., 2000)

Candida albicans é a espécie mais patogênica (Rinaldi, 1993) e como consequência dessa virulência, é a espécie fúngica mais representativa de doenças nosocomiais (Becker et al., 2010) e responsável por grande parte dos episódios de candidemia, apesar de CNA também emergir como um grupo muito representativo (Wissing et al., 2013).

Dentre as espécies não-*albicans*, *Candida tropicalis*, assim como *C. albicans*, apresenta boa aderência à mucosa, capacidade de formar biofilme, e alta atividade secretória de lípases e proteinases e boa capacidade de disseminação (Rinaldi, 1993). É uma das espécies de CNA mais isolada ao redor do mundo, corresponde cerca de 70% de frequência dentro deste grupo (Negri et al, 2012). *Candida glabrata* representa 5 a 14% dos episódios de candidemia (Alonso-Valle et al., 2003; Colombo et al., 2006; Oeser et al.,2013) e é a espécie mais relacionada com episódios de candidemia em adultos, nos EUA. (Oeser et al.,2013). *Candida krusei*: apresenta resistência intrínseca ao fluconazol e, certas vezes, baixa susceptibilidade a anfotericina B (Ricardo et al., 2010), por isso também tem sido reportada em pacientes que receberam profilaxia com terapia antifúngica (Schuster et al.,2012). Por fim, *Candida parapsilosis* corresponde à espécie não-*albicans* mais comum em crianças, principalmente em recém-nascidos (RNs) (Ortega et al, 2011).

Em adultos, os grupos que têm mais se destacado em apresentar infecções nosocomiais causadas por *Candida* spp são pacientes severamente imunodeprimidos (Alonso-Valle et al., 2004; Almirante et al., 2004) enquanto as infecções fúngicas por *Candida* spp em RNs são mais prováveis de ocorrer em prematuros e de muito baixo peso (MBP), admitidos em unidades de terapia neonatal (UTIN).

Apesar da incidência relativamente baixa, a taxa de mortalidade devido a candidemia é alta, a bruta está entre 40 e 70% e a atribuída pode chegar a 50%, sendo menor em crianças (Eggiman, garbino e pittet, 2003; Gudlaugsson et al., 2003; Yang et al.,2008).

Poucos estudos têm como base populacional central as crianças. Segundo Oeser et al. (2013) na Inglaterra e no País de Gales, a incidência média anual de candidemia durante a infância foi de 1,52/100.000 pessoas-ano, no período de 2000 a 2009. Em seu estudo, a incidência de candidemia infantil aumentou entre 2000 e 2007, uma tendência que tem sido observada nos países mais desenvolvidos ao longo das últimas 2 décadas, o que pode refletir um aumento global das populações de risco para candidemia e melhores taxas de sobrevivência para prematuros de extremo baixo peso.

Em relação a distribuição das espécies, a maioria dos estudos mostrou que as espécies não-*albicans* foram responsáveis por mais de 50% dos casos de candidemia, sendo mais representativas as espécies *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. *C. glabrata* apresentou baixa incidência na maioria dos estudos no Brasil, confirmando a tendência de ser mais rara aqui (Colombo et al., 1999; Colombo et al., 2006; Sampaio Camargo et al., 2010; Aquino et al., 2005; Marra et al., 2013; Chang et al. 2003; Matta et al. 2006).

A patogenicidade da *Candida albicans* está fundamentalmente relacionada a alguns fatores de virulência, como a aderência, a produção do tubo germinativo, a hidrofobicidade da superfície celular, a variação fenotípica (*switching*) e a produção de enzimas extracelulares (lípsases e proteinases) (Sudberry et al., 2004).

Tumbarello et al. (2012) identificou dois fatores de risco que foram especificamente relacionados à formação de biofilme: sondagem vesical e diabetes mellitus. A hiperglicemia pode favorecer a adaptação e consequente formação de biofilme, uma vez que a glicose é a fonte de carbono utilizado para produção da matriz de polissacáride de comunidades organizadas.

O estudo de formação de biofilme está estritamente ligado à alta resistência às drogas antimicrobianas. Normalmente, devido a resposta refratária dos antifúngicos, os dispositivos infectados devem ser removidos para que se alcance a cura da infecção. Para alguns

dispositivos, a remoção requer uma grande cirurgia e expõe os pacientes a riscos significativos, o que pode representar um importante desafio médico (Kunamoto; Vines, 2005).

Entre as hipóteses de resistência dos biofilmes aos antifúngicos estão: a matriz extracelular impede o acesso do medicamento às células fúngicas (Ramage et al., 2002); aumento da expressão de genes codificadores de bombas de efluxo da droga (Sanglard et al, 2002; White et al, 1998) e a mudança no padrão de composição dos esteróis de membrana nas células fúngicas (Mukherjee et al., 2003).

Dos antifúngicos existentes, os azólicos são os mais largamente utilizados na prática clínica, principalmente o fluconazol. O novo azólico, voriconazol, apresenta ainda maior espectro de atividade e pode ser utilizado para aquelas infecções refratário ao fluconazol (Maertens, 2004; Cannon; Kerridge, 1998). A anfotericina B (desoxicolato) tem sido considerada um dos agentes antifúngicos mais eficientes para uso sistêmico; porém, a toxicidade, sobretudo a nefrotoxicidade, tem restringido sua utilização (White; Marr, 1998), apesar de apresentar baixíssima toxicidade em RNs. A anfotericina B lipossomal é uma formulação com nefrotoxicidade reduzida, porém seu uso é limitado por seu alto custo.

Shuford et al.(2007) em seu estudo de avaliação da eficácia de várias drogas contra biofilmes formados por *C. albicans* mostrou que anfotericina B apresentou atividade contra biofilmes maduros, porém a toxicidade desta droga, em altas concentrações, limita sua utilização na prática clínica. O voriconazol, em contrapartida, não reduziu a atividade metabólica de células sésseis de *C. albicans* em biofilmes maduros de forma confiável, mesmo em concentrações elevadas.

O presente estudo justifica-se pela necessidade de se conhecer as incidências de candidemia do HUCAM e perfil de inibição de biofilme pelas drogas anfotericina B e voriconazol dos isolados testados, uma vez que fatores ambientais e variações geográficas podem influenciar incisivamente nos resultados obtidos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar um levantamento prospectivo de casos de candidemia no HUCAM e avaliar o efeito potencial da anfotericina B e do voriconazol na inibição da formação de biofilmes pelas espécies de *Candida* isoladas.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a frequência de candidemia no HUCAM.
- Determinar a frequência das infecções fúngicas causadas por *Candida albicans* em relação às outras espécies de *Candida* e em relação às infecções bacterianas.
- Avaliar o potencial efeito da anfotericina B e do voriconazol na inibição *in vitro* de formação de biofilme pelas espécies isoladas.
- Comparar este efeito inibitório entre as diferentes espécies de *Candida* e em relação ao material clínico analisado.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O Gênero *Candida*

O gênero *Candida* pertence ao reino Fungi. Já foram descritas mais de 200 espécies, sendo que somente 10% destas, estão relacionadas a infecção em humanos.(Eggimann; Garbino; Pittet, 2003).

Candida spp. é um organismo pleomórfico. Apresenta, predominantemente, desenvolvimento unicelular e normalmente se reproduz por brotamento - blastoconídeo. Mesmo que rara, a reprodução assexuada, é feita através de ascospóros. Desta forma há uma maior variabilidade genética para as espécies do gênero. (Sudberry et al., 2002).

Candida, assim como outros fungos, são organismos eucarióticos e possuem parede celular bem definida, composta por uma camada de polímero de manose, a manana, que junto à proteínas é chamada de manoproteína, uma camada denominada glucana, composta por polímeros de glucanas com β -1,3-D-glucanas, β -1,6-D-glucanas, de quitina (polímero de acetilglicosamina) e de uma pequena quantidade de proteínas e lipídios. A membrana plasmática é muito semelhante à membrana humana, tendo dupla camada fosfolipídica com vários tipos de esteróis, onde o principal é o ergosterol (Akpan; Morgan, 2002).

Candida spp. faz parte da microbiota endógena do trato gastrointestinal, podendo ainda colonizar a pele, as mucosas e cavidade oral. Aproximadamente 80% dos adultos saudáveis apresentam alguma espécie de *Candida* no trato gastrointestinal e cerca de 30% das mulheres apresentam *Candida* na vagina (Miranda et al., 2009; Edwards Jr., 2000)

Poucas são as espécies de *Candida* capazes de crescer a 37°C e por isso é pequena a associação com colonização em humanos. Mas, espécies comensais podem agir como patógenos oportunistas em indivíduos debilitados. *Candida albicans* é a espécie mais envolvida em processos infecciosos nos seres humanos, por ser a espécie mais patogênica (Edwards Jr, 2000).

Candida albicans pode se apresentar na forma de levedura (forma esférica ou oval) no estado saprofítico associada à colonização assintomática; ou na forma filamentosa (pseudo-hifas e hifas) observada em processos patológicos (Sudberry et al., 2004).

Hifas verdadeiras são compartimentadas por septos transversos, porém sem constrições nas junções dos septos e, por esta característica, se diferem das pseudo-hifas que são as leveduras alongadas e unidas por contrações (Willians; Lewis, 2011).

Causar doença está mais relacionado ao *status* imunológico do hospedeiro do que aos seus fatores de virulência. Fundamentalmente, a patogenicidade da *Candida albicans* está relacionada a alguns fatores de virulência, como a aderência, a produção do tubo germinativo, a hidrofobicidade da superfície celular, a variação fenotípica (*switching*) e a produção de enzimas extracelulares (lípsases e proteinases) (Sudberry et al., 2004).

A aderência da *C. albicans* se faz necessária para se iniciar sua patogenicidade. As primeiras interações relatadas são fracas e inespecíficas, envolvendo forças hidrofóbicas e eletrostáticas. A partir delas são formadas interações específicas que promovem a adesão de *C. albicans* às superfícies epiteliais (Staab et al., 1999).

O crescimento das hifas começa com a formação do tubo germinativo. As hifas penetram mais facilmente que as outras formas, contribuindo para a invasão de tecidos e em corrente sanguínea pelo fungo. Esta ação é potencializada pela produção de enzimas extracelulares. (Kunamoto; Vines, 2005).

Entre as enzimas mais importantes para a patogenicidade de *C. albicans* estão: as aspartil-proteases secretadas (SAP), que clivam proteínas essenciais para a defesa do organismo hospedeiro, degradam queratina e colágeno (Naglik et al., 2004) e as fosfolipases, que degradam a membrana da célula hospedeira, levando a lise celular e morte (Willians; Lewis, 2011).

Switching, que é a habilidade que *Candida* spp. tem de alterar seu fenótipo, adaptando-se ao microambiente - permite um mecanismo de evasão da resposta imune do hospedeiro (Morschhauser, 2010; Soll, 2009). Esta característica também é responsável pela aparente

dissonância entre os resultados encontrados às vezes “*in vitro*” daqueles encontrados “*in vivo*” em relação aos fatores de virulência do fungo (Soll, 2009).

3.2 As espécies de maior interesse médico

Candida albicans: Espécie mais patogênica, apresentando forte aderência a mucosa e alta produção de enzimas extracelulares de degradação (Rinaldi, 1993). Como consequência dessa virulência, é a forma fúngica mais representativa de doenças nosocomiais (Becker et al., 2010) e responsável por grande parte dos episódios de candidemia (Wissing et al., 2013).

Candida glabrata: Representa 5 a 14% dos episódios de candidemia (Alonso-Valle et al., 2003; Colombo et al., 2006; Oeser et al., 2013).

Espécie mais relacionada com episódios de candidemia em adultos (Oeser et al., 2013). Os fatores de risco mais associados a esta espécie são: transplante de órgãos, insuficiência renal, tumores sólidos, profilaxia antifúngica – fluconazol - e procedimentos intensivos (Moran et al., 2010).

Tem a taxa de mortalidade entre as mais elevadas atribuídas às espécies de *Candida*, variando entre 40 a 70 % (Alonso-Valle et al., 2003; Moran et al., 2009).

Candida tropicalis: Assim como *C. albicans*, esta espécie apresenta boa aderência à mucosa, capacidade de formar biofilme, e alta atividade secretória de lípases e proteinases e boa capacidade de disseminação (Rinaldi, 1993).

É uma das espécies de CNA mais isolada ao redor do mundo, corresponde cerca de 70% deste grupo. Os fatores de riscos mais associados são principalmente: admissão em unidades intensivas de tratamento (UTI), câncer, cateter venoso central (CVC) e antibiótico de amplo espectro (Negri et al, 2012).

Candida Krusei: apresenta resistência intrínseca ao fluconazol e, certas vezes, baixa susceptibilidade a anfotericina B (Ricardo et al., 2011), por isso também tem sido reportada em pacientes que receberam profilaxia com terapia antifúngica (Schuster et al., 2012).

Ocorre geralmente em pacientes neutropênicos, com câncer ou infectados pelo vírus da imunodeficiência (HIV) (Almirante et al., 2005).

A mortalidade atribuída por esta espécie é cerca de 40% (Gudlaugsson et al., 2003; Schuster et al., 2012).

Candida parapsilosis: espécie não-*albicans* mais comum em candidemias de crianças, principalmente em recém-nascidos (RNs) (Ortega et al., 2011).

Oeser et al. (2013) estudou as candidemias mais frequentes em cada idade, desde o nascimento até a infância e constatou que *C. parapsilosis* é mais isolada de RN com mais de duas semanas de vida.

Os fatores de risco mais associados a esta espécie são Nutrição Parenteral Total (NPT) e CVC. *C. parapsilosis* tem a menor taxa de mortalidade do gênero (Gudlaugsson et al., 2003; Ortega et al., 2011). Tem sido relatada infecção horizontal por *C. parapsilosis* em UTI pediátrica (Miranda et al., 2012).

3.3 Fatores de risco para candidemia:

Em adultos, os grupos que têm mais se destacado em apresentar infecções nosocomiais causadas por *Candida* spp são: pacientes severamente imunodeprimidos, receptores de transplante de órgãos ou medula óssea, portadores de neoplasias, pacientes neutropênicos como consequência de terapia quimioterápica; e aqueles submetidos a grandes cirurgias ou procedimentos invasivos. (Alonso-Valle et al., 2003; Almirante et al., 2005). A maioria dos fatores de riscos que foram citados está direta ou indiretamente envolvida com os avanços da medicina referente a novas tecnologias e novas terapias.

As infecções fúngicas por *Candida* spp em RNs são mais prováveis de ocorrer em prematuros e de muito baixo peso (MBP), admitidos em unidades de terapia neonatal (UTIN). Além disso, na maioria das vezes, outros fatores se associam à medida que se aumenta a permanência na unidade de serviço de saúde. Baixa pontuação do score APGAR,

malformações congênitas e NPT são fatores de risco mais associados a esta faixa etária (Oeser et al., 2013; Almirante et al., 2005; Colombo et al., 2006).

3.4 Mortalidade

Apesar da incidência relativamente baixa, a taxa de mortalidade bruta devido a candidemia é alta, entre 40 e 70%. Há grandes variações na taxa bruta de mortalidade, refletindo, principalmente, a gravidade das doenças subjacentes, sendo menor em crianças (Eggiman; Garbino; Pittet, 2003; Gudlaugsson et al., 2003; Yang et al., 2008)

De acordo com Blyth et al. (2007) em estudos publicados na última década, as taxas de mortalidade em crianças com candidemia varia de 19% a 31%.

Tumbarello et al. (2012), relatam que a taxa de mortalidade foi mais alta para aquele grupo com isolados capazes de formar biofilme, comparados ao grupo cujos isolados de candidemia não eram formadores de biofilme. Destacando que não só a mortalidade foi mais alta, como também, o tempo de hospitalização e o custo do tratamento

3.5 Panorama da candidemia de origem nosocomial no mundo

As taxas de candidemia variam geograficamente, isto é, existem diferenças na epidemiologia de candidemia entre diferentes países. A importância destes estudos se dá pela necessidade de conhecer e monitorar tendências de incidência, distribuição de espécies e perfil de susceptibilidade a antifúngicos (Colombro et al., 2006).

Infecções de corrente sanguínea por fungos têm sido destacadas graças ao crescente número de casos de candidemia, que é considerada a quarta maior causa deste tipo de infecção (Pfaller

et al., 1998; Fraser et al., 1992; Pfaller et al, 2010b). Hoje, com tantos avanços diagnósticos e terapêuticos, vários fatores favorecem o aparecimento de uma população com alto risco para infecções oportunistas: pacientes transplantados, onco-hematológicos, queimados, pacientes cirúrgicos, recém-nascidos prematuros, imunodeprimidos, entre outros (Beck-Sagué; Jarvis, 1993).

Candidemias são responsáveis por 8% a 15% de todas as infecções da corrente sanguínea nosocomiais nos Estados Unidos (Wisplinghoff et al, 1980). Estudos realizados na década de 1980 estimaram um aumento de 5 vezes dos casos de candidemia durante essa década (Banerjee et al., 1991). Zilberberg et al. (2008) relatam um aumento de 50% na incidência de candidemia nos Estados Unidos no período de 2000 a 2005.

Lee et al. (2011) relatam que, em Taiwan, durante o ano de 2009, *Candida* spp. foi o patógeno mais comum em infecções hospitalares entre as UTIs estudadas.

Na Europa, segundo Voss et al. (1996) a incidência de infecções de corrente sanguínea por *Candida* dobrou entre 1987 e 1995, na Holanda. As taxas de candidemia, entretanto, mantiveram-se inalterada entre 1991 e 1996, na Noruega, e entre 1991 e 2000, na Suíça (Marchetti et al., 2004; Sandven et al., 2006). Ainda na Europa, a Islândia registrou um aumento anual de incidência de candidemia no período de 1980 a 1984 e entre 1995 e 1999 (Asmundsdottir et al., 2002) e na Finlândia também foi registrado um aumento de incidência por infecções de corrente sanguínea por *Candida*, principalmente em idosos e RNs (Poikonen et al., 2003).

Um estudo populacional realizado na Espanha entre 2002 e 2003, por Almirante et al. (2005), demonstrou uma incidência global de 4,3/100.000 habitantes com maior incidência em faixas etárias extremas: RNs (38,8/100.000 habitantes) e idosos (12/100.000 habitantes).

Bassetti et al.(2006) avaliaram os casos de candidemia no período de 1999 a 2003, entre pacientes internados em uma UTI da Itália e encontraram uma incidência global de 2,22/10.000 pacientes-dia, mas destacaram um aumento da incidência durante o período estudado de 1,5 para 3,6/10.000 pacientes-dia.

Ainda que *C. albicans* seja uma espécie frequentemente reportada na etiologia das infecções nosocomiais, observa-se nos últimos anos uma tendência para o predomínio de CNA (Alonso-Valle et al., 2003; Bassetti et al., 2006).

Observou-se um decréscimo de candidemia de origem nosocomial por *C. albicans* e aumento de ICS por *C. glabrata*, nos EUA. Esta espécie é a CNA mais frequentemente isolada nos casos de candidemia nos Estados Unidos (Pfaller et al., 2001; Gulaugdsson et al., 2003), o que não ocorre em países da América Latina, da Europa e no Canadá onde *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* são mais frequentes (Pfaller et al., 2001; Blot et al., 2002; Alonso-Valle et al., 2003 e Colombo et al., 2003).

Poucos estudos têm como base populacional central as crianças. Segundo Oeser et al. (2013) na Inglaterra e no País de Gales, a incidência média anual de candidemia durante a infância foi de 1,52/100.000 pessoas-ano, no período de 2000 a 2009. Em seu estudo, a incidência de candidemia infantil aumentou entre 2000 e 2007, uma tendência que tem sido observada nos países mais desenvolvidos ao longo dos últimas 2 décadas, o que pode refletir um aumento global das populações de risco para candidemia e melhores taxas de sobrevivência para prematuros de extremo baixo peso.

Taxas de candidemia em RN no Reino Unido são geralmente menores do que as relatadas nos Estados Unidos. Entre 2003 a 2004, por exemplo, um estudo da Unidade de Vigilância Pediátrica Britânica relatou taxas de candidemia de 2,1% (IC 95% 1,7-2,6) entre os RNs de extremo baixo peso (<1000 g), com idade inferior a 3 meses, no Reino Unido e na Irlanda (Clerihew, Lamagni, Brocklehurst, 2006).

Estes dados contrastam com um estudo conduzido por Benjamin et al.(2010) que relata incidência de 9% entre os RNs de extremo baixo peso, com idade inferior a 120 dias, no Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, no período de 2004 a 2007.

Candida parapsilosis apresenta uma prevalência significativamente em recém-nascidos, maior do que em outras populações em risco (Bliss et al., 2012).

3.6 Panorama da candidemia de origem nosocomial no Brasil

O Brasil apresenta uma frequência de estudos de epidemiologia de candidemia bem menor, comparados ao Estados unidos ou países da Europa. Podemos ver, entretanto, que *Candida* spp. aparece como importante agente etiológico das ICSs.

Segundo Colombo et al. (2006), *Candida* spp. foi o quarto microorganismo mais freqüentemente isolado de hemoculturas, precedido por estafilococos coagulase-negativo (11,97/1.000 admissões e 1,62/1.000 pacientes-dia), *Staphylococcus aureus* (7,31/1.000 admissões e 0,99/1.000 pacientes-dia) e *Klebsiella pneumoniae* (2,92/1.000 admissões e 0,40/1000 pacientes-dia).

Semelhantemente, Chang et al. (2003), através de um estudo conduzido no Hospital Universitário do Mato Grosso do Sul, constataram que *Candida* spp. foi o quinto patógeno mais comum de infecções nosocomiais.

Pereira et al (2010) destaca também em seu estudo de cinco anos de avaliação de candidemia em um hospital terciário de São Paulo, que *C. albicans* foi a espécie mais prevalente nos pacientes pediátricos.

Marra et al., (2011) em estudo mais recente que abrangeu 16 hospitais de todas as regiões do Brasil e 2.563 pacientes, no período de julho de 2007 a março de 2010, identificaram *Candida* spp. como sendo o sexto microrganismo mais comumente isolado nas UTIs.

Em relação a distribuição das espécies, a maioria dos estudos mostrou que as espécies não-*albicans* foram responsáveis por mais de 50% dos casos de candidemia, sendo mais representativas as espécies *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. *C. glabrata* apresentou baixa incidência na maioria dos estudos, confirmando o conceito de que seja mais rara no Brasil (Colombo et al., 1999; Colombo et al., 2006; Sampaio-Camargo et al., 2010; Aquino et al., 2005; Marra et al., 2011; Chang et al. 2003; Matta et al. 2006).

Um recente estudo de Bonfietti et al. (2013) confirma esses dados ao mostrar que a incidência de *Candida* não-*albicans* foi de 56%, sendo que *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* juntas totalizaram 47%.

As taxas de mortalidade foram altas e não diferiram daquelas encontradas em outras regiões do mundo, variando em torno de 50% (Colombo et al., 1999; Colombo et al., 2006; Chang et al., 2003).

Há de se destacar as elevadas taxas de mortalidade bruta observada para *C. tropicalis* e *C. albicans* e a menor para *C. parapsilosis*, semelhantemente a estudos realizados em outros países (Colombo et al., 1999; Miranda; Rodrigues; Costa, et al., 2012; Chang et al., 2003; Bonfietti et al., 2013).

Um estudo de Xavier et al. (2008), abrangeu casos de candidemia de RNS, em uma UTIN de um hospital público do Mato Grosso do Sul. Pode-se constatar que *Candida albicans* foi a espécie mais prevalente, seguida por *C. parapsilosis* e que a mortalidade encontrada foi de 76%, número relativamente alto devido às demais complicações apresentadas pelos neonatos.

3.7 Biofilmes

O biofilme é a forma de crescimento bacteriano mais comum na natureza. Destaca-se, também, por sua importância em infecções clínicas, especialmente devido à alta resistência a antimicrobianos que lhe é associada (Chandra et al., 2001; Xu et al., 2006). Pode ser considerado como uma comunidade tridimensional de microorganismos que estão embutidos em uma matriz de polissacarídeos e proteínas e ligados a uma superfície (Kunamoto; Vines, 2005; Ferreira et al., 2009; Blankenship; Mitchell, 2006).

São imensos os números de cateteres (vasculares e urinários) e próteses artificiais utilizadas anualmente nos Estados Unidos e, sabe-se que cerca de 10% das infecções ligadas a esses dispositivos são devido a *Candida* spp (Kojic; Darouiche, 2004).

Segundo Uppuluri et al., 2010, leveduras, principalmente *Candida albicans*, são a terceira causa de infecções relacionadas a cateter intravascular, através da formação de biofilme. Este serve como reservatório do fungo, liberando constantemente células fúngicas na corrente sanguínea, de onde podem ganhar acesso a sítios a distância e causar infecções metastáticas e vários órgãos.

A formação do biofilme de *Candida spp.* é descrita como um processo gradual que se inicia com a adesão a uma superfície que pode ser viva (tecido do hospedeiro) ou abiótica (cateteres, implantes, próteses e outros). A adesão inespecífica de *C. albicans* a uma determinada superfície é iniciada através de interações fracas e reversíveis envolvendo forças hidrofóbicas e eletrostáticas (Cotter; Kavanagh, 2000).

As proteínas ALS (aglutinina-like sequence) são consideradas excelentes candidatas a adesinas de biofilme (Blankenship; Mitchell, 2006), uma vez que há aumento da expressão de vários genes de ALS, durante sua formação (Green et al., 2004).

O fator de transcrição Ace2 (ativação de CUP1 expressão 2) também é necessário para a formação de biofilme. Um ace2 mutante tem um defeito na aderência e é incapaz de produção de um biofilme confluyente *in vitro* (Kelly et al., 2004).

A formação de biofilmes envolve um complexo fenômeno de adesão. A identificação dos genes que são mais prováveis de estar envolvidos na aderência e a disponibilidade de mutantes resultantes de deleção destes genes permitem um estudo mais abrangente deste assunto (Blankenship; Mitchell, 2006).

O segundo passo na formação de biofilmes por *Candida* spp. é a fase de filamentação e proliferação, na qual são formadas múltiplas camadas de células sésseis de diferentes morfologias, incluindo hifas e pseudo-hifas. A arquitetura em camadas observadas tanto em *in vitro* quanto *in vivo*, sugere que a diferenciação morfológica para produzir hifas, desempenha um importante papel na maturação do biofilme (Blankenship; Mitchell, 2006; Baillie e Douglas, 2000). Portanto, a maturação do biofilme resulta em uma rede complexa de células incorporadas em material extracelular polimérico, composto de carboidratos, proteínas, hexosamina e ácido urônico, bem como constituintes do hospedeiro em ambientes naturais (Al-Fattani e Douglas, 2006), porém uma grande parte da matriz extracelular permanece não identificada (Blankenship e Mitchell, 2006).

Uma vez atingida a maturação, ocorre no biofilme uma série de alterações na forma de crescimento e cooperação fisiológica entre as células (Costerton et al., 2003). Existem evidências de que as células fúngicas do biofilme são capazes de coordenar suas atividades através da liberação de fatores de sinalização e de responder a estes sinais. Quorum sensing descreve um amplo conjunto de fenômenos em que células são orquestradas por sinalização por tais moléculas segregadas, dirigindo, por exemplo, a taxa de crescimento, o

desprendimento do biofilme, a virulência e a resistência antimicrobiana (Keller; Surette, 2006). Em se tratando de biofilmes de *Candida*, o fator quorum sensing Farnesol (3,7,11-trimetil-2, 6,10 - dodecatriene-1-ol) e tirosol (2 - [4-hidroxifenil] etanol) foi identificado como inibidor do desenvolvimento de hifas (Shchepin et al., 2003). Uma hipótese simples desta função do Farnesol é que a inibição na formação das hifas contribui para dispersão das células do biofilme (Schuster et al. 2012), o que desempenha um papel fundamental no ciclo de desenvolvimento do biofilme e se associa à candidemia e doenças invasivas (Uppuluri et al., 2010).

Tumbarello et al. (2012) estudou os principais fatores de risco associados à formação de biofilme. No presente estudo foram identificados dois fatores de risco que foram especificamente relacionados à formação de biofilme: sondagem vesical e diabetes mellitus. A hiperglicemia pode favorecer a adaptação e consequente formação de biofilme, uma vez que a glicose é a fonte de carbono utilizado para produção da matriz de polissacáride de comunidades organizadas.

3.7.1 Biofilme e antifúngicos

Não se estuda biofilme sem mencionar a importante característica que é a alta resistência às drogas antimicrobianas. Normalmente, devido a essa resposta refratária, os dispositivos infectados devem ser removidos para que se alcance a cura da infecção. Para alguns dispositivos, a remoção requer uma grande cirurgia e expõe os pacientes a riscos significativos, o que pode representar um importante desafio médico (Kunamoto; Vinces, 2005).

São várias as hipóteses que tentam explicar porque as células do biofilme são mais resistentes a drogas do que as células planctônicas. A primeira a ser tratada é a idéia de que a matriz extracelular proíba o acesso do medicamento às células fúngicas. Isto parece improvável, uma vez que Ramage et al (2002) demonstraram que mesmo mutantes formando biofilmes defeituosos são igualmente resistentes ao fluconazol e anfotericina B, como as cepas

selvagens. Al-Fattani e Douglas (2004) fortaleceram esta hipótese ao descrever um modelo de filtração biofilme e ao descobrirem que antifúngicos podem se difundir facilmente através de biofilmes maduros de *C. albicans*.

Outra hipótese a ser considerada é que a resistência aos medicamentos em biofilmes é devida ao aumento da expressão de genes codificadores de bombas de efluxo de droga, explicando a aquisição inicial de resistência à droga (White et al, 1998; Baillie e Douglas, 1999; Sanglard et al, 2002; Kunamoto e Vincens, 2005; Blankenship e Mitchell, 2006;). Mukherjee et al. (2003) testaram o efeito da deleção de todos os três genes codificadores de bomba de efluxo ($\Delta cdr1/\Delta cdr2/\Delta mdr1$) na resistência a antifúngicos, em diferentes fases de desenvolvimento do biofilme de *C. albicans*. Foi sugerido que as bombas de efluxo são diferencialmente expressas nas várias fases formação de biofilme e estas bombas contribuem para a resistência associada ao início da formação do biofilme, mas não durante as fases posteriores, quando já está maduro.

Há ainda a hipótese de que a mudança no padrão de composição dos esteróis de membrana, nas células fúngicas, pode explicar a resistências a drogas como anfotericina B e azólicos, que tem como alvo terapêutico o ergosterol de membrana. Mukherjee et al. (2003) analisaram esteróis total da membrana celular de células planctônicas e sésseis (de biofilmes) por cromatografia em fase gasosa. Os níveis de ergosterol nas células obtidas do biofilme foram maiores nas fases intermediárias e maduras em relação à fase inicial, sugerindo que este possa ser o mecanismo de resistência aos antifúngicos em fases mais maduras de desenvolvimento do biofilme de *C. albicans*.

Nailis et al. (2010) mostraram que a exposição de biofilme maduros de *C. albicans* a altas concentrações de drogas antifúngicas resultou em aumento droga-específico na expressão de genes. Exposição a fluconazol levou a aumento na expressão de genes (ERG1, ERG3, ERG11 e ERG25), codificadores de enzimas envolvidas na biosíntese do ergosterol, esterol de membrana celular fúngica enquanto o tratamento com anfotericina B aumentou a expressão de genes (KRE1 e SKN1) envolvidos na biosíntese de beta 1-6 glucanas, polímero de parede

celular fúngica. Concluíram que estes efeitos podem contribuir com o fenótipo de resistência a antifúngicos.

Entre os antifúngicos existentes, os azólicos são os mais largamente utilizados na prática clínica, principalmente o fluconazol. Este antifúngico triazólico apresenta largo espectro de ação, com perfil farmacocinético favorável, boa disponibilidade, baixa toxicidade e apresentações para administração oral e endovenosa. É utilizado no tratamento de infecções por várias espécies de *Candida* e outros fungos. Entretanto, espécies resistentes a esta droga têm limitado a sua utilização. O novo triazólico voriconazol apresenta ainda maior espectro de atividade e pode ser utilizado para aquelas infecções refratário ao fluconazol (Maertens, 2004; Cannon; Kerridge, 1998).

Os azólicos agem interferindo na síntese do ergosterol, através da inibição da enzima lanosterol 14- α -desmetilase, codificada pelo gene ERG11. Esta enzima converte lanosterol a ergosterol e o truncamento desta via favorece o aparecimento, na membrana citoplasmática, de precursores do ergosterol, que são considerados tóxicos (Cuenca-Estrela et al., 2002). O ergosterol da membrana plasmática é importante na fluidez, na permeabilidade, na estruturação da morfologia celular, na atividade enzimática e na progressão do ciclo celular (Cannon; Kerridge, 1998; Daum et al., 1998).

Vários azólicos vem sendo desenvolvidos, dentre eles o posaconazol, ravuconazol, albaconazol e isavuconazol (Pasqualotto; Denning, 2008). Tobudic et al. (2010), ao estudar diferentes combinações de antifúngicos contra biofilme formados por *C. albicans* constatou que a ação combinada de anfotericina B e posaconazol foi sinérgica, isto é, apresentou melhor resultado, se comparada a ação das duas drogas separadamente. Chatzimoschou et al. (2011) também apresentaram resultados de sinergismo destas duas medicações contra biofilme de *Candida albicans*.

Os poliênicos, como a anfotericina B, apesar de pertencerem à outra classe de antifúngicos também apresentam o ergosterol como alvo terapêutico. Estas drogas, contudo, agem no

ergosterol já localizado na membrana plasmática, formando poros através dos quais componentes celulares – principalmente íons potássio – vazam e destroem o gradiente de prótons, o que leva a morte celular. A anfotericina B (desoxicolato) tem sido considerada um dos agentes antifúngicos mais eficientes para uso sistêmico; porém, a toxicidade, sobretudo a nefrotoxicidade, tem restringido sua utilização (White; Marr, 1998). Por isso, nestes casos, opta-se por formulações lipídicas de anfotericina B, que são menos nefrotóxicas que a formulação de desoxicolato. Além desta indicação, estas formulações podem substituir a forma de desoxicolato caso o tratamento com este tipo de anfotericina não tenha sucesso, mesmo em doses acima de 500 mg ou caso ocorra reações adversas graves relacionadas à infusão (Rex et al., 2000). Entretanto, o custo de um tratamento com anfotericina B lipossomal, por exemplo, é muito superior se comparada a anfotericina desoxicolato.

Há vários protocolos para escolha de tratamento de candidemia em neonatos. Pappas et al. (2004) preconiza fluconazol e anfotericina B para esta faixa etária, com duração de tratamento de 14 dias após a última hemocultura positiva e resoluções dos sinais e sintomas. Kohli et al. (2008) reportou uma série de casos de emprego de voriconazol em RNs com doenças cardíacas e candidemias associadas. Não foi observado nenhuma interação medicamentosa ou efeitos colaterais provenientes da terapia antifúngica. Os autores destacaram além da segurança no uso deste antifúngico em RNs, a vantagem significativa do custo do tratamento comparado com anfotericina B lipossomal.

Uppuluri et al. (2011) em seu estudo sobre terapia antifúngica contínua para avaliação da terapia contra as células de dispersão do biofilme relata que a anfotericina B foi o fármaco que mais inibiu a formação de biofilme. A terapia contínua com 4 µg/ml de anfotericina B resultou em mais de 50% de inibição das células do biofilme. Se esta concentração aumentasse para 16 µg/ml, a inibição subiria para 80%. Essas concentrações, porém, são consideradas tóxicas.

Um estudo conduzido por Shuford et al.(2007) para avaliação da eficácia de várias drogas contra biofilmes formados por *C. albicans*, mostrou que anfotericina B apresentou atividade contra biofilmes maduros, porém a toxicidade desta droga, em altas concentrações, limitaria

sua utilização na prática clínica. O voriconazol, em contrapartida, não reduziu a atividade metabólica de células sésseis de *C. albicans* em biofilmes maduros de forma confiável, mesmo em concentrações elevadas.

Kuhn et al. (2002) testaram uma série de antifúngicos contra biofilme de *Candida*: fluconazol, nistatina, clorexidina, terbinafina, anfotericina B (desoxicolato), voriconazol, ravuconazol, anfotericina B (lipossomal) e caspofungina; e constatararam que apenas as duas últimas drogas mostraram atividade contra biofilme.

4 MÉTODOS

4.1 Local de estudo

O hospital incluído no presente estudo foi o Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM). É um hospital terciário com 255 leitos, 40 deles em UTI. É considerado o maior hospital do Espírito Santo em número de atendimentos, sobretudo os de alta complexidade. Informações sobre o número total de admissões e de pacientes-dia, na UTI e UTIN do HUCAM para o cálculo das incidências de candidemia foram fornecidas pelo setor de estatística do hospital.

4.2 Microrganismos

Foram utilizados 32 isolados clínicos provenientes do laboratório de microbiologia do HUCAM, obtidos de sangue, urina e ponta de cateter, representando diferentes espécies de *Candida*: *Candida albicans*(25%), *Candida parapsilosis* (40,6%), *Candida tropicalis* (22%), *Candida guilliermondii*, (6,2%), *Candida lusitaniae* (3,1%), *Candida haemulonii* (3,1%), sendo que, para facilitar a análise de inibição de formação de biofilme, as três últimas espécies foram incluídas no grupo “outros”.

Nos experimentos de biofilme foi também utilizada a cepa padrão de *Candida albicans* da American Type Culture Collection (ATCC®) número 90028, como controle positivo. Cepa sabidamente produtora de biofilme.

Os isolados foram identificados pelo sistema automatizado VITEK 2® (BioMérieux).

4.3 Meios de Cultura

O meio utilizado para os testes de microdiluição em caldo foi o RPMI-1640 (com glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol) tamponado em MOPS [ácido 3- (N-morfolino) propanossulfônico]. Os meios utilizados para a semeadura prévia aos ensaios foram o ágar Sabouraud Dextrose (ASD) e o caldo Yeast Peptone Dextrose (YPD) (Anexo 1).

4.4 Drogas antifúngicas

As drogas testadas, Anfotericina B e Voriconazol (Sigma-Aldrich), foram compradas na forma de pó e solubilizadas em DMSO para obtenção de solução estoque. Posteriormente, estas soluções foram diluídas em meio RPMI 1640 (Gibco BRL) para obtenção das concentrações: Anfotericina B de 0,25 a 128 µg/ml e Voriconazol de 0,125 a 16 µg/mL. As diluições das drogas foram distribuídas de modo que 100 µL de cada concentração fossem depositados em poços de placas de microdiluição de 96 poços em concentrações decrescentes.

4.5 Biofilme

4.5.1 Preparo do inóculo

O preparo do inóculo foi realizado segundo Pierce et al. (2008) com algumas modificações. Antes de cada ensaio, os isolados foram cultivados em ASD a 37° C por 24 horas. Com auxílio de alça bacteriológica foram coletadas cerca de 5 colônias (com aproximadamente 1 mm de diâmetro), inoculadas em balão contendo 20mL de caldo YPD e cultivadas em incubadora orbital com 120 rpm a 35°C por 18 horas (*overnight*). Ao fim das 18 horas de crescimento, as células foram submetidas a um processo de lavagem em que a suspensão foi centrifugada durante 5 minutos a 3000 rpm. Após remoção do sobrenadante, as células foram lavadas 2 vezes com PBS (solução salina tamponada) gelado. O “pellet” foi ressuscitado em meio RPMI 1640 pré-aquecido a 37°C de modo a se obter uma suspensão com concentração

final de 1.0×10^6 células/mL, equivalente à densidade óptica (DO) de 0,1, ajustada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm.

4.5.2 Formação de biofilme

A capacidade de inibição de formação de biofilme dos medicamentos testados foi avaliada nos isolados clínicos (Anexo 2). Após o preparo das placas com as drogas a serem testadas, foram colocados 100 μ L do inóculo em microplacas com 96 poços, tendo como controle negativo 200 μ L de RPMI 1640 e como controle positivo a cepa padrão ATCC® 90028. Foram utilizados 32 isolados clínicos nos testes de formação de biofilme. As placas foram seladas e incubadas em estufa a 35°C por 24 horas. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Após o período de incubação, o meio foi aspirado cuidadosamente e os poços foram lavados 3 vezes com 200 μ L de PBS estéril para remover as células não aderidas. As microplacas foram invertidas sobre papel toalha para remover o excesso de líquido, e depois foram deixadas por 20 minutos a temperatura ambiente para secar. A seguir foram colocados 200 μ L do corante safranina a 0,1% por 15 minutos. O corante foi descartado e as placas foram lavadas por imersão em água destilada, e deixadas por 1 hora à temperatura ambiente para secar. Para solubilizar o corante aderido, foram acrescentados 100 μ L de álcool-éter 97% (v/v) e 100 μ L de PBS. A leitura da DO foi realizada em leitor de ELISA (Thermoplate Reader) em comprimento de onda de 492nm. As análises foram feitas em triplicata para cada isolado analisado (Anexos 3 e 4).

4.5.3 Leituras

O ponto de corte para se estabelecer produção de biofilme foi o valor da subtração das leituras da DO do controle positivo (cepa ATCC 90028) pelas leituras da DO dos controles negativos (branco). O branco foi subtraído do valor de todas as amostras testadas, para excluir o a

absorbância do corante safranina. Os isolados que apresentaram valores iguais ou superiores ao valor encontrado após a subtração foram considerados produtores de biofilme; e os que apresentaram valores inferiores foram considerados como não produtores de biofilme. Chamamos de controle o resultado dessa diferença (controle positivo – controle negativo).

4.6 Análise estatística dos dados

Para as análises de inibição de formação de biofilme foram utilizados : Teste de Wilcoxon, teste de Sinais e teste de Mann-Whitney.

O teste não paramétrico de Wilcoxon analisa quantitativamente a produção de biofilme pelas diferentes espécies de *Candida* spp. através da subtração das leituras das DOs do controle positivo (cepa ATCC) das leituras de DOs das demais cepas de *Candida* spp. testadas gerando um escore numérico que permite dizer se um isolado é capaz ou não de formar biofilme comparado ao controle (cepa ATCC). Os escores são valores absolutos ordenados e atribuídos às DOs e classificados do menor para o maior valor, desconsiderando o sinal, a princípio. Posteriormente somam-se os valores dos escores negativos (leituras onde não houve formação de biofilme) com os escores positivos (leituras onde se observou formação de biofilme). Para o teste de Wilcoxon pode-se dizer que houve inibição da formação de biofilme quando os valores referentes a “inibição de biofilme” são superiores os valores referentes a “formação de biofilme” e o resultado é estatisticamente significativo.

Também foi aplicado o Teste de Sinais, que é qualitativo e teve por objetivo mostrar as leituras onde se observou a formação ou não de biofilme por espécie de *Candida* e em cada concentração de droga testada. Para o teste de sinais, valores positivos são aqueles nos quais se observou formação de biofilme e negativos são aqueles em que se observou inibição da formação de biofilme. Pode-se dizer que houve inibição da formação de biofilme quando os valores negativos são superiores aos valores positivos e o resultado é estatisticamente significativo.

Para comparar a produção de biofilme entre as diferentes espécies de *Candida* spp., foi utilizado o teste de Mann-Whitney (Anexos 6 e 7), que se baseia, também, no escores dos valores de DO e compara duas espécies entre si.

5 RESULTADOS

5.1 Ocorrência de candidemia

No período estudado (1º de março de 2010 a 30 de dezembro de 2012) houve 25.490 internações no HUCAM, sendo 632 na UTIN. Nesse período foram diagnosticados 103 casos de candidemia, sendo 9 em neonatos. Para todas as análises realizadas, os valores de incidência de candidemia na UTIN não foram excluídos dos valores do HUCAM, isto é, as incidências mostradas para o HUCAM referem-se a todos os setores do hospital, incluindo a UTIN.

A maior incidência de candidemia nosocomial foi registrada na UTIN do HUCAM, com taxas de 8,6/10.000 pacientes-dia e 14,2/ 1.000 internações enquanto que no HUCAM, em geral, as taxas encontradas foram de 6,9/10.000 pacientes-dia e 4,0/ 1.000 internações. (Figura 1). Apesar do menor número de candidemia em RNs, a incidência de candidemia neste setor foi mais alta que no HUCAM devido ao menor número de internações na UTIN, o que fez com que as incidências se tornassem mais elevadas neste setor (Anexos 4 e 5).

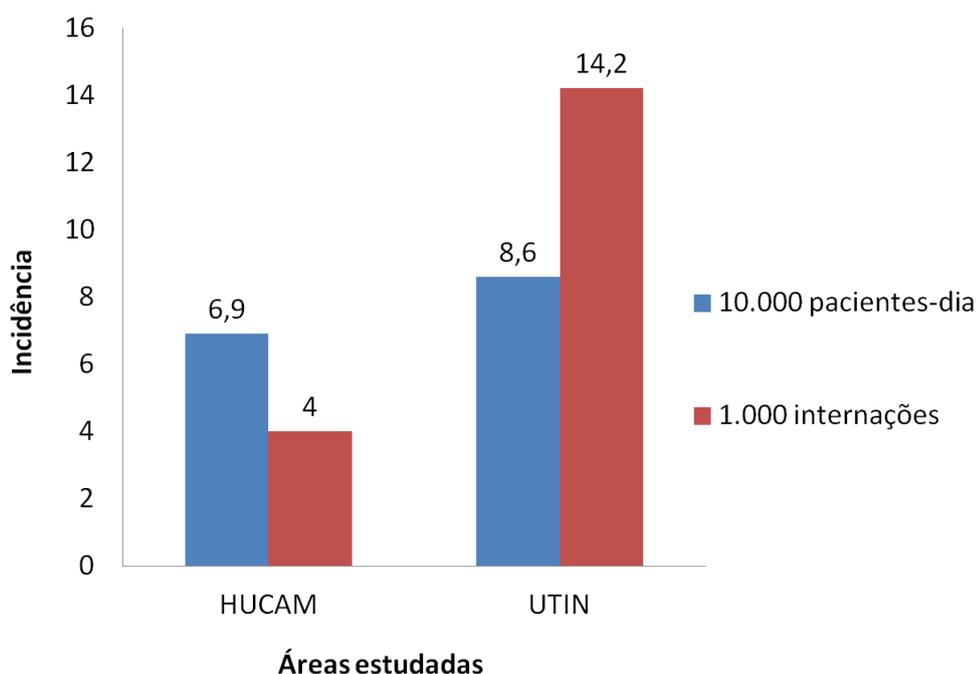


Figura 1 – Taxas de incidência de candidemia na UTIN e no HUCAM por 1.000 internações e 10.000 pacientes-dia

Observa-se nas Figuras 2 e 3 que as mais altas taxas de incidências de candidemia ocorreram no ano de 2011. Pode-se perceber também, que as incidências na UTIN foram maiores que em outros setores do HUCAM nos dois últimos anos estudados. No ano de 2010 não foi registrado caso de candidemia neste setor (UTIN).

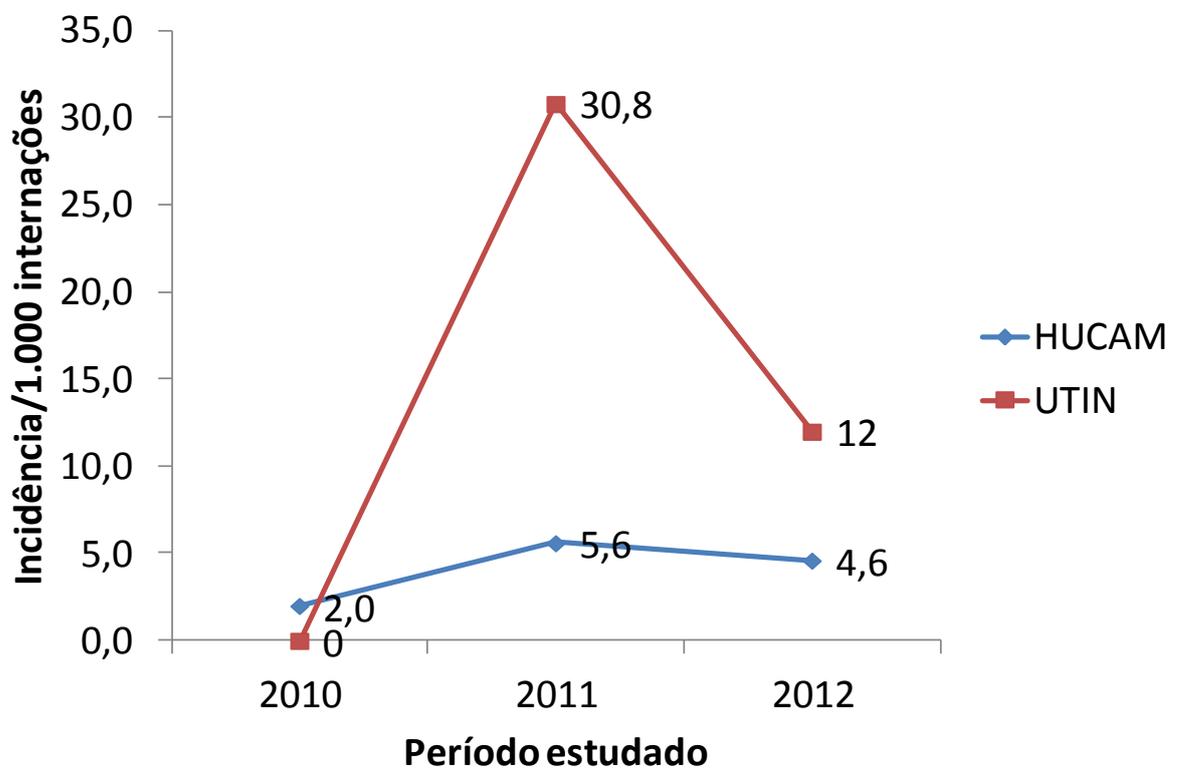


Figura 2 – Taxas de incidência de candidemia na UTIN e no HUCAM por períodos (por 1.000 internações).

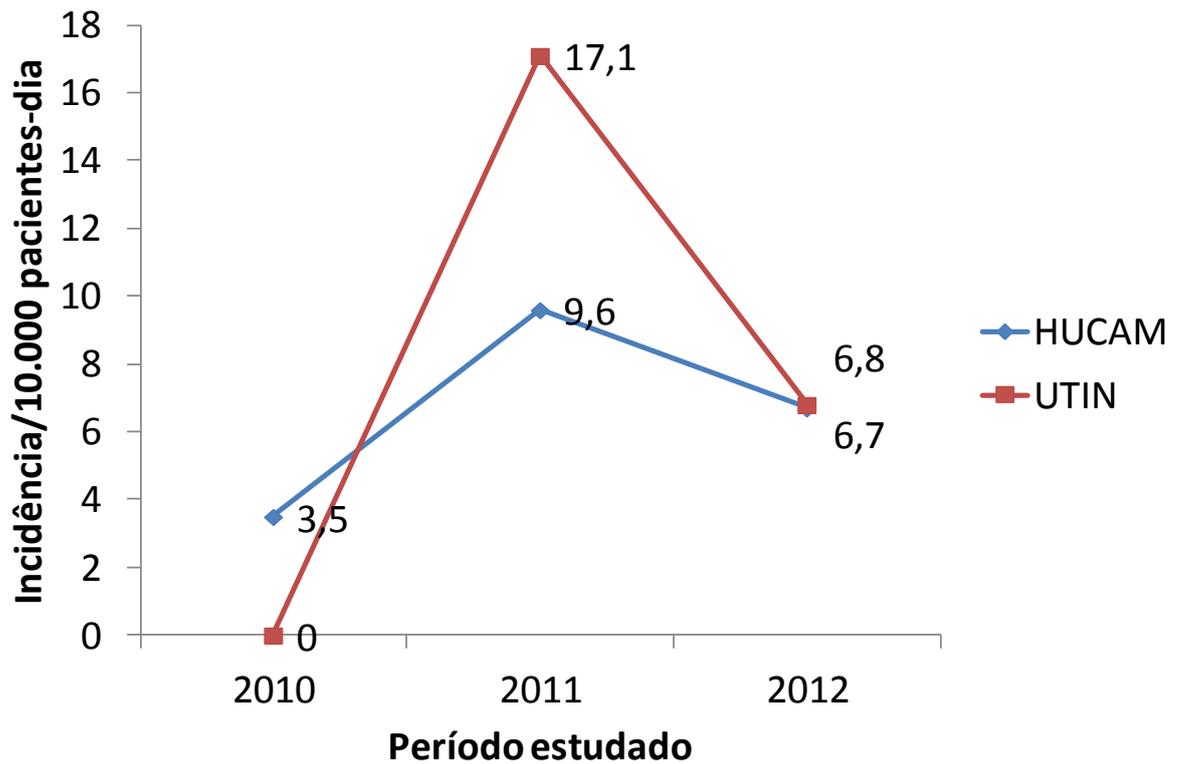


Figura 3 – Taxas de incidência de candidemia na UTIN e no HUCAM por períodos (por 10.000 pacientes-dia).

A Figura 4 evidencia que houve um aumento geral do número de infecções de corrente sanguínea (ICS) também por outros microrganismos, além de *Candida* spp., especialmente no ano de 2011, totalizando 162,6 ICS / 10.000 pacientes-dia e 94,0 ICS / 1.000 admissões.

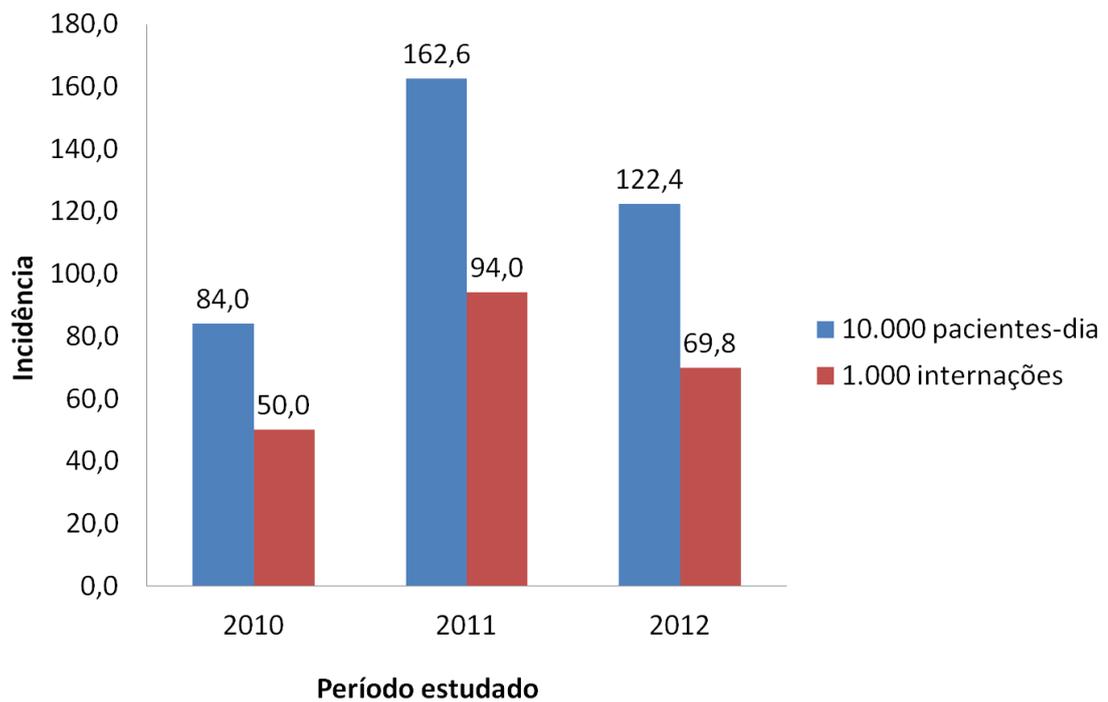


Figura 4 – Taxas de incidência de infecção de corrente sanguínea no HUCAM por 1.000 internações e 10.000 pacientes-dia

Na análise retrospectiva da frequência de infecção de corrente sanguínea por *Candida* spp. no HUCAM desde 2006, pode-se perceber uma tendência de aumento do número de casos, culminando com maiores incidências no ano de 2011 e com redução no ano seguinte, mas, mesmo assim, permanecendo elevadas, acima das incidências observadas entre os anos de 2006 a 2010 (Figura 5).

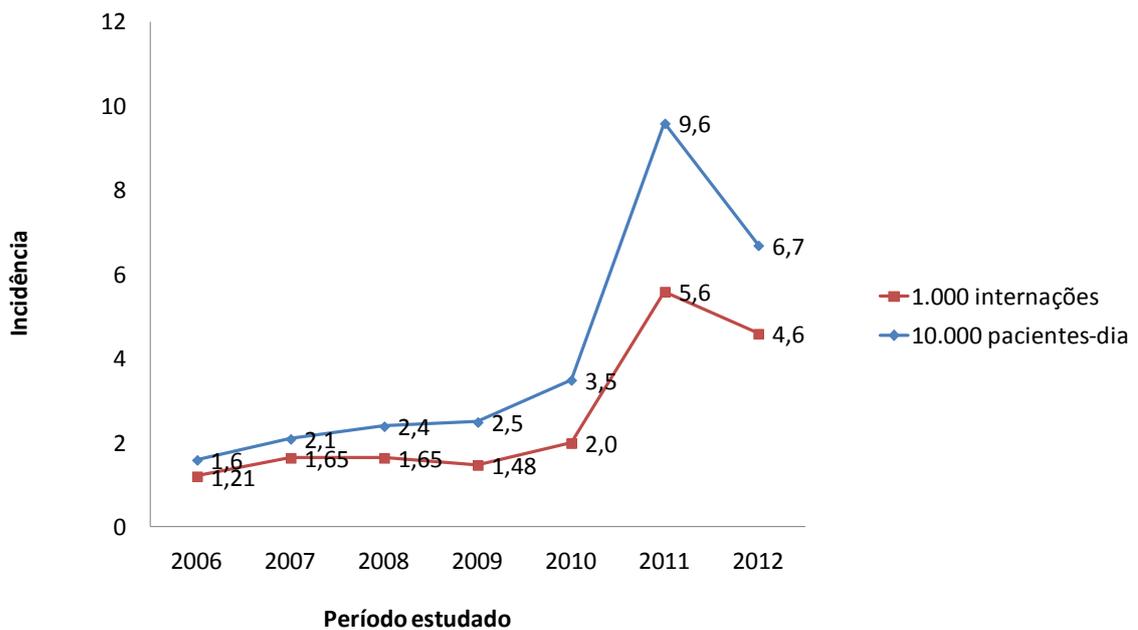


Figura 5 – Taxas de incidência de candidemia na UTIN e no HUCAM por 1.000 internações e 10.000 pacientes-dia no período de 2006 a 2012.

5.2 Etiologia de candidemia

No período estudado, foram detectadas 1.808 hemoculturas positivas no HUCAM e a prevalência de *Candida* spp. foi de 5,7% em relação aos demais microrganismos.

Na UTIN, especificamente, no período em que se realizou o estudo, houve 91 hemoculturas positivas e a representatividade de *Candida* spp. foi de 10%.

Candida spp foi 5º microrganismo mais isolado no HUCAM, no período estudado, sendo precedido por *Staphylococcus aureus* (261), *Staphylococcus epidermidis* (203), *Klebsiella pneumoniae* (134) e *Escherichia coli* (123).

Na UTIN *Candida* spp. foi o segundo microrganismo mais isolado (12), sendo precedido apenas por *Staphylococcus epidermidis* (15).

O número de casos de candidemia no HUCAM devido a *Candida albicans* mostrou pouca oscilação em sua ocorrência e foi menos frequente que os casos atribuídos às espécies não-*albicans* (CNA) em todo o período de estudo: apenas 19% de *C.albicans*, frente a 81% de CNA.

Na UTIN, a frequência de candidemia por *C. albicans* superou a de *C. não-albicans*, 67% e 33%, respectivamente. A única espécie não-*albicans* isolada foi *C. parapsilosis*.

Candida albicans mostrou menor ocorrência apenas no ano de 2010, mantendo-se estável em 2011 e 2012 – foi responsável por 20% das candidemias no HUCAM, neste período. A espécie *Candida parapsilosis*, nos anos de 2010 e 2011 respondeu pela maior parte dos casos de candidemia no HUCAM – 61,1% e 48,9%, respectivamente. No ano de 2012, *Candida tropicalis* foi a principal espécie causadora de candidemia, com 42,5% de ocorrência. *Candida krusei* ocorreu apenas no ano de 2011, com 2,2% dos casos – apenas 1 caso – e , *Candida glabrata* apareceu nos anos de 2011 e 2012, responsável por 4,4% e 2,5% dos casos de candidemia, respectivamente (FIGURA 6).

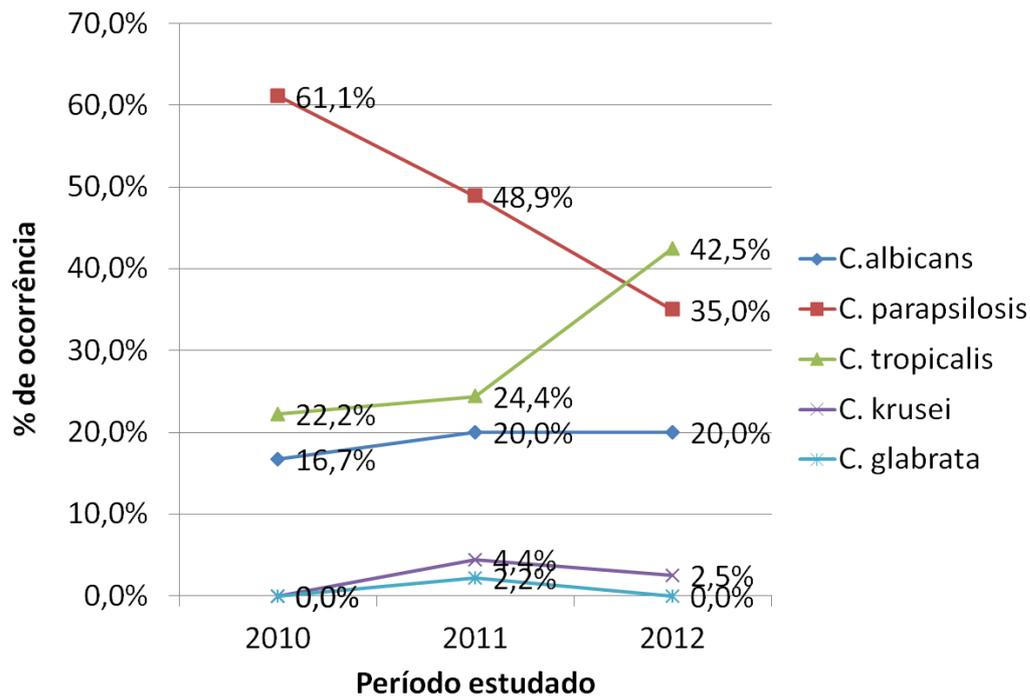


Figura 6 – Percentagem de ocorrência das diferentes espécies de *Candida* no HUCAM no período estudado.

5.3 BIOFILME

5.3.1 Inibição de formação de biofilme

Foram testados os antifúngicos anfotericina B e voriconazol para se avaliar a potencial atividade destas drogas na inibição na formação de biofilme, detectado *in vitro* nos isolados de *Candida* spp.

De acordo com a análise estatística, a anfotericina B apresentou uma relação dose-dependente na inibição de biofilme. A Figura 7 traz uma análise conjunta, com todas as cepas testadas em concentrações extremas de anfotericina B: 128 µg/mL (linha contínua) e 0,5 µg/mL (linha pontilhada). Pode-se perceber, visualmente, que as absorvâncias referentes a 128 µg/mL são

muito menores e menos dispersas que aquelas referentes à concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$, inferindo que a maior concentração de anfotericina B diminuiu a formação do biofilme. .

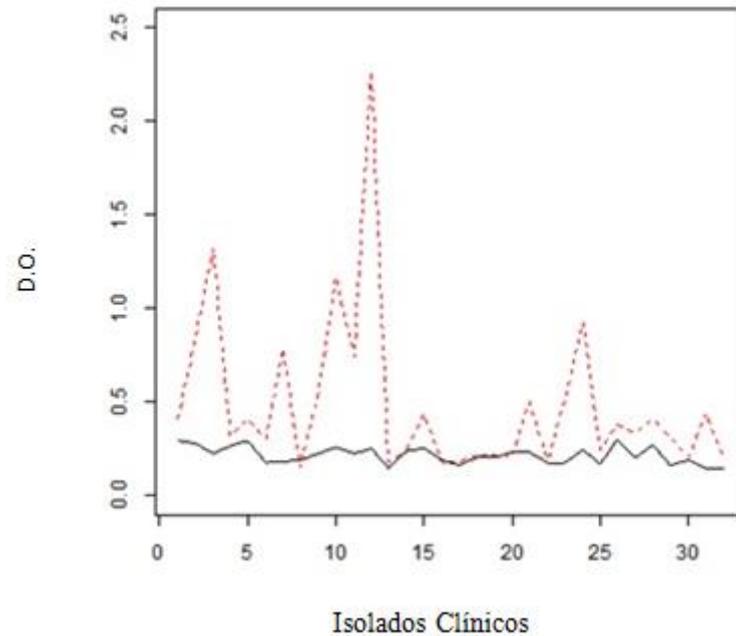


Figura 7 - Leituras de densidades óticas para as concentrações de 128 $\mu\text{g/mL}$ (linha contínua) e de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (linha pontilhada) de anfotericina B.

A atividade do voriconazol diferiu daquela apresentada pela anfotericina B. Não se observou uma resposta dose-dependente na inibição do biofilme por esta droga. A Figura 8 mostra as duas concentrações extremas deste fármaco. As respostas foram praticamente semelhantes, tanto para 16 $\mu\text{g/mL}$ quanto para 0,125 $\mu\text{g/mL}$.

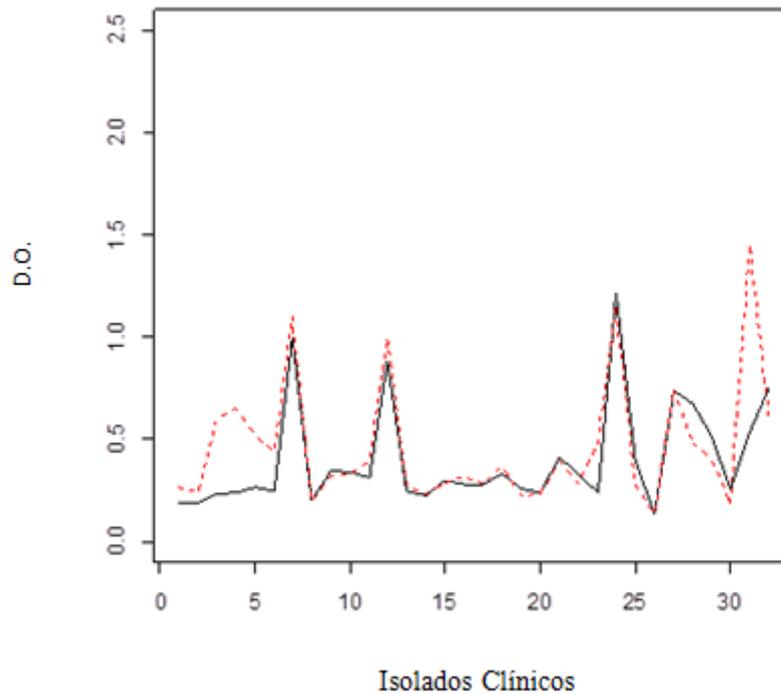


Figura 8 – Leituras de densidades óticas para as concentrações de 16 µg/mL (linha contínua) e de 0,125 µg/mL (linha pontilhada) de voriconazol.

Ao se comparar a produção de biofilme na presença de diferentes concentrações de anfotericina B com a origem do material clínico testado – ponta de cateter, urina ou sangue – pode-se perceber (Figura 9) que nas maiores concentrações a produção de biofilme é mais baixa e à medida que ocorre a diluição da droga observa-se maior produção de biofilme, uma vez que a mediana distancia-se de zero e as observações ganham maior dispersão. Desta forma fica evidente que a droga vai deixando de ser eficiente nas baixas concentrações.

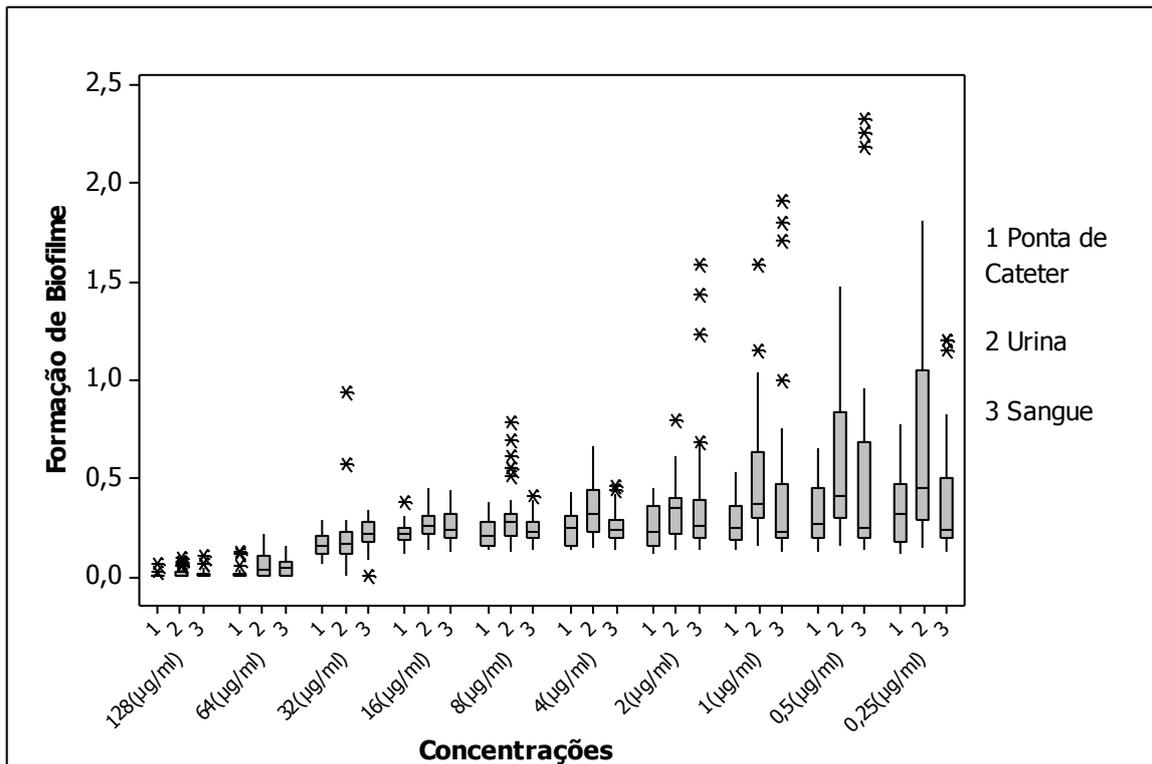


Figura 9 – Formação de biofilme em decrescentes concentrações de anfotericina B, em relação à origem das amostras clínicas.

Até a 4ª concentração testada (16 µg/mL), há indícios de que os isolados de ponta de cateter sofreram maior ação da droga. Analisando a partir da 6ª concentração (4 µg/mL), pode-se perceber a tendência de maior produção de biofilme pelos isolados de urina, o que não pode ser notado nas concentrações de anfotericina .

Ao se proceder a mesma análise para o voriconazol (Figura 10) pode-se perceber que a produção de biofilme diminui gradualmente nas primeiras três concentrações testadas (16 µg/mL, 8 µg/mL e 4 µg/mL) e parece se estabilizar nas concentrações seguintes, uma vez que não há grandes diferenças entre as medianas para as diferentes espécies. Ainda, pode-se perceber que há indícios de que o voriconazol seja mais eficaz para os isolados de ponta de cateter pois a formação de biofilme por esse isolados foi menor em todas as concentrações analisadas. Na concentração 8 µg/mL, por exemplo, mais de 75% das análises de formação de biofilme são menores que a mediana tanto para cepas provenientes do sangue, como urina.

Apresentemente, os isolados do sangue são mais produtoras de biofilme e respondem menos ao voriconazol.

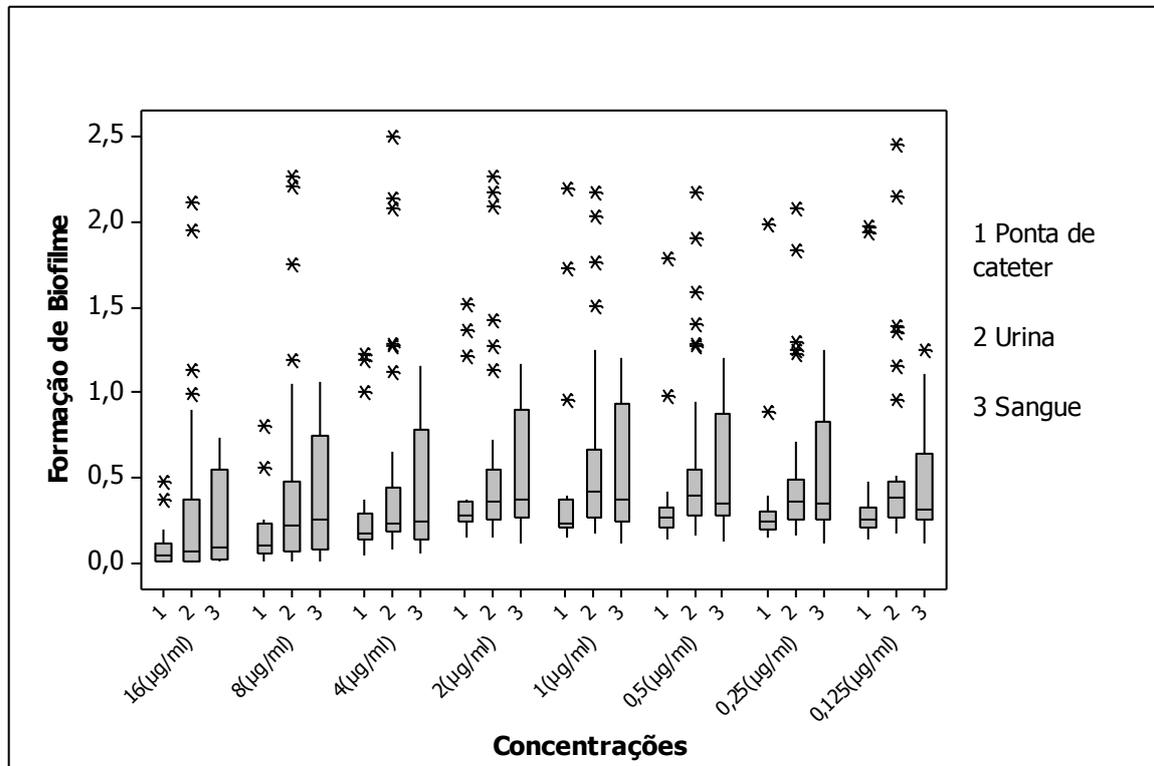


Figura 10 – Formação de biofilme em decrescentes concentrações de voriconazol em relação à origem das amostras clínicas

O teste de Wilcoxon (permite dizer se um isolado é capaz ou não de formar biofilme comparado ao controle) para anfotericina B está demonstrado na Figura 11.

Observa-se que para a primeira concentração – 128 µg/mL – não ocorreu formação de biofilme na maior parte das leituras, para todas as espécies e estas observações foram estatisticamente significativas, exceto para o grupo “outros”.

À medida que a droga é diluída, menor é o número de análises nas quais ocorreu formação de biofilme e observou-se, também, que as espécies responderam de forma individual ao decréscimo na concentração de anfotericina B.

Para *Candida albicans* observou-se inibição de biofilme nas duas primeiras maiores concentrações da droga, sendo que, entre estas, somente para a concentração de 128 µg/mL houve significância ($p < 0,05$). Não se observou nenhuma concentração onde 100% das leituras indicavam formação de biofilme.

Candida tropicalis mostrou perfil de resistência maior partir de 16 µg/ml: 100% dos isolados produziram biofilme ($p < 0,05$).

Candida parapsilosis apresentou um perfil intermediário: 100% dos isolados produziram biofilme ($p < 0,05$), porém isso ocorreu apenas nas duas concentrações mais diluídas (0,5 µg/mL e 0,25 µg/mL) e não em uma concentração considerada alta (16 µg/mL) como ocorreu para *Candida tropicalis*.

Para aquelas espécies agrupadas em “outros”, importante inibição de biofilme foi observada apenas nas duas primeiras maiores concentrações da droga, sendo que, entre estas, somente para a concentração de 64 µg/mL houve significância ($p < 0,05$).

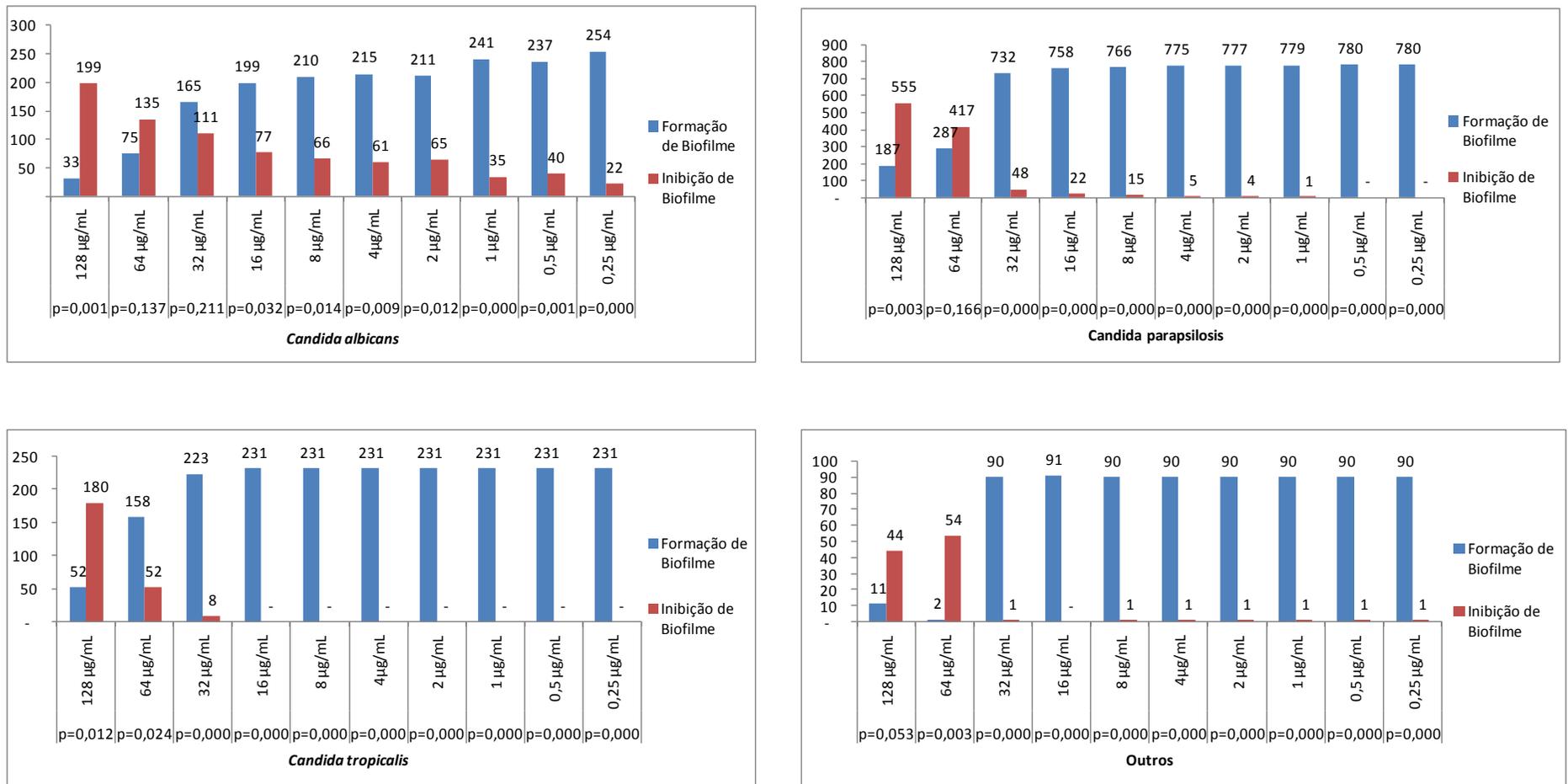


Figura 11 – Aplicação do teste de Wilcoxon na análise da inibição de biofilme para diferentes espécies de *Candida* spp. na presença de anfotericina B.

O teste de sinais para anfotericina B mostrou dados semelhantes àqueles observados para *C. albicans*, *C. tropicalis* e “outros” pelo teste de Wilcoxon.

Tabela 1 – Análise do teste de Sinais para anfotericina B.

Concentração	<i>Candida albicans</i>			<i>Candida parapsilosis</i>			<i>Candida tropicalis</i>			Outros		
	Pos	Neg	p	Pos	Neg	p	Pos	Neg	p-valor	Pos	Neg	p
128 µg/mL	6	15	0,039	9	29	0,001	5	16	0,013	3	7	0,377
64 µg/mL	9	11	0,412	12	25	0,024	13	7	0,132	1	9	0,050
32 µg/mL	14	9	0,202	35	4	0,000	19	2	0,000	12	1	0,000
16 µg/mL	19	4	0,001	38	1	0,000	21	0	0,000	13	0	0,000
8 µg/mL	19	4	0,001	38	1	0,000	21	0	0,000	12	1	0,000
4µg/mL	19	4	0,001	38	1	0,000	21	0	0,000	12	1	0,000
2 µg/mL	19	4	0,001	38	1	0,000	21	0	0,000	12	1	0,000
1 µg/mL	19	4	0,001	38	1	0,000	21	0	0,000	12	1	0,000
0,5 µg/mL	20	3	0,000	39	0	0,000	21	0	0,000	12	1	0,000
0,25 µg/mL	20	3	0,000	39	0	0,000	21	0	0,000	12	1	0,000

Pos: formação de biofilme; Neg: inibição de formação biofilme.

No geral, para o teste de sinais, a anfotericina B foi capaz de inibir formação de biofilme de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* na concentração de 128 µg/ml e para *Candida parapsilosis* e “outros” na concentração de 64 µg/mL.

Pelo teste de Wilcoxon o voriconazol não conseguiu inibir a formação de biofilme em nenhuma concentração da droga, pois não houve nenhum resultado em que o valor referente à inibição de biofilme fosse superior àquele referente à formação de biofilme, com dados de estatisticamente significativos (Fig. 12).

À medida que a concentração da droga é diluída, maior é o número de análises nas quais ocorreram formação de biofilme. Abaixo da concentração de 2 µg/mL todas as espécies testadas mostram formação de biofilme ($p < 0,05$). Resposta diferente daquela encontrada com

anfotericina B, na qual, as espécies demonstraram comportamentos singulares às diferentes concentrações da droga (Figura 12).

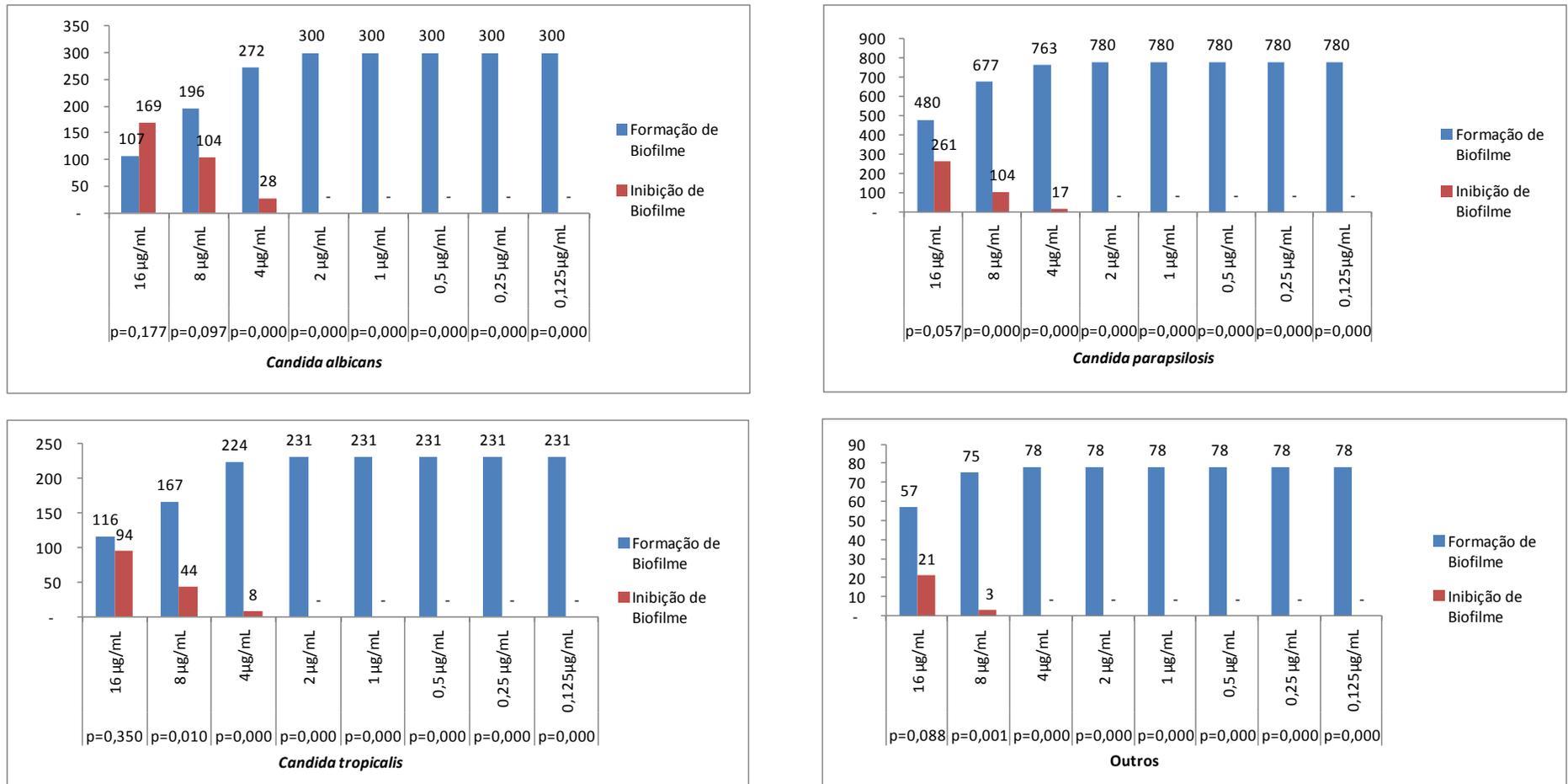


Figura 12 - Análise do teste de Wilcoxon na análise da inibição de biofilme para diferentes espécies de *Candida* spp. na presença de voriconazol.

O teste dos sinais mostra que houve inibição estatisticamente significativa para a primeira concentração de voriconazol (16 µg/mL) para *Candida albicans*. Os valores negativos (referentes à inibição de formação de biofilme) foram superiores aos valores positivos (referentes à formação de biofilme) e esse resultado foi estatisticamente significativo.

Para o teste de sinais e da mesma forma que no teste de Wilcoxon, abaixo da concentração de 2 µg/mL todas as leituras realizadas mostram formação de biofilme ($p < 0,05$) para *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Para as espécies incluídas em “outros” a totalidade das análises com produção de biofilme se iniciou na concentração 4 µg/mL ($p < 0,05$).

Tabela 2 – Análise do teste de Sinais para voriconazol.

Concentração	<i>Candida albicans</i>			<i>Candida parapsilosis</i>			<i>Candida tropicalis</i>			Outros		
	Pos	Neg	p	Pos	Neg	p	Pos	Neg	p	Pos	Neg	p
16 µg/mL	6	17	0,017	19	19	0,564	8	12	0,252	6	6	0,613
8 µg/mL	14	10	0,271	26	13	0,027	13	7	0,132	11	1	0,003
4 µg/mL	17	7	0,320	37	2	0,000	18	3	0,001	12	0	0,000
2 µg/mL	24	0	0,000	39	0	0,000	21	0	0,000	12	0	0,000
1 µg/mL	24	0	0,000	39	0	0,000	21	0	0,000	12	0	0,000
0,5 µg/mL	24	0	0,000	39	0	0,000	21	0	0,000	12	0	0,000
0,25 µg/mL	24	0	0,000	39	0	0,000	21	0	0,000	12	0	0,000
0,125 µg/mL	24	0	0,000	39	0	0,000	21	0	0,000	12	0	0,000

Pos: formação de biofilme; Neg: inibição de formação biofilme.

A análise de Mann-Whitney para anfotericina B mostra que a espécie que mais formou biofilme comparado às demais foi *Candida tropicalis*, em praticamente todas as concentrações testadas. As espécies agrupadas em “outros” foram sempre menos produtoras de biofilme que todas as outras espécies, em todas as concentrações testadas, nas quais houve significância estatística (Tabela 3).

Tabela 3 – Análise do teste de Mann-Whitney para anfotericina B.

Concentração	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida parapsilosis</i>		<i>Candida tropicalis</i>		Outros	
	Resultados	p	Resultados	p	Resultados	p	Resultados	P
128 µg/mL	> <i>C. parapsilosis</i> > Outros	0,046 0,003	> Outros	0,030	> Outros	0,013	-	p> 0,05
64 µg/mL	> <i>C. parapsilosis</i> > Outros	0,05 0,005	-	p> 0,05	> <i>C. parapsilosis</i> > Outros	0,011 0,000	-	p> 0,05
32 µg/mL	-	p> 0,05	-	p> 0,05	> <i>C. parapsilosis</i> > Outros	0,001 0,001	-	p> 0,05
16 µg/mL	-	p> 0,05	-	p> 0,05	> <i>C. parapsilosis</i> > Outros > <i>C. albicans</i>	0,000 0,006 0,005	-	p> 0,05
8 µg/mL	-	p> 0,05	-	p> 0,05	> <i>C. parapsilosis</i> > Outros > <i>C. albicans</i>	0,000 0,001 0,021	-	p> 0,05
4 µg/mL	-	p> 0,05	-	p> 0,05	> <i>C. parapsilosis</i> > Outros	0,000 0,001	-	p> 0,05
2 µg/mL	> Outros	0,049	-	p> 0,05	> <i>C. parapsilosis</i> > Outros > <i>C. albicans</i>	0,038 0,000 0,050	-	p> 0,05
1 µg/mL	-	p> 0,05	-	p> 0,05	> <i>C. parapsilosis</i> > Outros	0,025 0,040	-	p> 0,05

					> <i>C. albicans</i>	0,040		
0,5 µg/mL	> Outros	0,015	> Outros	0,015	> Outros	0,001	-	p> 0,05
					> <i>C. albicans</i>	0,044		
0,25 µg/mL	> Outros	0,011	> Outros	0,006	> Outros	0,002	-	p>0.05

Tabela 4 – Análise do teste de Mann-Whitney para voriconazol.

Concentração	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida parapsilosis</i>		<i>Candida tropicalis</i>		Outros	
	Resultados	p	Resultados	p	Resultados	p	Resultados	p
16 µg/mL	-	p> 0,05	> <i>C. albicans</i>	0,033	-	p> 0,05	> <i>C. albicans</i>	0,003
8 µg/mL	-	p> 0,05	> <i>C. albicans</i>	0,042	-	p> 0,05	> <i>C. albicans</i>	0,008
4 µg/mL	-	p> 0,05	> <i>C. albicans</i>	0,040	-	p> 0,05	> <i>C. albicans</i>	0,014
2 µg/mL	-	p> 0,05	-	p> 0,05	> <i>C. albicans</i>	0,040	> <i>C. albicans</i>	0,009
1 µg/mL	-	p> 0,05	-	p> 0,05	> <i>C. albicans</i>	0,042	> <i>C. albicans</i>	0,026
0,5 µg/mL	-	p> 0,05	-	p> 0,05	-	p> 0,05	-	p> 0,05
0,25 µg/mL	-	p> 0,05	-	p> 0,05	-	p> 0,05	> <i>C. albicans</i>	0,043
0,125 µg/mL	-	p> 0,05	-	p> 0,05	-	p> 0,05	-	p> 0,05

A tabela 4 mostra que, comparada às outras espécies, *Candida albicans* sofreu maior ação do voriconazol, pois foi sempre menos produtora de biofilme, em todas as concentrações testadas.

6 DISCUSSÃO

6.1 Candidemias

A incidência de candidemia no ano de 2010 (2,1/1.000 admissões e 3,4/10.000 pacientes-dia), apesar de alta, se comparada aos anos anteriores é compatível com os dados encontrados em estudos brasileiros, como por Colombo et al. (2006), que apresentaram 2,49 casos de candidemia/1.000 admissões e 3,7 casos/10.000 pacientes-dia, em São Paulo e semelhante também aos dados de Pereira et al. (2010) em estudo conduzido no estado de São Paulo: 2,4 casos/1.000 admissões. Ocorrência maior foi observada por Hinrichsen et al. (2008), em Recife, em que a taxa foi de 3,9/1.000 admissões hospitalares. França et al. (2008) demonstraram menor incidência de candidemia: 1,27/1.000 admissões, assim como Sampaio-Camargo et al. (2010) que, ao estudarem as taxas de candidemia em um hospital terciário de São Paulo, puderam constatar incidências de 0,74 casos/1.000 admissões. De forma geral, a incidência de candidemia no Brasil é mais alta quando comparada a vários países europeus, EUA e Canadá.

Almirante et al. (2005), em um estudo realizado em Barcelona, evidenciaram uma incidência de candidemia de 0,53 casos/1.000 admissões e 0,73 casos/10.000 pacientes-dia, enquanto que, em um estudo mais atual conduzido por Cisterna et al. (2010), ao reunirem dados de 40 hospitais terciários na Espanha, puderam constatar uma taxa de candidemia de 1,09 casos/1.000 admissões. Nos EUA, Gudlaugsson et al. (2003) apresentaram incidências de candidemia de 1,4/10.000 pacientes-dia e 0,53/1.000 admissões. Índices ainda mais baixos foram relatados, na Suíça, por Marchetti et al. (2004): 0,54 casos/10.000 pacientes-dia e 0,36 casos/1.000 admissões.

O ano de 2011, especialmente, foi marcado pelas mais altas taxas de incidências de microrganismos em geral. Ao que tange o estudo de candidemia, pode-se perceber, na série de 7 anos avaliados (2006 a 2012), que em 2011 as incidências foram quase 3 vezes maiores que em 2010. Em 2012, apesar da diminuição da incidência, os valores ainda se mantiveram altos: mais que o dobro da incidência de 2010. Coincidentemente, os períodos de altas incidências

em infecções na corrente sanguínea (ICS), incluindo as candidemias, foram marcados por greve geral dos servidores da UFES (engloba os servidores do HUCAM) que ocorreu de 07 de junho a 26 de setembro de 2011 e de 11 de junho a 24 de agosto de 2012. A greve dos servidores tem como consequência a redução do número de funcionários realmente ativos em sua função, o que classicamente leva à diminuição da adesão das práticas de controle de infecção hospitalar, como, por exemplo, higienização das mãos (Bearman et al., 2006), o que provavelmente levou a maiores incidências de infecções de corrente sanguínea por microrganismos em geral, inclusive por *Candida* spp.

O presente estudo mostrou que *Candida albicans* foi a causa mais comum de candidemia em RNs, em concordância com Xavier et al. (2008), ao estudarem a incidência de candidemia em uma UTIN de um hospital terciário do Mato grosso do Sul.

No período estudado, *Candida* spp. foi o 5º microrganismo mais frequentemente isolado em hemoculturas no HUCAM. Esse dado vem reforçar a importância desse microrganismo como agente causador de ICS.

Nosso estudo reforça a tendência mundial de aumento de CNA na etiologia das candidemias. Espécies de *Candida* não-*albicans* foram responsáveis por 81,1% das candidemias em todo período de estudo. Dado muito semelhante ao estudo brasileiro conduzido por Pereira et al. (2010), que evidenciaram que 82% dos casos de candidemia foram causados por CNA. No HUCAM, *Candida parapsilosis* foi a espécie mais isolada, com ocorrência média de 48,3% no período estudado, sendo que em 2010 chegou a 61,1%. Em seguida destaca-se *Candida tropicalis*, apresentando ocorrência média de 29,7% nos 3 anos de estudo. Foi esta a espécie responsável pelo maior número de candidemias no ano de 2012.

O predomínio de espécies não-*albicans* não ocorre de forma uniforme no mundo, e a distribuição das espécies varia consideravelmente para cada hospital, inclusive no Brasil. Pfaller et al. (2001) tiveram esta constatação ao avaliarem dados de um programa de vigilância (SENTRY) que inclui 74 instituições sentinelas de 22 países.

6.2 Biofilme

Aproximadamente 65% das infecções nosocomiais encontram-se associadas à formação de biofilme sobre dispositivos e materiais médicos, principalmente cateteres, sondas e próteses (Douglas, 2002). A maioria dos materiais invasivos são cateteres percutâneos vasculares, que podem ser removidos facilmente. A remoção de dispositivos médicos mais complexos como implantes, válvulas ou corações artificiais, constitui uma problemática, porque estes implantes têm, geralmente, uma função de suporte de vida. Assim, todos os esforços no sentido de um tratamento bem sucedido e visando a manutenção do dispositivo implantado são urgentemente necessários na prática clínica (Tobudic et al., 2010).

Nós abordamos a formação de biofilme por 32 isolados clínicos de diferentes espécies de *Candida*, todos obtidos de infecções invasivas em RNs. Entre as duas drogas analisadas, anfotericina B mostrou maior atividade de inibição de biofilme. O voriconazol foi incapaz de inibir formação de biofilme por quase todos os isolados testados, mesmo em concentrações mais altas. Shuford et al. (2007) ao analisarem a produção de biofilme por 30 isolados de *Candida* spp. encontraram resultados semelhantes, onde a anfotericina B foi capaz de inibir 90% das atividades metabólicas dos isolados provenientes do sangue, na concentração de 8 µg/ml, ao passo que o voriconazol, mesmo nas maiores concentrações, foi incapaz de inibir formação de biofilme. Contudo, a toxicidade associada à anfotericina limita a terapêutica e a manutenção de altas dosagens séricas do fármaco.

Chatzimoschou et al. (2011) testou um tratamento sequencial de micafungina (concentração 16 vezes maior que a MIC), seguido por voriconazol e constatou que este, não fazia nenhuma diferença na inibição de formação de biofilme, pois o tratamento sequencial foi tão eficaz quanto o tratamento apenas por micafungina. Quando se inverteu a ordem do teste e aplicou-se voriconazol antes da micafungina, a resposta de inibição de formação de biofilme foi menor que aquela apresentada pelo tratamento apenas com micafungina, o que pode comprovar, nas duas situações, a limitada ação do voriconazol na inibição da formação de biofilme.

Ao se correlacionar a inibição de formação de biofilme pela anfotericina B com os isolados provenientes de diferentes sítios anatômicos, pode-se perceber que os isolados oriundos de urina tiveram, aparentemente, maior produção de biofilmes abaixo de 4 µg/ml. Jain et al (2007) ao estudarem a formação de biofilme de isolados provenientes de urina constatou que apenas 30% das cepas produtoras de biofilme apresentaram algum perfil de sensibilidade a anfotericina B.

Para as cepas provenientes de cateter, notavelmente, observou-se que há indícios de melhor resposta nas concentrações mais altas das duas drogas analisadas. E diferentemente do que foi constatado por Shuford et al. (2007) e Valentín et al. (2007) ao testarem, respectivamente anfotericina B e voriconazol em isolados de *Candida* spp., não constataram diferenças de formação de biofilme, independentemente da origem da coleta do material.

No estudo atual, voriconazol foi mais eficiente para *Candida albicans* que para as outras espécies testadas, pois foi capaz de inibir a formação de biofilme na concentração de 16 µg/ml. Isso não ocorreu para nenhuma outra espécie, em nenhuma concentração de voriconazol. Resultado semelhante ao encontrado por Valentín A, et al (2012) que constatou que o pré-tratamento da placa de 96 poços (inserção da droga antes do ensaio de formação de biofilme) foi mais eficaz para *Candida albicans* que para as outras espécies testadas.

Nossos resultados estão de acordo com outros estudos que mostram pouca ou nenhuma atividade de voriconazol sobre biofilme de *Candida* spp (Douglas J. L., 2003; Lewis et al., 2002).

Anfotericina B inibiu a formação de biofilme na concentração de 128 µg/ml para *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* e na concentração de 64 µg/ml para as espécies agrupadas em “outros”. Contudo, pelo perfil de resposta à droga, *C. albicans* parece ter sofrido maior ação da anfotericina B, seguida por *Candida parapsilosis* e, em sequência,

Candida tropicalis. Esses dados são semelhantes aos apresentados por Kuhn et al. (2002) que demonstrou que biofilmes formados por *C. parapsilosis* pareceram ser menos inibidos que aqueles formados por *Candida albicans*, apesar de serem considerados menos complexos e formar menor quantidade de matriz extracelular. Este mesmo autor destacou a resistência de biofilmes formados por *C. albicans* e *C. parapsilosis* sob a ação do voriconazol.

Desde 2000 tem havido importantes mudanças na prescrição de drogas antifúngicas para pacientes hospitalizados. Embora anfotericina B ainda seja considerada a droga padrão estes casos de terapia antifúngica, estudos têm mostrado que formulações lipídicas de anfotericina B, voriconazol e equinocandinas estão substituindo a anfotericina B tradicional (desoxicolato) por serem drogas mais seguras, com muito menos efeitos colaterais (Prasad et al., 2008).

O uso de fluconazol é atrativo para tratamento de candidemias por ter excelente biodisponibilidade e boa tolerância e também porque a ocorrência de resistência de *C. albicans* a esta droga é menor que 1%. O voriconazol, derivado sintético do fluconazol, apresenta maior espectro de ação que fluconazol e pode ser ativo contra isolados de *Candida* spp resistentes a fluconazol (Chowdhry e Marshall, 2008). Esta droga seria uma interessante escolha terapêutica para candidemias causadas por espécies não-*albicans*, sabidamente menos responsivas ao fluconazol. E neste estudo, observamos importante predomínio de espécies não-*albicans* na etiologia das candidemias do HUCAM.

É conhecida a resistência de células sésseis de espécies de *Candida* quando presentes em biofilme. Equinocandinas, a nova classe de antifúngicos que inibem a 1,3-D-glucan synthase, enzima envolvida na síntese da parede celular fúngica, tem mostrado atividade contra biofilme de *Candida*. No entanto, há estudos que mostram que este efeito é espécie-dependente. De acordo com Choi et al. (2007) as equinocandinas caspofungina e micafungina foram ativas contra biofilme formado por *Candida albicans* ou *C. glabrata*, mas não sobre aqueles formados por *C. tropicalis* ou *C. parapsilosis*. Resultados semelhantes foram encontrados por Quindós et al (2009).

7 CONCLUSÕES

Candida spp continua sendo um importante patógeno nosocomial. Foi o quinto microrganismo mais isolado de ICS no HUCAM, precedido por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*.

Foi o segundo patógeno mais isolado na UTIN, precedido apenas por *Staphylococcus epidermidis*

A análise retrospectiva mostrou oscilações nas incidências de ICS por *Candida* spp. O maior número ocorreu no ano de 2011, com redução no ano seguinte, mas, mesmo assim, permanecendo elevado, acima das incidências observadas entre os anos de 2006 a 2010;

A espécie *Candida albicans* teve prevalências baixas e estáveis no HUCAM, durante o período estudado, com média de 19% em relação a espécies não-*albicans*.

Na UTIN, a frequência de candidemia por *C. albicans* superou a de *C. não-albicans*, 67% e 33%, respectivamente. A única espécie não-*albicans* isolada foi *C. parapsilosis*.

No geral, anfotericina B foi mais efetivo na inibição de formação de biofilme por espécies de *Candida* do que voriconazol.

A espécie *Candida parapsilosis* respondeu pela maior parte dos casos de candidemia no HUCAM: 61,1% e 48,9%, nos anos de 2010 e 2011, respectivamente. No ano de 2012, *Candida tropicalis* foi a principal espécie causadora de candidemia e correspondeu a 42,5% das ocorrências;

Candida albicans foi a espécie mais sensível às drogas testadas. Foi observada inibição na formação de biofilme ($p < 0,05$) por anfotericina B e, em relação ao voriconazol, houve necessidade da maior concentração desta droga para inibir a formação de biofilme por esta espécie. Observou-se, entretanto, que voriconazol não foi capaz de inibir formação de biofilme para nenhuma outra espécie que não fosse *Candida albicans*.

Candida tropicalis foi a espécie com perfil de maior resistência. Foi vista inibição na formação de biofilme, apenas na maior concentração de anfotericina B ($p < 0,05$) e não foi vista inibição com voriconazol.

Relacionando a origem de coleta do material clínico e o efeito de inibição de biofilme da anfotericina B e do voriconazol pode-se inferir que os isolados provenientes de ponta de cateter foram mais responsivos a ambas as drogas e que aqueles provenientes de urina foram mais resistentes a anfotericina B.

9 REFERÊNCIAS

Akpan A.; Morgan R. *Oral candidiasis*. Postgraduate Med J, v. 78, p.455-459, 2002.

Al-Fattani M. A.; Douglas L. J. *Biofilm matrix of Candida albicans and Candida tropicalis: chemical composition and role in drug resistance*. J Med Microbiology, v.55 (8), p.999–1008, 2006.

Almirante B., et al. *Epidemiology and predictors of mortality in cases of Candida bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003*. J Clin Microbiol, v.43(4), p. 1829-35, 2005.

Alonso-Valle H., et al. *Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology and factors influencing mortality*. Eur J Microbiol Infect Dis, v.22(4), p.254-7, 2003.

Andes D. *In vivo pharmacodynamics of antifungal drugs in treatment of candidiasis*. Antimicrob Agents Chemother, v.47, p.1179- 1186, 2003.

Aquino V. R., et al. *Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in southern Brazil*. Braz J Infect Dis, v.9(5), p.411-8. 2005.

Armstrong-James D. *Invasive Candida species infection: the importance of adequate empirical antifungal therapy*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v.60, p.459–460, 2007.

Asmundsdottir LR; Erlendsdottir H.; Gottfredsoon M. *Increasing incidence of candidemia: results from a 20-year nationwide study in Iceland.* J Clin Microbiol, v.40(9), p. 3489-92, 2002.

Baillie G. S.; Douglas L. J. *Matrix polymers of Candida biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents.* J Antimicrob Chemother, v. 46, p. 397–403, 2000.

Banerjee S. N., et al. *Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. National Nosocomial Infection Surveillance System.* Am J Med, v.91 (3B), p.86-89, 1991.

Bassetti M., et al. *Epidemiology trends in nosocomial candidemia in intensive care.* BMC Infect Dis, v.10, p.6-21, 2006.

Bearman G. M., et al. *Infection control and the prevention of nosocomial infections in the intensive care unit.* Semin Respir Crit Care Med, v.27(3), p.310-24, 2006.

Becker J. M. et al. *Pathway analysis of Candida albicans survival and virulence determinants in a murine infection model.* PNAS, v.107(51), p.22044-22049, 2010.

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.

Benjamin Jr D. K. et al. *Neonatal Candidiasis: Epidemiology, Risk Factors, and Clinical Judgment.* PEDIATRICS, v.126(4), p. 865-873, 2010.

Blankenship JR, Mitchell AP. *How to build a biofilm: a fungal perspective*. Current Opinion in Microbiology, v. 9, p.588-594, 2006.

Bliss J. M., et al. *Candida Virulence Properties and Adverse Clinical Outcomes in Neonatal Candidiasis*. The Journal of Pediatrics, v.161(3), p.441-447, 2012.

Blot S. I., et al. *Effects of nosocomial candidemia on outcomes of critically ill patients*. Am J Med, v.113(6), p.480-5, 2002.

Blyth C. C., Palasanthiran P., O'Brien T. A. *Antifungal Therapy in Children With Invasive Fungal Infections: A Systematic Review*. Pediatrics, v.119(4), p. 772-784, 2007.

Bonfietti L. X. et al. *Ten-Year Study of Species Distribution and Antifungal Susceptibilities of Candida Bloodstream Isolates at a Brazilian Tertiary Hospital*. Mycopathologia, v.174, p.389-396, 2013.

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.

Chandra J., Mukherjee P. K., Leidich S. D. *Antifungal resistance of Candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro*. J Dent Res, v.80, p.903-908, 2001.

Chang M.R., et al. *Surveillance of pediatric infections in a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil*. Braz J Infect Dis, v.7(2), p.140-60, 2003.

Chatizmoschou A. et al. *Activities of Triazole-Echinocandin Combinations against Candida Species in Biofilms and as Planktonic Cells*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.55(5), p. 1968-1974, 2011.

Chowdhry R.; Marshall W. L. *Antifungal Therapies in the Intensive Care Unit*. *Journal of Intensive Care Medicine*, v. 23(3), 2008.

Cisterna R, et al. *Nationwide Sentinel Surveillance of Bloodstream Candida Infections in 40 Tertiary Care Hospital in Spain*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.48(11), p.4200-4206, 2010.

Clerihew L. et al. *Invasive fungal infection in very low birthweight infants: national prospective surveillance study*. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*, v. 91, p.188–192, 2006.

Colombo A. L., et al. *Suceptibility profile of 200 blodstream isolates of Candida spp. collected from brazialian tertiary care hospitals*. *Med Mycol*, v.41 (3), p.235-9, 2003.

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.

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.

Costerton J. W., Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM *Microbial biofilms*. *Annu Rev Microbiol*, v.49, p.711-745, 2003.

Cotter G, Kavanagh K. *Adherence mechanisms of Candida albicans*. Br J Biomed Sci, v. 57, p. 241-249, 2000.

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.

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

Douglas L. J. *Medical importance of biofilms in Candida infections*. Rev Iberoam Micol, v. 19, p.139-143, 2002.

Douglas J. L. *Candida biofilms and their role in infection*. Trends in Microbiology, v. 1(11), 2003.

Edwards J. E. JR. *Candida species*. In Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious disease/Gerald L Mandell, John E Bennett, Raphael Dolin – 5. Ed – Pennsylvania: Churchill Livingstone, 2000.

Eggimann P.; Garbino J.; Pittet D. *Epidemiology of Candida species infections in critically ill non-immunosuppressed patients*. Lancet Infect Dis, v.3(11), p. 685-702, 2003.

Estivil D. et al. *Biofilm formation by five species of Candida on three clinical materials*. Journal of Microbiological Methods, v.86, p. 238-242, 2011.

Ferreira J. A. G. et al. *Biofilm formation and effect of caspofungin on biofilm structure of Candida species bloodstream isolates*. Antimicrob Agents Chemother, v.53, p. 4377–4384, 2009.

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.

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.

Gabrielson J., et al. *Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates*. J Microbiol Methods, v.50, p.63–73, 2002.

Green C.B., et al. *RT-PCR detection of Candida albicans ALS gene expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model biofilms*. Microbiology, v. 150, p. 267-275, 2004.

Gudlaugsson O., et al. *Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited*. Clin Infect Dis, v.37 (9), p. 1172-7, 2003.

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.

Jain N. et al. *Biofilm Formation by and Antifungal Susceptibility of Candida Isolates from Urine*. Applied and Environmental microbiology, v. Mar., p. 1697–1703, 2007.

Keller, L.; Surette, M. G. *Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective*. Nat. Rev. Microbiol. 2006; 4, 249–258.

Kelly M. T., et al. *The Candida albicans CaACE2 gene affects morphogenesis, adherence and virulence*. Mol Microbiol, v.53, p. 969-983, 2004.

Kohli V. et al. *Voriconazole in Newborns*. Indian pediatrics, v.45, p. 236-238, 2008.

Kojic, E.M., Darouiche, R.O. *Candida infections of medical devices*. Clin. Microbiol. Rev. v.17, p.255–267, 2004.

Kuhn D. M. et al. *Antifungal Susceptibility of Candida Biofilms: Unique Efficacy of Amphotericin B Lipid Formulations and Echinocandins*. Antimicrobial Agents and Chromotherapy, v. 46(6), p.1773-1780, 2002.

Kumamoto C. A.; Vences M. D. *Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to Candida albicans virulence*. Cell Microbiol, v. 7, p. 1546- 1554, 2005.

Lee C. M. et al. *Report of Taiwan nosocomial infections surveillance system (TNIS), 2009*. Infection Control Journal, v. 21(3), p. 195–201, 2011.

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

Marchetti O. et al. *Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000*. Clin Infect Dis, v. 8(3), p. 311-20, 2004.

Marra A. R. et al. *Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Hospitals: Analysis of 2,563 Cases from Prospective Nationwide Surveillance Study*. Journal of Clinical Microbiology, v. 49(5), p. 1866-1871, 2011.

Matta D. A. et al. *Antifungal susceptibility of 1000 Candida bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v. 57, p. 399-404, 2007.

Matta D. A. et al. *Multilocus sequence typing of sequential Candida albicans isolates from patients with persistent or recurrent fungemia*. Medical Mycology, p. 1-6, 2009.

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

Miranda L. N. et al. *Candida parapsilosis candidemia in neonatal unit over 7 years: a case series study*. BMJ Open, v. 0, e000992, 2012.

Moran C. et al. *Candida albicans and Non-albicans Bloodstream Infections in Adult and Pediatric Patients: Comparison of Mortality and Costs*. Pediatric Infectious Disease Journal, v. 28(5), p. 433-435, 2009.

Morschhauser J. *Regulation of white-opaque switching in Candida albicans*. Med Microbiol Immunol, v. 199, p. 165-172, 2010.

Naglik J, Albrecht A, Bader O, Hube B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. Cell Microbiol, v. 6, p. 915 – 926, 2004.

Nailis H. et al. *Transcriptional response to fluconazole and amphotericin B in Candida albicans biofilms*. Research in Microbiology, p. 1-9, 2010.

Negri M. et al. *Insights into Candida tropicalis nosocomial infections and virulence factors*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, v. 31, p. 1399-1412, 2012.

O'brien J., et al. *Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity*. Eur J Biochem 2000; 267: 5421–5426.

Oeser C. et al. *The Epidemiology of Neonatal and Pediatric Candidemia in England and Wales, 2000-2009*. The Pediatric Infectious Disease Journal, v. 32(1), p. 23-26, 2013.

Ortega M. et al. *Candida species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008*. Journal of Hospital Infection, v. 77, p. 157-161, 2011.

Pappas P. G., et al. *Guidelines for treatments of candidiasis*. Clin Infect Dis, v. 38(2), p. 161-89, 2004.

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

Peeters E.; Nelis H. J.; Coenye T. *Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates*. J Microb Methods, v. 72, p. 157-165, 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.

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 fluconazol, ravuconazol and voriconazol of isolates collectd from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program*. *Clin Microbiol*, v. 39(9), p. 3254-9, 2001.

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.

Pierce C. G., et al. *A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing*. *Nat Protoc*, v. 3(9), p. 1494-1500, 2008.

Poikonen E., et al. *Candidemia in Finland, 1995-1999*. *Emerg Infec Dis*, v. 9(8), p. 985-90, 2003.

Prasad P. A. et al. *Pediatric Antifungal Utilization New Drugs, New Trends*. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 27(12), 2008.

Quindós G. et al. *Actividad de la micafungina contra las biopelículas de Candida*. *Rev Iberoam Micol*, v. 26(1), p. 49-55, 2009.

Ramage G. et al. *The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in Candida albicans*. FEMS Microbiology Letters, v. 214, p.95-100, 2002.

Ramage G., et al. The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. FEMS Microbiol Lett, v. 214, p. 95-100, 2002.

Rex, J. H. et al. *Practice guidelines for the treatment of candidiasis*. Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis, v. 30 (4), p. 662-78, 2000.

Ricardo E. et al. *Candida krusei reservoir in a neutropaenia unit: molecular evidence of a foe?* Clinical Microbiology and Infectious Diseases, v. 17(2), p. 259-263, 2011.

Rinaldi M. G. *Biology and Pathogenicity of Candida species*. In *Candidiasis: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment*/Gerald Bodey – 2nd – New York: ed Raven Press, 1993.

Saiman L., et al. *Risk factors for candidemia in Neonatal Intensive Care Unit patients*. The National Epidemiology of Mycosis Survey study group. Pediatr Infect Dis J, v. 19(4), p. 319-24, 2000.

Sampaio-Camargo T. Z. et al. *Secular trends of candidemia in a tertiary care hospital*. American Journal of Infection Control, v. 38, p. 546-551, 2010.

Sandven P., et al. *Candidemia in Norway (1991 to 2003): results from a nationwide study*. J Clin Microbiol, v. 44(6), p.1977–1981, 2006.

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

Schuster M., et al. *Novel Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing inhibitors identified in an ultra-high-throughput screen*. Antimicrob Agents Ch, v. 50, p. 3674–3679, 2012.

Shchepin R., et al. *Quorum sensing in Candida albicans: probing farnesol mode of action with 40 natural and synthetic farnesol analogs*. Chem Biol, v.10, p. 743– 750, 2003.

Shuford J. A. et al. *In vitro biofilm characterization and activity of antifungal agents alone and in combination against sessile and planktonic clinical Candida albicans isolates*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v. 57, p. 277-281, 2007.

Solé D.; Carvalho B. T. *Mecanismo de Defesa Contra Infecções*. In *Infectologia Pediátrica/Calik Kairalla Farhat...[et al.]* – 2.ed. – São Paulo: Editora Atheneu, 1998.

Soll DR. *Why does Candida albicans switch?* FEMS Yeast Res, v 9, p. 973-989, 2009.

Staab J.F., et al. *Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of Candida albicans Hwp1*. Science, v. 283, p. 1535-1538, 1999.

Standar K., et al. *Setup of an in vitro test system for basic studies on biofilm behavior of mixed- species cultures with dental and periodontal pathogens*. PLoS ONE, v. 5(10), p. 131-135, 2010.

Stepanovic' s, et al. *Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci*. APMIS, v. 115, p. 891–899, 2007.

Sudberry P.; Gow N.; Berman J. *The distinct morphogenic states of Candida albicans*. Trends in Microbiology, v.12 (7), p. 317-324, 2004.

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.

Tobudic S. et al. *In vitro activity of antifungal combinations against Candida albicans biofilms*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 65, p. 271-274, 2010.

Tumbarello M. et al. *Risk Factors and Outcomes of Candidemia Cused by Biofilm-Forming Isolates in a Tertiary Care Hospital*. Plos One, v. 7(3), e33705, 2012.

Uppuluri P., et al. *Dispersion as an important step in the Candida albicans biofilm developmental cycle*. PLoS Pathogens, v. 6 (3), 2010.

Valenti'n A. et al. *Actividad in vitro de la anfotericina B y la anidulafungina sobre biopelículas de Candida albicans y Candida tropicalis*. Rev Iberoam Micol, v. 24, p. 272-27, 2007.

Valenti'n A. et al. *Voriconazole inhibits biofilm formation in different species of the genus Candida*. J Antimicrob Chemother; v. 67, p. 2418–2423, 2012.

Voss A. et al. *Occurrence of yeast bloodstream infections between 1987 and 1995 in five Dutch university hospitals*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, v. 15, p. 909–12, 1996.

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.

Williams D.; Lewis M. *Pathogenesis and treatment of oral candidosis*. J Oral Microb, v. 3, p. 5771, 2011.

Wisplinghof F H., et al. *Nosocomial bloodstream infections in the US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study*. Clin Infect Dis, v. 39, p. 309-7, 1980.

Wissing H. et al. *Intensive care unit-related fluconazole use in Spain and Germany: patient characteristics and outcomes of a prospective multicenter longitudinal observational study*. Infection and Drug Resistance, v. 6, p. 15-25, 2013.

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.

Xu L.; LI H.; Vuong C., et al. *Role of the luxS quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of Staphylococcus epidermidis*. Infect Immun, v. 74, p. 488–496, ANO.

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.

Zilberberg, M. D.; Shorr, A. F.; Kollef, M. H. *Secular trends in candidemia-related hospitalization in the United States, 2000–2005*. *Infect. Control Hosp. Epidemiol*, v. 29, p, 978–980, ANO.

9 ANEXOS

Anexo 1 – Meios de cultura e reagentes utilizados

1) Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) com cloranfenicol (Difco)

ASD65g

Água destilada q.s.p.....1L

- O meio é pesado de acordo com a determinação do fabricante (para preparo de 1 litro de meio) e levado ao micro-ondas para fundir o ágar;
- Após homogeneização o meio é esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 minutos e distribuído em placas de Petri estéreis. As placas são armazenadas em geladeira a uma temperatura entre 2-5°C.

3) Meio RPMI -1640 (Sigma-Aldrich)

RPMI 1640 com glutamina e sem bicarbonato de sódio10,4g

Água destilada1L

- O meio é solubilizado em água destilada, sob agitação com barra magnética, sem aquecimento; o pH é ajustado para 7,0 com tampão MOPS (0,165 M);
- A solução é esterilizada por filtração em membrana com poro de 0,22µm de diâmetro (Millipore) e conservada em frasco estéril em geladeira a uma temperatura entre 2-5°C.

4) YPD

Peptona 20g

Dextrose 20g

Extrato de levedura 10g

Água destilada1L

- Os constituintes são dissolvidos em 1 litro de água destilada sob agitação e com aquecimento. Após ajuste do pH para $6,5 \pm 0,2$, o meio é esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 minutos e armazenado em geladeira a uma temperatura entre $2-5^\circ\text{C}$.

5) Tampão PBS 0,2M

- Preparar as soluções A e B
- Solução A: Fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0,2M \rightarrow 2,76 g/100mL de água destilada.
- Solução B: Fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0,2M \rightarrow 5,365 g/ 100 mL de água destilada.

Solução A14mL

Solução B 36mL

NaCl8,5 g

Água destilada q.s.p1L

- Os constituintes são misturados sob agitação e o pH ajustado para 7.2. A solução é esterilizada em autoclave a 121°C durante 15 minutos e armazenada em geladeira a uma temperatura entre 2-5°C.

Anexo 2 – Média dos valores de leitura da D.O. dos testes de inibição de formação de biofilme por anfotericina B.

Isolado de <i>Candida</i>	DO									
	128 µg/ mL	64 µg/ mL	32 µg/ mL	16 µg/ mL	8 µg/ mL	4 µg/ mL	2 µg/ mL	1 µg/ mL	0,5 µg/ mL	0,25 µg/ mL
7347	0,294	0,296	0,292	0,301	0,396	0,450	0,394	0,527	0,413	0,478
6951	0,279	0,290	0,266	0,330	0,279	0,373	0,435	0,558	0,829	1,033
8440	0,225	0,238	0,240	0,311	0,278	0,344	0,399	0,976	1,321	1,635
4116	0,264	0,265	0,248	0,284	0,281	0,307	0,324	0,384	0,322	0,357
7421	0,294	0,296	0,292	0,301	0,396	0,450	0,394	0,527	0,413	0,478
T302	0,173	0,171	0,175	0,221	0,258	0,232	0,226	0,266	0,299	0,414
643	0,182	0,214	0,192	0,200	0,242	0,258	0,343	0,494	0,787	0,763
HI565	0,185	0,164	0,141	0,162	0,139	0,146	0,131	0,150	0,150	0,144
545	0,225	0,229	0,209	0,232	0,236	0,309	0,370	0,494	0,559	0,608
659	0,261	0,219	0,260	0,267	0,424	0,422	0,511	1,063	1,168	1,209
676	0,224	0,205	0,216	0,224	0,213	0,254	0,630	0,679	0,741	0,570
AP436	0,249	0,278	0,301	0,334	0,304	0,393	1,419	1,809	2,260	1,185
536	0,148	0,136	0,202	0,176	0,162	0,159	0,161	0,154	0,173	0,144
10964	0,235	0,206	0,208	0,209	0,191	0,222	0,201	0,243	0,234	0,243
AP145	0,248	0,202	0,217	0,196	0,219	0,217	0,215	0,471	0,437	0,219
4799	0,185	0,144	0,180	0,138	0,137	0,150	0,139	0,157	0,175	0,163
477	0,163	0,184	0,167	0,166	0,146	0,187	0,156	0,177	0,180	0,164
510	0,205	0,264	0,295	0,298	0,260	0,286	0,266	0,256	0,217	0,200
511	0,203	0,259	0,259	0,269	0,293	0,249	0,277	0,220	0,219	0,183
7220	0,229	0,264	0,246	0,229	0,206	0,214	0,203	0,211	0,212	0,230
104	0,228	0,190	0,231	0,239	0,215	0,239	0,232	0,336	0,498	0,723
6833	0,174	0,198	0,278	0,275	0,169	0,197	0,177	0,190	0,188	0,190
6645	0,171	0,169	0,144	0,160	0,157	0,166	0,170	0,282	0,517	0,441
1384	0,247	0,296	0,523	0,328	0,529	0,380	0,447	0,497	0,922	1,168

9698	0,168	0,221	0,177	0,191	0,437	0,451	0,446	0,425	0,240	0,220
552	0,302	0,324	0,307	0,425	0,394	0,431	0,438	0,359	0,374	0,398
613	0,205	0,193	0,190	0,220	0,243	0,268	0,280	0,247	0,330	0,364
680	0,273	0,283	0,265	0,264	0,312	0,284	0,316	0,343	0,410	0,351
T81	0,163	0,216	0,271	0,321	0,314	0,358	0,327	0,357	0,309	0,320
6871	0,186	0,177	0,161	0,191	0,189	0,186	0,182	0,186	0,200	0,199
660	0,148	0,181	0,280	0,298	0,375	0,407	0,374	0,352	0,438	0,490
AP100	0,142	0,107	0,176	0,189	0,144	0,173	0,181	0,198	0,193	0,209

Anexo 3 – Média dos valores de leitura da D.O. dos testes de inibição de formação de biofilme por voriconazol.

Isolado de <i>Candida</i>	DO							
	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0,5 µg/mL	0,25 µg/mL	0,125 µg/mL
7347	0,193	0,192	0,226	0,250	0,249	0,253	0,272	0,262
6951	0,182	0,167	0,213	0,234	0,243	0,275	0,284	0,237
8440	0,229	0,232	0,240	0,292	0,267	0,331	0,373	0,590
4116	0,239	0,245	0,243	0,296	0,275	0,327	0,365	0,650
7421	0,266	0,269	0,261	0,294	0,318	0,362	0,361	0,521
T302	0,245	0,245	0,243	0,272	0,324	0,348	0,327	0,438
643	0,998	1,065	1,118	1,038	1,072	1,072	1,090	1,099
HI565	0,197	0,192	0,201	0,203	0,185	0,192	0,188	0,198
545	0,344	0,411	0,380	0,324	0,342	0,341	0,335	0,318
659	0,339	0,451	0,321	0,430	0,491	0,507	0,405	0,328
676	0,311	0,350	0,355	0,479	0,452	0,400	0,440	0,389
AP436	0,882	0,924	0,929	0,904	0,939	0,935	0,945	0,990
536	0,243	0,256	0,258	0,263	0,247	0,272	0,260	0,270
10964	0,224	0,242	0,206	0,215	0,209	0,243	0,202	0,233
AP145	0,298	0,333	0,306	0,349	0,318	0,357	0,291	0,283
4799	0,277	0,252	0,245	0,283	0,367	0,325	0,290	0,320
477	0,278	0,282	0,276	0,286	0,260	0,258	0,247	0,275
510	0,330	0,366	0,372	0,414	0,483	0,341	0,376	0,364
511	0,257	0,321	0,210	0,227	0,252	0,242	0,248	0,222
7220	0,236	0,222	0,210	0,230	0,213	0,250	0,226	0,232
104	0,409	0,447	0,460	0,485	0,620	0,501	0,415	0,393
6833	0,327	0,368	0,250	0,317	0,342	0,306	0,262	0,284
6645	0,241	0,101	0,395	0,396	0,557	0,489	0,461	0,484

1384	1,215	1,245	1,247	1,272	1,398	1,311	1,252	1,153
9698	0,400	0,371	0,313	0,290	0,274	0,487	0,303	0,268
552	0,132	0,124	0,151	0,137	0,152	0,148	0,135	0,139
613	0,736	0,983	0,979	1,046	1,023	0,998	1,037	0,738
680	0,672	0,666	0,526	0,501	0,550	0,512	0,461	0,479
T81	0,502	0,624	0,559	0,592	0,729	0,529	0,621	0,396
6871	0,251	0,242	0,232	0,243	0,203	0,188	0,215	0,183
660	0,534	0,710	1,064	1,360	1,619	1,032	1,020	1,455
AP100	0,751	0,788	0,787	0,774	0,720	0,699	0,627	0,608

Anexo 4 – Incidência de candidemia no HUCAM.

<i>Candida spp.</i>	HUCAM			Soma/Média total dos Anos
	2010	2011	2012	
<i>C. albicans</i>	3	9	8	20
<i>C. parapsilosis</i>	11	22	14	47
<i>C. tropicalis</i>	4	11	17	32
<i>C. guilliermondii</i>	0	1	0	1
<i>C. krusei</i>	0	2	1	3
Total	18	45	40	103
Internação	8.766	8.053	8.671	25490
Incidência/ 1.000 internações	2,1	5,6	4,6	4,1
Paciente-Dia	51.947	46.986	59.411	52781,3
Incidência/ 10.000 Pacientes-Dia	3,5	9,6	6,7	6,6
% de <i>C. albicans</i>	17%	20%	20%	19%
% de CNA	83%	80%	80%	81%

Anexo 5 – Incidência de candidemia na UTIN

<i>Candida spp.</i>	UTIN			Soma/Média total dos Anos
	2010	2011	2012	
<i>C. albicans</i>	0	3	3	6
<i>C. parapsilosis</i>	0	3	0	3
<i>C. tropicalis</i>	0	0	0	0
<i>C. guilliermondii</i>	0	0	0	0
<i>C. krusei</i>	0	0	0	0
Total	0	6	3	9
Internação	187	195	250	632
Incidência/ 1.000 internações	0	30,8	12	14,3
Paciente-Dia	2.928	3.502	4.423	3617,7
Incidência/ 10.000 Pacientes-Dia	0	17,1	6,8	8,0
% de <i>C. albicans</i>	0	50%	100%	67%
% de CNA	0	50%	0	33%

Anexo 7 - Resultados dos testes de Mann-Whitney para a droga Anfotericina B.

Concentração	Espécie	Média dos ranques	p valor
128 µg/mL	<i>C. albicans</i>	36,54	0,046
	<i>C. parapsilosis</i>	28,53	
	<i>C. albicans</i>	21,37	0,003
	Outros	11,54	
	<i>C. parapsilosis</i>	28,17	0,030
	Outros	18,96	
	<i>C. tropicalis</i>	19,81	0,013
	Outros	12,08	
64 µg/mL	<i>C. albicans</i>	35,83	0,050
	<i>C. parapsilosis</i>	28,08	
	<i>C. albicans</i>	21,17	0,005
	Outros	11,92	
	<i>C. parapsilosis</i>	26,22	0,011
	<i>C. tropicalis</i>	36,83	
	<i>C. tropicalis</i>	21,24	0,000
	Outros	9,58	
32 µg/mL	<i>C. parapsilosis</i>	25,36	0,001
	<i>C. tropicalis</i>	40,05	
	<i>C. tropicalis</i>	20,76	0,001
	Outros	10,42	
16 µg/mL	<i>C. albicans</i>	17,83	0,005
	<i>C. tropicalis</i>	27,62	
	<i>C. parapsilosis</i>	25,09	0,000
	<i>C. tropicalis</i>	40,55	
	<i>C. tropicalis</i>	20,12	0,006
	Outros	11,54	
8 µg/mL	<i>C. albicans</i>	18,74	0,021
	<i>C. tropicalis</i>	26,62	
	<i>C. parapsilosis</i>	24,51	0,000
	<i>C. tropicalis</i>	41,62	
	<i>C. tropicalis</i>	20,79	0,001
	Outros	10,38	
4 µg/mL	<i>C. parapsilosis</i>	24,59	0,000
	<i>C. tropicalis</i>	41,48	
	<i>C. tropicalis</i>	20,90	0,001
	Outros	10,17	
2 µg/mL	<i>C. albicans</i>	19,43	0,050
	<i>C. tropicalis</i>	25,86	

	<i>C. albicans</i>	20,09	
	Outros	14,00	0,049
	<i>C. parapsilosis</i>	27,56	
	<i>C. tropicalis</i>	35,95	0,038
	<i>C. tropicalis</i>	21,40	
	Outros	9,29	0,000
	<i>C. albicans</i>	19,26	
	<i>C. tropicalis</i>	26,05	0,040
1 µg/mL	<i>C. parapsilosis</i>	27,26	
	<i>C. tropicalis</i>	36,52	0,025
	<i>C. tropicalis</i>	20,31	
	Outros	11,21	0,004
	<i>C. albicans</i>	19,33	
	<i>C. tropicalis</i>	25,98	0,044
	<i>C. albicans</i>	20,70	
	Outros	12,83	0,015
0,5 µg/mL	<i>C. parapsilosis</i>	28,49	
	Outros	17,92	0,015
	<i>C. tropicalis</i>	20,69	
	Outros	10,54	0,001
	<i>C. albicans</i>	20,85	
	Outros	12,54	0,011
	<i>C. parapsilosis</i>	28,90	
	Outros	16,58	0,006
0,25 µg/mL	<i>C. tropicalis</i>	20,57	
	Outros	10,75	0,002

Anexo 8 - Resultados dos testes de Mann-Whitney para a droga Voriconazol.

Concentração	Espécie	Média dos ranques	p valor
16 µg/mL	<i>C. albicans</i>	15,21	0,003
	Outros	25,08	
	<i>C. albicans</i>	26,58	0,033
	<i>C. parapsilosis</i>	35,33	
8 µg/mL	<i>C. albicans</i>	15,54	0,008
	Outros	24,42	
	<i>C. albicans</i>	26,92	0,042
	<i>C. parapsilosis</i>	35,13	
4 µg/mL	<i>C. albicans</i>	15,77	0,014
	Outros	23,96	
	<i>C. albicans</i>	26,83	0,040
	<i>C. parapsilosis</i>	35,18	
2 µg/mL	<i>C. albicans</i>	15,58	0,009
	Outros	24,33	
	<i>C. albicans</i>	19,79	0,040
	<i>C. tropicalis</i>	26,67	
1 µg/mL	<i>C. albicans</i>	16,08	0,026
	Outros	23,33	
	<i>C. albicans</i>	19,83	0,042
	<i>C. tropicalis</i>	26,62	
0,5 µg/mL	<i>C. albicans</i>	16,35	0,043
	Outros	22,79	