



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**RELAÇÃO ENTRE A SUSCETIBILIDADE DE *Candida*  
spp A ANFOTERICINA B, COM ÓBITO OU  
SOBREVIVÊNCIA DOS PACIENTES EM EPISÓDIOS DE  
CANDIDEMIA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Everton Boff**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2007**

**RELAÇÃO ENTRE A SUSCETIBILIDADE DE *Candida* spp A  
ANFOTERICINA B, COM ÓBITO OU SOBREVIVÊNCIA DOS  
PACIENTES EM EPISÓDIOS DE CANDIDEMIA**

**por**

**Everton Boff**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

**Orientador: Prof. Dr. Sydney Hartz Alves**

Santa Maria, RS, Brasil  
2007

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**RELAÇÃO ENTRE A SUSCETIBILIDADE DE *Candida spp* A  
ANFOTERICINA B, COM ÓBITO OU SOBREVIVÊNCIA DOS  
PACIENTES EM EPISÓDIOS DE CANDIDEMIA**

elaborada por  
**Everton Boff**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Prof. Sydney Hartz Alves, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

---

**Prof. Janio Moraes Santurio, Dr. (UFSM)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Rosmari Hörner, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

Santa Maria, 22 de janeiro de 2007.

Dedico esta conquista  
aos meus pais  
*Vilson e Dulce Boff*  
pelo apoio, desprendimento,  
esforço conjunto e dedicação.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ser esta força e energia que nos ilumina sempre, por me dar esta capacidade de realizar este trabalho e de me cercar de pessoas maravilhosas que constantemente ajudam em muito a construir em mim um profissional melhor e uma pessoa melhor.

Aos meus pais, Vilson e Dulce, pelo amor, carinho, compreensão, auxílio, apoio, paciência, incentivo e desprendimento para que eu pudesse semanalmente estar ausente da família e da empresa; por me ensinarem que na vida tudo depende apenas de nós mesmos e que nunca vencemos sozinhos e devemos sempre saber valorizar isso.

Aos meus irmãos, Anderson e Tatiane, pelo incentivo, apoio e auxílio; por estarem sempre presente em minha vida.

A UFSM – Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade oferecida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Sydney Hartz Alves, pela acolhida, orientação, estímulo constante, paciência, desprendimento e oportunidade de um maior desenvolvimento e crescimento intelectual e profissional.

A todos os colegas do mestrado, que passaram a ser grandes amigos desde o início desta jornada, muito obrigado pela construção conjunta que realizamos no dia-a-dia de mais esta etapa de nossas vidas.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo apoio, cobranças e incentivos que foram constantes e me auxiliaram muito na construção de minha vida acadêmica.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelos ensinamentos nos repassados e pela amizade forte e sólida construída no decorrer de minha formação.

A UDESC – Universidade do Estado de Santa Catarina, nas pessoas do Prof. Antonio Waldimir Leopoldino da Silva – Diretor Geral do Centro Educacional do Oeste e Prof<sup>ra</sup>. Bernadette Kreutz Erdtmann – Coordenadora do Curso de Enfermagem, pelo apoio, incentivo e adaptação de horários, possibilitando desta forma manter o vínculo com a instituição.

A todas as pessoas que de uma forma ou de outra estiveram envolvidas ou presentes durante esta caminhada, meu agradecimento pela força, carinho, conforto e todas palavras que me fortaleceram para seguir em frente, apesar do cansaço das viagens semanais e de uma jornada tripla de trabalhos e mestrado, a todos vocês meu **Muito Obrigado!**

**Mudaram as estações  
E nada mudou  
Mas eu sei que alguma coisa aconteceu  
Está tudo assim tão diferente  
Se lembra quando a gente  
Chegou um dia a acreditar  
Que tudo era pra sempre  
Sem saber que o 'pra sempre'  
Sempre acaba...**

**Renato Russo**

## RESUMO

### Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria

### **RELAÇÃO ENTRE A SUSCETIBILIDADE DE *Candida* spp A ANFOTERICINA B, COM ÓBITO OU SOBREVIVÊNCIA DOS PACIENTES EM EPISÓDIOS DE CANDIDEMIA**

**AUTOR: EVERTON BOFF**

**ORIENTADOR: SYDNEY HARTZ ALVES**

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 22 de janeiro de 2007.

Dentre as infecções fúngicas, aquelas provocadas por *Candida* spp são as mais recorrentes, sendo as candidemias a forma mais emergente, cujo tratamento mais utilizado tem sido à base de anfotericina B, apesar das falhas terapêuticas a esse poliênico. Devido a tais falhas, os testes de avaliação da suscetibilidade de fungos a agentes antifúngicos passam a ter grande importância para confirmar a suscetibilidade aos agentes antifúngicos usados. Neste estudo foram avaliadas 144 isolados de *Candida* spp, oriundas de pacientes imunodeprimidos que evoluíram ao óbito ou que sobreviveram aos episódios de candidemia. Os testes foram realizados de acordo com os procedimentos e meios de cultura descritos no documento M27-A2 do atual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Testou-se também os meios Yeast Nitrogen Base dextrosado (YNBd) e Antibiotic Medium 3 (AM3) sendo utilizado um número maior de concentrações de anfotericina B. Os valores de suscetibilidade das cepas provenientes dos pacientes que evoluíram ao óbito foram significativamente maiores que os valores obtidos dos pacientes que sobreviveram a candidemia quando os meios utilizados foram o Antibiotic Medium 3 (AM3) e o YNBd, nos quais encontrou-se valores médios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) igual a 0,5 µg/dL e valores de Concentração Fungicida Mínima (CFM) igual a 0,7 µg/dL para pacientes que sobreviveram a candidemia; valores médios de CIM igual a 0,6 µg/dL e de CFM igual a 0,9 µg/dL foram encontrados nas cepas dos pacientes que evoluíram ao óbito. Com o meio de cultura RPMI 1640 não foram observadas diferenças significativas nos valores de suscetibilidade entre os dois grupos de pacientes.

Palavras-chave: Anfotericina B, Candidemia, Suscetibilidade.



## ABSTRACT

### Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria

#### RELATIONSHIP BETWEEN SUSCEPTIBILITY OF *Candida* spp ISOLATES TO AMPHOTERICIN B, AND DEATH OR SURVIVAL OF PATIENTS ON CANDIDAEMIA EPISODES

AUTOR: EVERTON BOFF

ORIENTADOR: SYDNEY HARTZ ALVES

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 22 de janeiro de 2007.

Among fungal infections, those caused by *Candida* spp are the most recurrent. Candidaemias are the most emergent and amphotericin B has been the mainstay of therapy in spite of its therapeutic failures. Because of these limitations, susceptibility testing of fungi against antifungal agents has been evidencing a great importance in order to confirm susceptibility to the used antifungal agents. In this study, 144 *Candida* spp isolates from immunocompromised patients, that either evolved into death (Group 1) or survived to candidaemia episodes (Group 2), were assessed. Tests were made according to proceedings and culture media described on M27-A2 document currently provided by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Media such as Yeast Nitrogen Base- dextrose (YNBd) and Antibiotic Medium were also tested, being used a higher number of Amphotericin B concentrations. Susceptibility values of strains from Group 1 were significantly higher than Group 2 when Antibiotic Medium 3 (AM3) and YNBd were used. The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Fungicidal Concentration (MFC) media values for strains from patients that survived to candidaemia were, respectively, 0.5 µg/dL and 0.7 µg/dL; whereas MIC and MFC media values for strains from patients that evolved into death were, respectively, 0.6 µg/dL and 0.9 µg/dL. Significant differences were not observed between the two groups of strains when using RPMI 1640 medium.

Keywords: Anphotericin B, Candidaemia, Susceptibility.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

QUADRO 1 – Distribuição das espécies de <i>Candida</i> isoladas de episódios de Candidemia, em vários continentes .....	23
FIGURA 1 – Anfotericina B .....	25
QUADRO 2 – Casos de insucesso terapêutico com antibióticos poliênicos, com posterior comprovação da resistência de espécies de <i>Candida</i> a estes agentes .....	29

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Variação da suscetibilidade de <i>Candida albicans</i> a anfotericina B, utilizando-se o meio RPMI 1640 para isolados de pacientes que evoluíram ao óbito, em três hospitais do Rio Grande do Sul .....	45
TABELA 2 – Variação da suscetibilidade de <i>Candida não-albicans</i> a anfotericina B, utilizando-se o meio RPMI 1640 para isolados de pacientes que evoluíram ao óbito, em três hospitais do Rio Grande do Sul .....	46
TABELA 3 – Variação da suscetibilidade de <i>Candida albicans</i> a anfotericina B, utilizando-se o meio RPMI 1640 para isolados de pacientes que sobreviveram, em três hospitais do Rio Grande do Sul .....	46
TABELA 4 – Variação da suscetibilidade de <i>Candida não-albicans</i> a anfotericina B, utilizando-se o meio RPMI 1640 para isolados de pacientes que sobreviveram, em três hospitais do Rio Grande do Sul .....	46
TABELA 5 – Variação da suscetibilidade de <i>Candida albicans</i> a anfotericina B, utilizando-se o meio AM3 para isolados de pacientes que evoluíram ao óbito, em três hospitais do Rio Grande do Sul .....	49
TABELA 6 – Variação da suscetibilidade de <i>Candida não-albicans</i> a anfotericina B, utilizando-se o meio AM3 para isolados de pacientes que evoluíram ao óbito, em três hospitais do Rio Grande do Sul .....	49
TABELA 7 – Variação da suscetibilidade de <i>Candida albicans</i> a anfotericina B, utilizando-se o meio AM3 para isolados de pacientes que sobreviveram, em três hospitais do Rio Grande do Sul .....	49
TABELA 8 – Variação da suscetibilidade de <i>Candida não-albicans</i> a anfotericina B, utilizando-se o meio AM3 para isolados de pacientes que sobreviveram, em três hospitais do Rio Grande do Sul .....	50
TABELA 9 – Variação da suscetibilidade de <i>Candida albicans</i> a anfotericina B, utilizando-se o meio YNB-dextrose para isolados de pacientes que evoluíram ao óbito, em três hospitais do Rio Grande do Sul .....	52

TABELA 10 – Variação da suscetibilidade de <i>Candida não-albicans</i> a anfotericina B, utilizando-se o meio YNB-dextrose para isolados de pacientes que evoluíram ao óbito, em três hospitais do Rio Grande do Sul .....	52
TABELA 11 – Variação da suscetibilidade de <i>Candida albicans</i> a anfotericina B, utilizando-se o meio YNB-dextrose para isolados de pacientes que sobreviveram, em três hospitais do Rio Grande do Sul .....	53
TABELA 12 – Variação da suscetibilidade de <i>Candida não-albicans</i> a anfotericina B, utilizando-se o meio YNB-dextrose para isolados de pacientes que sobreviveram, em três hospitais do Rio Grande do Sul .....	53
TABELA 13 – Variação na suscetibilidade (CIMs e CFMs) de <i>Candida spp</i> a anfotericina B em função do meio utilizado nos testes, frente a isolados de candidemia, em três hospitais do Rio Grande do Sul .....	55
TABELA 14 – Comparações da suscetibilidade (CIMs e CFMs) de <i>Candida spp</i> a anfotericina B, em função do meio utilizado nos testes, frente a isolados de pacientes que sobreviveram ou não, a episódios de candidemia, em três hospitais do Rio Grande do Sul .....	56
TABELA 15 – Variação das médias aritméticas (desvio padrão), faixa de variação e médias geométricas das CIMs e CFMs a anfotericina B obtidas por 3 meios de cultura, para <i>Candida spp.</i> isoladas de pacientes que evoluíram ao óbito ou sobreviveram a episódios de candidemias .....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM3 (Antibiotic Médium 3)

ASD (Ágar Sabouraud Dextrose)

ATP (Adenosina Tri-Fosfato)

CFM (Concentração Fungicida Mínima)

CIM (Concentração Inibitória Mínima)

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)

CMCC (Candidíase Mucocutânea Crônica)

DNA (Ácido Desoxirribonucléico)

HCPA (Hospital de Clínicas de Porto Alegre)

HUSM (Hospital Universitário de Santa Maria)

MOPS (Ácido Morfolinopropanosulfônico)

NCCLS (National Commitee for Clinical Laboratory Standards)

NINSS (Nosocomial Infection National Surveillance Service)

ns (Não Significativo)

NYS (New York State)

ob (Óbito)

SCPA (Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre)

SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)

UFC (Unidade Formadora de Colônia)

UFSM (Universidade Federal de Santa Maria)

YNB (Yeast Nitrogen Base)

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	10
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	11
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	13
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>1.1 Objetivos</b> .....	19
1.1.1 Objetivo geral .....	19
1.1.2 Objetivos específicos .....	19
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	21
<b>2.1 Leveduras do gênero <i>Candida</i></b> .....	21
<b>2.2 Candidíases e candidemias</b> .....	22
<b>2.3 Drogas antifúngicas</b> .....	24
<b>2.4 Antifúngicos poliênicos</b> .....	25
2.4.1 Mecanismo de ação dos antifúngicos poliênicos .....	26
2.4.2 Evolução da resistência a anfotericina B .....	27
2.4.3 Mecanismo de resistência dos antifúngicos poliênicos .....	30
2.4.4 Testes de suscetibilidade e avaliação da resistência .....	32
2.4.4.1 Outros métodos .....	34
2.4.5 Problemas com testes de suscetibilidade a anfotericina B .....	34
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	36
<b>3.1 Microorganismos</b> .....	36
<b>3.2 Conservação</b> .....	36
<b>3.3 Formação dos grupos de microorganismos</b> .....	37
<b>3.4 Meios de cultura</b> .....	37
3.4.1 Ágar Sabouraud dextrose (ASD) .....	37
3.4.2 Antibiotic Médium 3 (AM3) .....	37
3.4.2.1 Composição .....	37

3.4.2.2 Preparação .....	38
3.4.3 Caldo RPMI 1640 tamponado suplementado .....	38
3.4.3.1 Composição .....	38
3.4.3.2 Preparação .....	39
3.4.4 Caldo Yeast Nitrogen base suplementado com dextrose .....	40
3.4.4.1 Composição (10X) .....	40
3.4.4.2 Preparação .....	40
<b>3.5 Testes de suscetibilidade</b> .....	40
3.5.1 Determinação CIM .....	41
3.5.1.1 Preparação das concentrações de anfotericina B .....	41
3.5.1.2 Ativação dos inóculos .....	42
3.5.1.3 Preparação do inoculo .....	42
3.5.1.4 Execução da prova .....	43
3.5.1.5 Leitura dos testes e determinação das CIMs .....	43
3.5.2 Determinação da CFM .....	44
<b>3.6 Análise estatística</b> .....	44
<b>4 RESULTADOS</b> .....	45
<b>4.1 Comparação das variações na suscetibilidade de <i>Candida</i> spp isoladas de pacientes que evoluíram ao óbito ou sobreviveram a candidemias, com base em testes empregando o Caldo RPMI 1640</b> .....	45
<b>4.2 Variações na suscetibilidade de <i>Candida</i> spp isoladas de pacientes que evoluíram ao óbito ou sobreviveram a candidemias, com base em testes empregando Caldo AM3</b> .....	48
<b>4.3 Comparação das variações na suscetibilidade de <i>Candida</i> spp isoladas de pacientes que evoluíram ao óbito ou sobreviveram a candidemias, com base em testes empregando o Caldo YNB-dextrase</b> .....	51
<b>4.4 Comparação entre os diferentes meios de cultura utilizados para a avaliação da suscetibilidade de <i>Candida</i> spp isoladas de episódios de candidemia a anfotericina B, em três hospitais do Rio Grande do Sul</b> .....	55
<b>5 DISCUSÃO</b> .....	59
<b>5.1 Avaliação da suscetibilidade utilizando-se o Caldo RPMI 1640</b> .....	61

<b>5.2 Avaliação da suscetibilidade utilizando-se o Caldo AM3 .....</b>	<b>62</b>
<b>5.3 Avaliação da suscetibilidade utilizando-se o Caldo YNB-dextrose .....</b>	<b>62</b>
<b>5.4 Avaliação da suscetibilidade com base nos CFMs .....</b>	<b>63</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>66</b>



# 1 INTRODUÇÃO

O conceito de fungo patogênico e de fungo oportunista é vinculado às micoses sistêmicas (RIPPON, 1982). Assim, apenas pequeno número de fungos é considerado patogênico, isto é, capaz de invadir tecidos sadios, se multiplicar e provocar dano tecidual no hospedeiro imunocompetente (GUDLAGSSON *et al*, 2003).

Ao contrário, fungos oportunistas são aqueles que causam doença apenas quando um ou mais dos sistemas de defesa estão alterados. Tais fungos são quase sempre cosmopolitas, de distribuição universal e pertencentes a inúmeros gêneros e espécies (GUDLAGSSON *et al*, 2003).

Fungos oportunistas são a causa de infecção com risco de vida em um número crescente de pacientes imunodeprimidos. A resistência intrínseca à terapia antifúngica observada para alguns gêneros e o desenvolvimento de resistência durante o tratamento em outros gêneros, está se tornando o maior problema no tratamento dessas doenças (PEREA & PATTERSON, 2002).

O desenvolvimento das pesquisas no campo da micologia demonstra um alarmante aumento na frequência de infecções fúngicas oportunistas, particularmente aquelas causadas por *Candida* spp. A candidíase é a principal infecção micótica oportunista do homem (REYES, 2000), enquanto que o número de ocorrências de candidemias cresce em todo o mundo, sobretudo as causadas por *Candida albicans* (ANAISSIE *et al*, 2003; PEREA & PATTERSON, 2002; COLLIN *et al*, 1999; CAMPBELL *et al*, 1998).

O sistema imunológico é o maior determinante na manifestação de grande parte das infecções fúngicas, principalmente naquelas onde ocorre evolução para fungemia, como por exemplo, nas candidemias (CANUTO & RODERO, 2002; PEREA & PATTERSON, 2002). Os principais fatores predisponentes a essas infecções, são principalmente a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), corticoterapia, uso de drogas citotóxicas, linfomas e leucemias entre outros (HOSPENTHAL *et al*, 2003).

Nos casos de candidemia e em outras micoses sistêmicas, a anfotericina B, apesar do seu potencial nefrotóxico, é o fármaco de escolha, notadamente quando o paciente for imunodeprimido. A anfotericina B é um antibiótico macrolídeo poliênico de ocorrência natural, produzido pelo *Streptomyces nodosus* (GUDLAUGSSON *et al*, 2003). A anfotericina B liga-se

ao ergosterol da membrana das células fúngicas, formando poros ou canais que possibilitam a saída de potássio e outros eletrólitos, bem como moléculas, que acarretam a morte celular (LOEFFLER & STEVENS, 2003; WHITE *et al*, 1998; POWDERLY *et al*, 1988; BOSSCHE *et al*, 1983).

No uso prolongado de anfotericina B, os pacientes podem evidenciar distúrbios da função renal, ou seja, diminuição da taxa de filtração glomerular e da função tubular. A depuração da creatinina diminui e há perdas de potássio. Pode ocorrer a potencialização da nefrotoxicidade por depleção de sódio. A função renal, em geral, é recuperada após suspensão do fármaco, porém, pode haver lesão residual após doses elevadas (POWDERLY *et al*, 1988).

As avaliações da suscetibilidade dos fungos aos agentes antifúngicos têm sido realizadas com a anfotericina B desde 1956. Todavia, a padronização dos ensaios para suscetibilidade só foi publicada em 1997. As necessidades de utilização dos ensaios com antifúngicos são crescentes devido ao aumento das doenças fúngicas em pacientes imunodeprimidos e principalmente à emergência do fenômeno de resistência (PEREA & PATTERSON, 2002).

Nesse contexto, a detecção da resistência *in vitro* à anfotericina B tem gerado interpretações conflitantes, porque as técnicas do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), hoje referido como Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), M27-A (1997) e M27-A2 (2002) para esse poliênico, não definem valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) de anfotericina B que possam ser utilizados como parâmetros de interpretação da sensibilidade ou resistência do fungo causador de candidemia, valores estes chamados de “breakpoints”. Todavia, o documento M27-A2 descreve uma técnica para garantir resultados reprodutíveis entre instituições. O documento especifica a padronização do meio, inóculo, condições laboratoriais como tempo, temperatura e concentração da droga. (HOSPENTHAL *et al*, 2003).

O presente trabalho propôs sugerir um “breakpoint” para a anfotericina B, com base na avaliação da suscetibilidade de amostras de *Candida* spp, isoladas de dois grupos de pacientes imunodeprimidos: aqueles que evoluíram ao óbito e aqueles que sobreviveram à candidemia.

A importância de sugerir um “breakpoint para a anfotericina B é dispor de um parâmetro confiável que julgue, com segurança, se os isolados clínicos são sensíveis ou resistentes a esta droga, redefinindo a terapia antes instituída, estabelecer um provável prognóstico da candidemia

(óbito/sobrevivência) e finalmente complementar um dado que ainda não está determinado na M27-A2.

A comparação entre os meios de cultura RPMI 1640, Antibiotic Médium 3 (AM3) e Yeast Nitrogen Base-dextrose (YNB), sendo os dois primeiros sugeridos pelo documento M27-A2, se fez necessária devido a sugestões e constatações de diversos autores de que o meio RPMI 1640, não seja o meio ideal para detecção de resistência a anfotericina B. Assim utilizou-se também os meios AM3 e YNBd.

Os três hospitais envolvidos no estudo, são três hospitais considerados referências no estado do Rio Grande do Sul, sendo eles o Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), o Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e a Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (SCPA).

## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Objetivo geral

Relacionar a suscetibilidade (CIM e CFM) de *Candida* spp frente a anfotericina B com evolução a óbito ou sobrevivência dos pacientes a episódios de candidemia.

### 1.1.2 Objetivos específicos:

- 1) Comparar as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) para anfotericina B de amostras de *Candida* spp isoladas de pacientes imunodeprimidos com candidemia que evoluíram ao óbito, com as cepas de pacientes com candidemia que sobreviveram.
- 2) Comparar as Concentrações Fungicidas Mínimas (CFMs) para a anfotericina B de *Candida* spp isoladas de pacientes com candidemia que evoluíram ao óbito, com as amostras de pacientes com candidemia que sobreviveram.
- 3) Comparar o desempenho dos meios RPMI 1640, Antibiotic Médium 3 (AM3) e Yeast Nitrogen Base dextrosado (YNBd) na determinação da CIM e CFM.

- 4) Evidenciar o perfil de suscetibilidade de *Candida* spp, isoladas de episódios de candidemia, frente a anfotericina B, em três hospitais do Rio Grande do Sul.
- 5) Selecionar CIMs e/ou CFM a anfotericina B que possam sinalizar o provável desfecho (óbito/sobrevivência) dos episódios de candidemia.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Leveduras do gênero *Candida*

Leveduras são estruturas somáticas globosas, ovais ou alongadas que se reproduzem por brotamento ou cissiparidade, podendo formar cadeias de células alongadas com constrições no local dos septos (pseudo-hifas) e/ou hifas verdadeiras, estruturas observadas no gênero *Candida*, dependendo das condições de crescimento (GHANNOUD & RICE, 1999; MACHADO, 1998; KWON-CHUNG & BENNETT, 1992).

Apesar de existirem relatos de infecções causadas por *Candida* reconhecidas por Hipócrates no século V a.C., as primeiras observações microscópicas deste microrganismo só ocorreram em 1839, com as pesquisas de Langenbeck, posteriormente confirmadas por Berg e Gruby, conforme citações de Hazen *et al* (1994).

O gênero *Candida* é composto por cerca de 154 espécies, das quais seis são mais freqüentemente isoladas em infecções em humanos. Enquanto *Candida albicans* é a espécie mais significativa e abundante, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida lusitaniae* e *Candida guilliermondii* são também isoladas como importantes agentes causadores de infecção. No entanto, é emergente o aumento de infecções devido a espécies não-*albicans*, tais como *Candida glabrata* e *Candida krusei* (LÓPEZ *et al*, 2005; COLOMBO, *et al*, 2003; DIGNANI *et al*, 2003; SANT'ANA *et al*, 2002; VARGAS & JOLY, 2002; EDWARDS, 2000; SOBEL *et al*, 2000; PFALLER *et al*, 1999; ABI-SAID *et al*, 1997; ARIF *et al*, 1996), o aumento de isolados resistentes, particularmente em pacientes recebendo profilaxia com fluconazol e a diversidade de outras espécies de *Candida* (que eram raras nas duas últimas duas décadas) encontradas como agentes em infecções (GUDLAUSSON *et al*, 2003).

Após o advento dos primeiros agentes antifúngicos na terapêutica moderna, testes *in vitro* com isolados de *Candida* spp passaram a ser realizados, demonstrando que a suscetibilidade antifúngica é variável. A partir de 1997, o CLSI disponibilizou o documento M27-A, atualizado em 2002 (M-27-A2), com o objetivo padronizar os ensaios de avaliação da atividade antifúngica *in vitro* (COLOMBO *et al*, 2003; PEREA & PATTERSON, 2002; REYES & MAHMOUD, 2000; NCCLS, 2002).

A crescente incidência das infecções nosocomiais causadas por *Candida* trazem como consequência a prolongada permanência hospitalar e acentuado aumento da morbidade e

mortalidade de pacientes que contraem tais infecções (PFALLER, 1995). Segundo dados do CLSI, nos Estados Unidos, entre 1980 e 1990, o número de infecções fúngicas nosocomiais duplicou, com *Candida* sp sendo responsável por 85,6% destas infecções, emergindo como o 6º patógeno mais freqüente e o 4º patógeno em unidades de tratamento intensivo, superado apenas por *Staphylococcus* sp coagulase negativa, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus* sp (QUINDÓS, 2002; BARAN *et al*, 2001; JARVIS, 1995; MURPHY *et al*, 1993).

## 2.2 Candidíases e candidemias

As espécies de *Candida* são microrganismos que podem ser recuperadas de diversas fontes ambientais, tais como solo, alimentos, água, plantas e diversos animais. Um aumento na incidência de infecções causadas por *Candida* tem sido constantemente notada em pacientes imunocomprometidos, tais como pacientes de unidades de tratamento intensivo, em condições pós-cirúrgicas e pacientes neutropênicos. Fatores de risco específicos para candidemia e infecções em tecidos profundos incluem o uso de cateter intravascular, hiperalimentação parenteral, uso de antibióticos de amplo espectro e neutropenia. A maioria das infecções são de origem endógena com as taxas de colonização aumentadas de acordo com a severidade da doença e da duração da hospitalização. *Candida albicans* representa 70 a 80% dos isolados, enquanto *Candida glabrata* e *Candida tropicalis* representam 5 a 8% dos isolados, enquanto outras espécies não-*albicans* são menos freqüentemente encontradas, porém em crescente incidência. Aquisição nosocomial e a transmissão interpessoal, especialmente entre neonatos, podem acontecer (AQUINO *et al*, 2005; CASTAGNOLA *et al*, 2004; ÁSMUNSDOTTIR *et al*, 2002; CANUTO & RODERO, 2002; DIEKEMA *et al*, 2002; KRCMERY & BARNES, 2002; MARR *et al*, 2002; ESPINEL-INGROFF, 2001; COLLIN *et al*, 1999; GHANNOUD & RICE, 1999; VERDUYN *et al*, 1999; VISCOLI *et al*, 1999).

As manifestações clínicas incluem candidíases cutânea, mucocutânea crônica, vulvovaginal, no trato urinário e infecção ocular (especialmente endoftalmite), podendo acontecer em um evento primário, como cirurgias, ou como um evento secundário em pacientes com candidemia. Endocardites podem acontecer com qualquer dos fatores de risco acima descritos ou entre usuários de drogas intravenosas. Infecções disseminadas incluem acometimentos da meninge, fígado, baço, ossos e trato gastrointestinal. A maioria das infecções por *Candida* envolvem a formação de biofilme, que ficam implantados em dispositivos como catéteres e válvulas cardíacas. Estes biofilmes consistem em uma matriz de microcolônias de

leveduras e hifas arrançadas em uma estrutura bilateral, promovendo maior resistência aos agentes antifúngicos. Em outras condições, tais como endocardites, também pode ser observado a formação de biofilmes, que podem se formar nas próprias válvulas danificadas do coração. Biofilmes também são observados em *Candida dubliniensis*, uma espécie que compartilha várias características fenotípicas com *Candida albicans*. A produção de biofilme é variável em *Candida parapsilosis*, com isolados recuperados de candidemia com produção acentuada de biofilme. Em adição à formação de biofilmes, *Candida albicans* tem diversos fatores de virulência descritos, que contribuem para sua patogenicidade, incluindo aderência às células epiteliais e endoteliais, produção de proteinases e fosfolipases, variabilidade fenotípica, formação de pseudo-hifas e hifas verdadeiras. Tanto hifas como pseudohifas são estruturas invasivas que são expressas durante os estágios iniciais da infecção, enquanto a forma leveduriforme está correlacionada com a disseminação hematogênica. O dimorfismo levedura/hifa é um determinante maior de virulência de *Candida albicans*, o que fica demonstrado em mutantes que possuem reduzida virulência, pois não formam a estrutura filamentosa (AQUINO *et al.*, 2005; PFALLER & DIEKEMA, 2004; CANUTO & RODERO, 2002; NUCCI & COLOMBO, 2002; PEREA & PATTERSON, 2002; GHANNOUD & RICE, 1999; WHITE *et al.*, 1998; PFALLER, 1995; POWDERLY *et al.*, 1988).

Espécie	Canadá (1997)	América Latina (1997)	EUA (1997)	Europa (1997)	Hungria (1996-2000)	Países Baixos (1995)	Irlanda do Norte (1989-1994)
<i>C. albicans</i>	53	41	56	53	77	60	53
<i>C. parapsilosis</i>	23	38	9	21	7	2	11
<i>C. glabrata</i>	11	2	19	12	3	17	27
<i>C. tropicalis</i>	8	12	7	6	4	4	6
<i>C. guilliermondii</i>	-	2	1	4	-	2	-
<i>C. krusei</i>	2	0	2	1	6	2	-
<i>Candida spp</i>	3	5	6	3	3	13	3
Referência	Pfaller <i>et al.</i> (1998)			Pfaller <i>et al.</i> (1999)	Hope <i>et al.</i> (2002)	*NINSS (2002)	Bruun <i>et al.</i> (1995)

\* Nosocomial Infection National Surveillance Service.

\*\* Dados expressos em porcentagem

**QUADRO 1 – Distribuição das espécies de *Candida* isoladas de episódios de candidemia, em vários continentes**

### 2.3 Drogas antifúngicas

A emergência de doenças fúngicas associadas com a SIDA, os avanços na metodologia diagnóstica e nos procedimentos terapêuticos e cirúrgicos, o aumento dos casos de mortalidade decorrente de infecções fúngicas, associado com o largo uso de terapias com agentes imunossupressores tem estimulado pesquisas diretas para a descoberta de novos agentes antifúngicos (CASTAGNOLA *et al*, 2004; ÁSMUNDSDÓTTIR *et al*, 2002; DIEKEMA *et al*, 2002; MARR *et al*, 2002; PEREA & PATTERSON, 2002; ESPINEL-INGROFF, 2001; GHANNOUD & RICE, 1999; VERDUYN *et al*, 1999; VISCOLI *et al*, 1999; WHITE *et al*, 1998; RICHARDSON & WARNOCK, 1993; WALSH & LEE, 1993, BODEY, 1992)

Contrastando com o elevado número de antibacterianos comercialmente disponíveis, a terapêutica antifúngica sistêmica é bastante limitada, devido especialmente ao fato que fungos e hospedeiros são ambos eucarióticos, o que resulta em uma série de efeitos colaterais associados à terapia. Desta forma, inicialmente os agentes antifúngicos disponíveis tinham ação pouco efetiva e não-específica, sendo o iodeto de potássio um dos primeiros compostos utilizados a partir de 1903, mas que ainda hoje mantém importância em alguns tratamentos, como nos casos de esporotricose (SIDRIM, 2004).

Nos últimos anos uma série de novos compostos antifúngicos tem sido desenvolvidas, exercendo ação sob as diversas estruturas fúngicas, destacando-se os compostos com ação no conjunto de microtúbulos (griseofulvina), na síntese do Ácido Desoxirribonucléico (DNA) (fluocitosina), na síntese do ergosterol (antifúngicos azólicos, alilaminas e derivados morfolínicos), sobre a membrana fúngica (antifúngicos poliênicos e equinocandinas) e sobre a síntese proteica (sordarinas) (PETER *et al*, 2005; YOUNG *et al*, 2003; CANUTO & RODERO, 2002; LUPETTI *et al*, 2002; WHITE *et al*, 1998; SOKOL-ANDERSON *et al*, 1988; THOMAS, 1986).

A determinação da suscetibilidade aos agentes antifúngicos é difícil e um consenso ainda não foi obtido. As CIMs são pouco preditivas no sucesso ou falha terapêutica. Uma boa correlação entre os resultados *in vitro* e *in vivo* tem sido observado somente nos pacientes com candidíase orofaríngea associada com infecção pelo HIV e a combinação de drogas antifúngicas ainda está sob investigação. O papel dos fatores de crescimento hemopoiéticos (G-CSF, GM-



CSF) como adjuvantes não está completamente estabelecido (LUPETTI *et al*, 2002; NATH *et al*, 1999; WHITE *et al*, 1998; POWDERLY *et al*, 1988).

## 2.4. Antifúngicos poliênicos

Em 1949, Hazen & Brow isolaram nos laboratórios New York State (NYS) um antibiótico poliênico natural, procedente do actinomiceto *Streptomyces noursei*. Em homenagem ao laboratório, este antibiótico foi nomeado nistatina. No entanto, a elevada toxicidade deste composto quando administrado endovenosamente e a ausência de absorção gastrointestinal, impulsionaram a busca de novos compostos, o que resultou numa classe de aproximadamente 200 compostos, quimicamente caracterizados por um anel de átomos de carbono fechado por lactonização, contendo em alguns dos átomos de carbono, duplas ligações conjugadas e do outro, uma região hidrofílica com várias oxidrilas (HSUCHEN & FEINGOLD, 1973).

Devido a elevada toxicidade desses compostos, apenas dois deles encontram indicações para o uso clínico: a nistatina, de uso tópico, e a anfotericina B (Figura 1), para uso tópico ou sistêmico. A anfotericina B, lançada em 1956, é ainda um dos antifúngicos mais confiáveis e regularmente administrado para tratamento das micoses invasivas, visto que seu espectro de ação abrange quase todos os fungos patogênicos (WALSH & LEE, 1993).

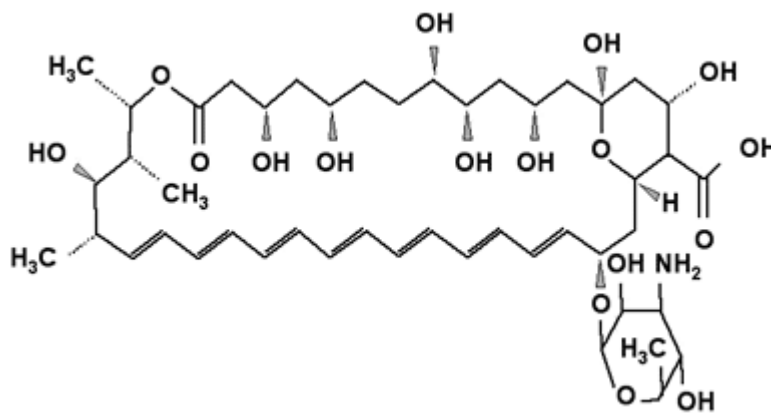


FIGURA 1 – Anfotericina B

#### 2.4.1 Mecanismo de ação dos antifúngicos poliênicos

Desde 1950 até a descoberta dos azólicos, os agentes antifúngicos poliênicos, tais como a anfotericina B, representaram o padrão da terapia para infecções fúngicas sistêmicas (SUGAR, 1986). Há uma associação entre a suscetibilidade aos poliênicos e a presença de esteróis na membrana plasmática das células (LUPETTI *et al*, 2002; NATH *et al*, 1999; WHITE *et al*, 1998; POWDERLY *et al*, 1988; HSUCHEN & FEINGOLD, 1973).

Todos os organismos suscetíveis aos poliênicos, por exemplo, os fungos, algas e os protozoários, contêm esteróis em sua membrana exterior, enquanto os organismos intrinsecamente resistentes não (NORMAN *et al*, 1972). A importância dos esteróis da membrana para a atividade dos poliênicos é suportada também por estudos onde se mostrou que os fungos podem ser protegidos da ação inibitória de determinados poliênicos pela adição de esteróis ao meio de cultura (PETER *et al*, 2005; YOUNG *et al*, 2003; CANUTO & RODERO, 2002; LUPETTI *et al*, 2002; GHANNOUD & RICE, 1999; WHITE *et al*, 1998; SOKOL-ANDERSON *et al*, 1988; THOMAS, 1986; ZYGMUNT *et al*, 1966; LAMPEN *et al*., 1960; GOTTLEIB *et al*., 1958). Foi sugerido que este efeito é devido a uma interação físico-química entre os esteróis adicionados e os poliênicos, os quais impedem que a droga ligue-se com os esteróis celulares, sendo melhor comprovado utilizando-se metodologias espectrofotométricas diretas (LAMPEN *et al*., 1960), sugerindo uma interação direta entre o esterol adicionado e o agente antifúngico (KLEINSCHMIDT *et al*, 1972; NORMAN *et al*, 1972).

Para a maioria dos poliênicos, tais como a anfotericina B, foi proposto que a interação do antifúngico com o esterol da membrana resulta na produção de poros aquosos constituídos de oito moléculas de anfotericina B ligadas hidrofobicamente aos esteróis da membrana (DE KRUIJFF *et al*, 1974; HOLZ, 1974). Esta configuração conduz a uma alteração na permeabilidade celular, com a perda de componentes citoplasmáticos vitais e à morte do organismo (KERRIDGE *et al*, 1980; KERRIDGE *et al*, 1985). A composição dos fosfolipídios foi implicada também na suscetibilidade das leveduras aos poliênicos (HSUCHEN & FEINGOLD, 1973; RAO *et al*, 1985a; RAO *et al*, 1985b; BOSSCHE *et al*, 1983). Além disso, a morte de *Candida albicans* foi atribuída aos danos oxidativos causados pelos poliênicos (GRAYBILL *et al*, 1997; TITSWORTH *et al*, 1973).

Embora a anfotericina B seja o agente antifúngico mais eficaz efetivamente disponível, seu estreito índice terapêutico continua a limitar sua utilidade clínica (CHENG *et al*, 1982; GALLIS *et al*, 1990; LOPEZ-BERESTEIN *et al*, 1987; WIEBE *et al*, 1988). Para reduzir os efeitos adversos, a anfotericina B foi formulada em lipossomos para permitir o uso de doses mais elevadas com menor toxicidade às células dos mamíferos (JULIANO *et al*, 1987; PAYNE *et al*, 1987). Diversas preparações lipossomais de anfotericina B foram desenvolvidas, como ABELCET, Amphotek e AmBisome. Uma preparação lipossomal da nistatina, outro antifúngico poliênico, está sob avaliação pré-clínica e clínica (CANUTO & RODERO, 2002; WALLACE *et al*, 1996). A hipótese é de que, uma vez que a anfotericina B é incorporada em lipossomas, pode participar de um mecanismo seletivo de transferência, que envolve sua transferência do lipossoma “doador” para o “alvo” na membrana fúngica (ergosterol), auxiliado pelos fosfolipídios fúngicos e/ou do hospedeiro (CANUTO & RODERO, 2002; JULIANO *et al*, 1987).

#### 2.4.2 Evolução da resistência a anfotericina B

Desde 1956, quando Gold *et al* isolaram a anfotericina B, a partir do *Streptomyces nodosus* (RIPPON, 1982) que pesquisadores têm investigado a suscetibilidade de diferentes patógenos fúngicos a este agente, com base nas observações disponíveis sobre o desenvolvimento da resistência em bactérias. Neste contexto os primeiros estudos foram desenvolvidos por Borowski & Rutecka (RYLEY *et al*, 1984) e Fisemberg *et al* (EISEMBERG *et al*, 1956), que evidenciaram que *Candida* era invariavelmente sensível aos poliênicos.

Outros autores tentaram, sem sucesso, induzir a resistência *in vitro* empregando técnicas de subcultivo de leveduras em meios contendo concentrações crescentes de anfotericina B (HEBEKA & SOLOTOROVSKY, 1962; BRADLEY & FARBER, 1960; CASIDA & MC COY, 1952). Também observaram que as cepas tornadas “resistentes” evidenciavam características fenotípicas singulares como: tendência ao crescimento filamentososo (HEBEKA & SOLOTOROVSKY, 1965), incapacidade de formar clamidoconídios (ATHAR & WINNER, 1971), incapacidade de reduzir o sulfito de bismuto (ATHAR & WINNER, 1971; HEBEKA & SOLOTOROVSKY, 1965; HEBEKA & SOLOTOROVSKY, 1962), redução da virulência a camundongos (ATHAR & WINNER, 1971; HEBEKA & SOLOTOROVSKY, 1965; HEBEKA & SOLOTOROVSKY, 1962), crescimento mais lento (HAMLTON-MILLER, 1972;

BODENHOF, 1969; BODENHOFF, 1968; HEBEKA & SOLOTOROVSKY, 1965), decréscimo da habilidade de formar pseudomicélio (HAMILTON-MILLER, 1972; ATHAR & WINNER, 1971), resistência cruzada entre poliênicos (ATHAR & WINNER, 1971; HEBEKA & SOLOTOROVSKY, 1962; SORENSEN *et al*, 1959; LITTMAN *et al*, 1958) e redução do conteúdo de ergosterol (ATHAR & WINNER, 1971).

Embora a resistência a anfotericina B estivesse caracterizada *in vitro* somente em 1962 Larsch (LARSCH, 1962) observou que cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes tratados com anfotericina B para histoplasmose, eram menos sensíveis a este poliênico do que as cepas isoladas anteriormente à medicação. Stein *et al* (REYNOLDS *et al*, 1977) também relataram isolamento de *Candida albicans* inicialmente a nistatina que desenvolveu resistência após meses de tratamento.

Em 1968, Bodenhoff (BODENHOFF, 1968), ao relatar dois casos de resistência a poliênicos *in vivo* enfatizou a ocorrência de resistência cruzada entre anfotericina B e nistatina e a avaliação laboratorial desse fenômeno deveria acompanhar a terapêutica.

Além destes, outros autores relataram a existência de amostras de *Candida* resistentes *in vivo* e *in vitro* a antifúngicos poliênicos, conforme ilustra o Quadro 2.

Em 1980, Dick *et al* verificaram que 7,4% das amostras de *Candida* isoladas de pacientes com câncer eram resistentes aos poliênicos.

Entre 1980 e 1991 a avaliação da suscetibilidade a antifúngicos passou a ser mais freqüentemente estudada e a preocupação passou a ser na padronização de ensaios que, a exemplo das técnicas bacteriológicas, pudessem garantir a efetiva constatação da sensibilidade ou resistência a antifúngicos. Neste período foram desenvolvidos estudos voltados a escolha do melhor meio de cultivo para os testes, qual o número de células fúngicas (inoculo), o tempo e temperatura de incubação, bem como os critérios de leitura (REX *et al*, 1995).

Em 1992 o NCCLS dos Estados Unidos publicou o documento M27-P, constituindo-se na primeira proposta de padronização dos ensaios para fungos leveduriformes. Após cinco anos de avaliação, em 1997 publicou-se o documento M27-A (aprovado), o qual foi reestruturado em 2002, resultando no documento M27-A2, atualmente vigente para avaliação da suscetibilidade de fungos leveduriformes a antifúngicos (WHITE *et al*, 1998; RICHARDSON & WARNOCK, 1993; WALSH & LEE, 1993; BODEY, 1992; NCCLS, 1992).

<b>Espécies isoladas</b>	<b>Número de pacientes</b>	<b>Infecção</b>	<b>Problema base</b>	<b>Resistência a</b>	<b>Referência</b>
<i>Candida parapsilosis</i>	1	Endocardite	...	Anfotericina B	SCHOLER & POLAK, 1984
<i>Candida albicans</i>	1	Candidíase generalizada	CMCC*	Anfotericina B e Nistatina	BODENHOFF, 1968
<i>Candida albicans</i>	1	Candidíase oral	Sarcoidose pulmonar	Nistatina	BODENHOFF, 1968
<i>Candida parapsilosis</i>	1	Endocardite	...	Anfotericina B	SCHOLER & POLAK, 1984
<i>Candida tropicalis</i>	1	Pielonefrite	...	Anfotericina B	WOODS <i>et al</i> , 1974
<i>Candida krusei</i>	1	...	Cirurgia bexiga	Anfotericina B	SAFE <i>et al</i> , 1977
<i>Candida parakrusei</i>	1	...	Gastroenterite e otite	Anfotericina B	SAFE <i>et al</i> , 1977
<i>Candida tropicalis</i>	1	...	Pancitopenia idiopática	Anfotericina B	SAFE <i>et al</i> , 1977
<i>Candida tropicalis</i> **	1	Fungemia	Transplante de medula óssea	Anfotericina B e Nistatina	MERZ & SANFORD, 1979
<i>Candida lusitaniae</i>	1	Trato respiratório	Leucemia	Anfotericina B	PAPPAGIANIS <i>et al</i> , 1979
<i>Candida tropicalis</i>	1	Fungemia	Leucemia	Anfotericina B	DRUTZ & LEHRER, 1978
<i>Candida albicans</i>	3	...	Leucemia	Anfotericina B e Nistatina	DICK <i>et al</i> , 1980
<i>Candida tropicalis</i>	3	Fungemia	Leucemia	Anfotericina B e Nistatina	DICK <i>et al</i> , 1980
<i>Candida glabrata</i>	2	Fungemia	Leucemia	Anfotericina B e Nistatina	DICK <i>et al</i> , 1980
<i>Candida lusitaniae</i>	1	Fungemia	Peritonite	Anfotericina B	GUINET <i>et al</i> , 1983
<i>Candida guilliermondii</i>	1	Fungemia	Anemia aplástica	Anfotericina B	DICK <i>et al</i> , 1985

\* Candidíase mucocutânea crônica

\*\* Posteriormente identificada como *Candida lusitaniae*

... Não relatado

**QUADRO 2 – Casos de insucesso terapêutico com antibióticos poliênicos, com posterior comprovação da resistência de espécies de *Candida* a estes agentes.**

Revisando a questão da resistência de *Candida* a anfotericina B, deve-se alertar para certa confusão no tema, pois há relatos de emergência da resistência utilizando-se técnicas não padronizadas. A literatura refere que há variação na suscetibilidade entre as espécies, pois

*Candida albicans* e *Candida parapsilosis* são consideradas invariavelmente sensíveis; *Candida glabrata* é considerada de suscetibilidade intermediária dependendo da dose. *Candida krusei*, *Candida kefyr*, *Candida famata* e *Candida guilliermondii* são consideradas sensíveis a anfotericina B, embora, ocasionalmente amostras resistentes de *Candida tropicalis* e *Candida krusei* sejam relatadas. *Candida lusitaniae* pode ser sensível ou resistente a anfotericina B (ELLIS, 2002)

A resistência de *Candida* spp a anfotericina B é considerada um evento de difícil detecção e é causado pelo decréscimo do ergosterol na membrana plasmática e/ou por alterações na composição dos lipídios da membrana, ou ainda por alterações na relação ergosterol/fosfolipídios da membrana fúngica, comprometendo a ligação da anfotericina B com *Candida* spp (LOEFFLER & STEVENS, 2003; PEREA & PATTERSON, 2002; WHITE *et al*, 1998)

#### 2.4.3 Mecanismo de resistência aos antifúngicos poliênicos

Apesar de mais de 30 anos de uso clínico, a resistência aos antibióticos poliênicos, tais como a anfotericina B e a nistatina, é rara, com os isolados resistentes sendo na maior parte espécie menos comuns de *Candida*, como *Candida lusitaniae*, *Candida glabrata* e *Candida guilliermondii* (MARTINS & REX, 1996). Fryberg (1974) sugeriu que o desenvolvimento da resistência ocorre pela seleção natural de células resistentes, presente em pequeno número na população. Estas células naturalmente resistentes produzem esteróis modificados que ligam nistatina com afinidade mais baixa. A taxa de crescimento na presença de nistatina é conseqüentemente dependente do balanço entre a taxa de crescimento normal (na ausência de nistatina) e a taxa em que a nistatina causa dano na membrana celular. Esta última taxa é presumida ser uma função da afinidade da nistatina com os esteróis da membrana: quanto maior é a afinidade da nistatina pelos esteróis, maior será a taxa dos danos da membrana.

O fato da resistência aos poliênicos ser gradualmente perdida após a passagem em uma série de meios contendo nistatina representa, presumivelmente, uma repopulação das células que produzem esteróis, com uma afinidade mais elevada para a nistatina, embora esta hipótese não esteja claramente explicada. Athar e Winner (1971), entretanto, sugeriram que a resistência resulta de mutações.

A maioria dos conhecimentos dos mecanismos de resistência aos poliênicos em espécies fungicas vieram dos estudos usando células mutantes: a) crescimento de células em presença de concentrações crescentes de agentes antifúngicos; b) exposição das células a um gradiente de concentrações (ATHAR & WINNER, 1971); ou c) criação de mutantes utilizando-se agentes mutagênicos (HAMILTON-MILLER et al., 1972). Hamilton-Miller (1972) propôs uma hipótese “bioquímica” onde a resistência ocorre devido às mudanças, quantitativas ou qualitativas, nos níveis de esteróis das células. De acordo com esta hipótese, células resistentes com conteúdo alterado de esteróis devem ligar quantidades menores de poliênicos do que as células suscetíveis. As dificuldades de ligação entre poliênicos e células de *Candida albicans* mutantes pode ser atribuído a: a) a uma diminuição do conteúdo total de ergosterol da célula, sem mudanças concomitantes na composição do esterol; b) redistribuição de alguns ou de todos os esteróis ligantes ao poliênico por outros que ligam-se ao poliênico com menor afinidade, por exemplo, substituição do ergosterol, do colesterol, ou do estigmasterol por 3-hidroxi ou 3-oxo esterol; ou c) reorientação ou alteração do ergosterol existente, de modo que a ligação com os poliênicos seja estericamente ou termodinamicamente menos favorável (MICHAELIS & BERKOWER, 1995).

Diferentes pesquisadores forneceram evidências que sustentam todas estas possibilidades. Capek & Simek (1971) demonstraram que o desenvolvimento de resistência induzida (induzida por adaptação mecânica) em um isolado de *C. albicans* foi acompanhado pelo decréscimo do conteúdo de ergosterol das células. Esta diminuição no conteúdo de ergosterol foi devido não a enzimas de degradação do ergosterol pré-formado mas pela inibição de sua síntese. Similarmente, Dick et al. (1980) estudando 27 isolados *C. albicans* resistentes aos poliênicos, proveniente de pacientes neutropênicos, demonstraram que estes isolados tinham um decréscimo de 74 a 85% no seu conteúdo de ergosterol. Assim, o decréscimo no conteúdo de ergosterol pode conduzir a diminuição da suscetibilidade aos poliênicos.

Mbongo *et al* (1998) forneceram evidências adicionais que o mecanismo de resistência á anfotericina B em *Leishmania donovani* envolvia a substituição de um outro esterol para o ergosterol na membrana da célula. Esta substituição é associada com alterações na fluidez da membrana e no decréscimo da afinidade da anfotericina B para tais membranas modificadas.

A função desempenhada pelos componentes da parede celular em afetar a interação dos poliênicos com seu local de ação primário, a membrana citoplasmática, foi estudada por Galé *et al* (1975) e Kerridge *et al* (1980). Estes pesquisadores compararam a suscetibilidade aos

poliênicos em células de *Candida* (fase exponencial e estacionária) e demonstraram que as células na fase estacionária eram mais resistentes do que a na fase exponencial. Esta observação foi atribuída ao fato de que nas células em fase exponencial, danos e a re-síntese dos constituintes da parede celular ocorrem em uma taxa elevada, tendo como resultado o melhor acesso do poliênico à membrana celular. Em contraste, nas células na fase estacionária, isto ocorreria em taxas muito mais baixas (KERRIDGE *et al*, 1980). Capek e Simek (1971) relataram a degradação da nistatina por um sistema enzimático induzido por fungos dermatofíticos. Nenhum outro estudo confirmou estes resultados. Considera-se improvável que a modificação da droga represente um mecanismo proeminente do mecanismo de resistência aos agentes poliênicos. Além disso, uma vez que os poliênicos não necessitam entrar na célula, mecanismos de efluxo são improváveis de estarem envolvidos no desenvolvimento da resistência (LOEFFLER & STEVENS, 2003; PEREA & PATTERSON, 2002; WHITE *et al*, 1998; NOLTE *et al*, 1997).

Limitado número de estudos envolvendo a base genética da resistência aos poliênicos foram elaborados, os quais utilizaram, principalmente, *Saccharomyces cerevisiae*. Molzahn e Woods (1972) relataram a caracterização de 103 isolados de *S. cerevisiae* mutantes que eram resistentes aos poliênicos, como nistatina, filipina e pimaricina. Os mutantes foram alocados em quatro grupos de genes, *pol 1*, *pol 2*, *pol 3* e *pol 5*. Estes autores encontraram uma correlação entre o poliênico usado para os isolados mutantes e (a) extensão da resistência cruzada (b) a seleção dos mutantes com mutações em genes *pol* particulares. A análise dos esteróis mostrou que tanto a célula-pai como os mutantes revelaram que ergosterol e 24, (28)-dehidroergosterol eram predominantes no tipo “selvagem”. Em contraste, este último esterol não foi detectado em nenhum dos mutantes, enquanto o ergosterol estava ausente no mutante *pol 2* e presente somente em níveis muito baixos no mutante *pol 3*. Embora a interação entre os genes *pol* seja desconhecida, os dados obtidos usando-se os espectros de absorção no ultravioleta sugeriram que estes mutantes teriam um relacionamento epistático (MOLZAHN *et al.*, 1972).

#### 2.4.4 Testes de suscetibilidade e avaliação da resistência

Os testes de suscetibilidade a antimicrobianos têm sido realizados, rotineiramente, na maioria dos laboratórios clínicos com o objetivo de avaliar a suscetibilidade dos patógenos frente aos agentes terapêuticos selecionados. Tais procedimentos visam otimizar o tratamento das



doenças infecciosas, sobretudo das enfermidades de etiologia bacteriana e fúngica (PEREA & PATTERSON, 2002).

Frente aos agentes antibacterianos, os testes de suscetibilidade têm sido empregados há décadas e, mais recentemente tais métodos têm sido adaptados, padronizados e validados para a avaliação de patógenos fúngicos leveduriformes e filamentosos (NCCLS, 2002), onde a atividade inibitória é avaliada. A atividade inibitória dos antifúngicos é considerada suficiente porque a função dos antimicrobianos é minimizar a disseminação do agente infectante a partir do sítio infeccioso enquanto que as defesas imunológicas do hospedeiro e outros procedimentos (remoção de corpo estranho, ressecção cirúrgica, drenagem) favorecem na erradicação do patógeno, e assim, advindo a cura (DORSTHORST *et al*, 2005; REX *et al*, 2001).

O avanço dos procedimentos médicos tem gerado um grande contingente de pacientes imunocomprometidos, os quais, devido a tratamentos, estão temporariamente deficientes em sua capacidade de defesa imunológica. A estes pacientes são requeridas terapêuticas anti-infecciosas mais enérgicas, capazes de causar a morte do patógeno agressor. Há também situações como infecções no tecido cardíaco, sistema nervoso central e ossos que, mesmo o paciente sendo imunocompetente, há necessidade de terapêuticas microbicidas (LUPETTI *et al*, 2002; NATH *et al*, 1999; POWDERLY *et al*, 1988; WHITE *et al*, 1998; RICHARDSON & WARNOCK, 1993; WALSH & LEE, 1993; BODEY, 1992).

Os estudos envolvendo a determinação das CFMs ainda não estão devidamente padronizados e, por isto, as técnicas de execução e critérios de interpretação, a rigor, são inexistentes. Após a publicação dos documentos de testes de suscetibilidade para leveduras (M27-A2) e para fungos filamentosos (M38-A) as condições para a obtenção de dados para concentração fungicida tornaram-se mais uniformes. Mesmo assim há pontos críticos como o volume a ser transferido e o critério de leitura para indicar a CFM. A maioria dos estudos tem utilizado critérios de redução no número de unidades formadoras de colônias (UFC) em percentuais de 90, 95, 97 e 99,9% (CURY *et al*, 1989; HITCHCOCK & RUSSEL, 1987; LOMBARDI *et al*, 1987; BEGGS & HUGHES, 1986; HOEPRICH & MERRY, 1986; BRINCKER, 1983; BRASS *et al*, 1979; HALLER & PLEMPPEL, 1978; HELL *et al*, 1978; HOLT, 1975; LARSH, 1962; CASIDA & MCCOY, 1952).

O principal problema com testes com fungos leveduriformes (M27-A2) é que o inóculo inicial é pequeno ( $0,5 \times 10^3$  a  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL) resultando em dificuldades de avaliação dos

percentuais de redução de UFC/mL (maior ou igual a 99,9%) em relação ao inóculo inicial. Ao reduzirmos o percentual que define CFM, há risco de equívocos como considerar fungicida uma droga que é fungistática (DORSTHORST *et al*, 2005).

#### 2.4.4.1 Outros métodos

A relativamente recente disponibilidade de sondas fluorescentes específicas para avaliação da vitalidade ou inviabilidade fúngica em associação com métodos que permitem a avaliação de Adenosina Tri-Fosfato (ATP) intracelular constituem-se em técnicas mais avançadas para determinação da CFM (PETER *et al*, 2005). Por outro lado a interpretação destes novos parâmetros é complexa; Liao *et al* (GEBHART *et al*, 1984) evidenciou que *Candida albicans* frente a anfotericina B era incapaz de replicação ou de manifestar qualquer atividade metabólica mas ainda assim mantinham um estado fisiológico que poderia indicar capacidade de crescimento assim que o antifúngico fosse removido. Estas observações tornam mais complexa a questão de determinação de atividade fungicida.

#### 2.4.5 Problemas com testes de suscetibilidade a anfotericina B

Assim, desde 1992 a comunidade científica dispõe de uma técnica universalmente aceita e reprodutível para avaliação da suscetibilidade. Neste período os antifúngicos mais avaliados foram anfotericina B, fluconazol, itraconazol, flucitosina e cetoconazol e, enquanto a resistência de *Candida* spp ao fluconazol tornou-se bem conhecida e estudada a resistência deste gênero a anfotericina B tornou-se rara (REYES & MAHMOUD, 2000).

Vários autores enfatizam que embora a técnica M27-A2 seja exequível e reprodutível, ela gera, nos ensaios com anfotericina B, CIM muito próximas numa faixa restrita, dificultando a discriminação entre isolados sensíveis e resistentes a anfotericina B; ao mesmo tempo, a M27-A2 não disponibiliza “breakpoints”, isto é, parâmetros que permitam classificar os isolados com sensíveis ou resistentes (PARK *et al*, 2006).

Reconhecendo tal situação, vários autores passaram a empregar outros meios como o AM3, comparando resultados com os obtidos com o caldo RPMI 1640, indicado no documento

M27-A2 (PARK *et al*, 2006). Os testes utilizando o AM3 geram CIMs numa faixa mais ampla de suscetibilidade, permitindo a melhor detecção de isolados menos suscetíveis a anfotericina B (REX *et al*, 1995; BODENHOFF, 1969).

Por outro lado, é de conhecimento que meios de cultura contendo peptonas são considerados quimicamente indefinidos e, por isto, podem conter substâncias antagonistas aos antifúngicos; tais meios não devem ser, portanto, empregados. Outro ponto contra a utilização do AM3 é a variação entre lotes que os meios a base de peptona podem conter, comprometendo a reprodutibilidade da técnica (DORSTHORST *et al*, 2005; HOSPENTHAL *et al*, 2003).

O YNB é um meio base, quimicamente definido, e originalmente indicado para estudos de utilização de açúcares, nas clássicas provas auxanográficas, para identificação de fungos leveduriformes. Os testes de suscetibilidade propostos anteriormente aos do NCCLS, indicavam o caldo YNB-dextrose como meio para as provas de macro e microdiluição bem como para ensaios com ágar (SUGAR, 1986). Com base nestas indicações, o caldo YNB-dextrose foi incluído no presente estudo como uma alternativa que viesse favorecer o melhor crescimento fúngico, se comparad ao caldo RPMI 1640, sem as desvantagens da indefinição do AM3.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Microorganismos

Foram utilizados neste estudo 144 cultivos de *Candida* spp, todos provenientes de 144 diferentes episódios de candidemia. Estas culturas eram oriundas de três hospitais gaúchos; o Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) contribuiu com 41 isolados, o Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) contribuiu com 56 isolados e a Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (SCPA) com 47 isolados.

O isolamento dos microorganismos ocorreu a partir de hemocultivos, repicando-se para ágar sangue e ágar Sabouraud dextrose. A identificação das espécies foi realizada através dos métodos clássicos utilizados em Micologia Médica incluindo o tubo germinativo, produção de clamidoconídios, teste de assimilação (auxonograma) com fontes de carbono e nitrogênio. Eventualmente foram empregados métodos comercialmente disponíveis como ID32C e CHROMagar *Candida*.

O total de microorganismos incluiu oito espécies, assim distribuídas:

- a) HUSM (n= 41): *Candida albicans* (n= 29); *Candida tropicalis* (n= 8); *Candida krusei* (n= 2); *Candida parapsilosis* (n= 1); *Candida glabrata* (n= 1).
- b) HCPA (n= 56): *Candida albicans* (n= 23); *Candida parapsilosis* (n= 20); *Candida tropicalis* (n= 11); *Candida glabrata* (n= 1); *Candida guilliermondii* (n= 1).
- c) SCPA (n= 47): *Candida albicans* (n= 18); *Candida parapsilosis* (n= 18); *Candida tropicalis* (n= 4); *Candida pelliculosa* (n= 3); *Candida glabrata* (n= 2); *Candida dubliniensis* (n= 1); *Candida guilliermondii* (n= 1).

### 3.2 Conservação

Os microorganismos utilizados eram mantidos a  $-80^{\circ}\text{C}$  no Laboratório de Pesquisas Micológicas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) (BECKER *et al*, 1995).

### 3.3 Formação dos grupos de microorganismos

Todos os isolados incluídos neste estudo dispunham de registros nos hospitais de origem onde se obteve dados sobre o desfecho da candidemia. Só foram incluídos aqueles em que pôde ser constatada a evolução do paciente até trinta dias após o episódio da candidemia. Assim, pôde-se constituir os quatro grupos de estudo:

Grupo I: *Candida albicans* provenientes de pacientes que evoluíram ao óbito;

Grupo II: *Candida não-albicans* provenientes de pacientes que evoluíram ao óbito.

Grupo III: *Candida albicans* provenientes de pacientes que sobreviveram ao episódio de candidemia.

Grupo IV: *Candida não-albicans* provenientes de pacientes que sobreviveram ao episódio de candidemia.

### 3.4 Meios de cultura

#### 3.4.1 Ágar Sabouraud dextrose (ASD)

Preparado de acordo com os procedimentos operacionais padrão (BECKER *et al*, 1995).

#### 3.4.2 Antibiotic Medium 3 (AM3)

##### 3.4.2.1 Composição

Peptona.....	1 g
Extrato de levedura.....	0,3 g
Extrato de carne.....	0,3 g
Cloreto de Sódio (NaCl).....	0,7 g
Dextrose.....	0,2 g
Fosfato dipotássico.....	0,736 g

Fosfato di-hidrogenado potássico.....	0,264 g
Água destilada.....	200 mL

#### 3.4.2.2 Preparação

Os componentes sólidos eram solubilizados em água; o volume final e pH eram ajustados e a seguir, o meio era esterilizado em autoclave a 121°C/15 minutos. Após resfriamento o meio era conservado sob refrigeração

#### 3.4.3 Caldo RPMI 1640 tamponado suplementado

##### 3.4.3.1 Composição

Este meio era adquirido comercialmente (marca GIBCO<sup>®</sup>), onde cada envelope continha 10,4 g. A composição descrita na embalagem inclui:

L_arginina (base livre).....	0,2 g
L_arginina (anidra).....	0,05 g
L_aspártico, ácido.....	0,02 g
L_cistina . HCl.....	0,0652 g
L_glutâmico, ácido.....	0,02 g
L_glutamina.....	0,3 g
Glicina.....	0,01 g
L_histidina (base livre).....	0,015 g
L_hidroxi prolina.....	0,02 g
L_ isoleucina.....	0,05g
L_ leucina.....	0,05 g
L_ lisina . HCl.....	0,04 g
L_ metionina.....	0,015 g
L_ fenilalanina.....	0,015 g
L_ prolina.....	0,02 g

L_serina.....	0,03 g
L_treonina.....	0,02 g
L_triptofano.....	0,005 g
L_tirosina . 2 Na.....	0,02883 g
L_valina.....	0,02 g
Biotina.....	0,0002 g
D_pantotênico.....	0,00025 g
Colina, cloreto de.....	0,003 g
Fólico, ácido.....	0,001 g
Mioinositol.....	0,035 g
Niacinamida.....	0,001 g
PABA.....	0,001 g
Piridoxina HCl.....	0,001 g
Riboflavina.....	0,0002 g
Tiamina HCl.....	0,001 g
Vitamina B <sub>12</sub> .....	0,000005 g
Nitrato de cálcico . H <sub>2</sub> O.....	0,1 g
Cloreto de Potássio.....	0,4 g
Sulfato de Magnésio (anidro).....	0,04884 g
Cloreto de Sódio.....	6,0 g
Fosfato de sódio, dibásico (anidro).....	0,8 g
D_glicose.....	2,0 g
Glutationa, reduzida.....	0,001 g
Vermelho fenol, Na.....	0,0053 g

#### 3.4.3.2 Preparação

Em 800 mL de água destilada solubilizava-se o conteúdo de um envelope (10,4 g). A seguir, era acrescentado 34,53 g do tampão Ácido Morfolinopropanosulfônico (MOPS) (marca ACROS<sup>®</sup>); a seguir acrescentava-se 20 g de dextrose e após cuidadosa homogeneização avaliava-se o pH do meio. Para o ajuste final do pH em 7,0, gotas de hidróxido de sódio (NaOH)

1M eram acrescentadas. Finalmente o volume final era obtido (1 L) pelo acréscimo de água destilada.

Este meio requeria esterilização por filtração, utilizando-se para este fim, um kitassato acoplado a bomba de vácuo e utilizando-se membranas filtrantes (marca MILLIPORE® com tamanho de 0,22 µm) e finalmente aliquotado em frascos estéreis para armazenamento sob refrigeração ou congelamento a -10°C.

#### 3.4.4 Caldo Yeast Nitrogen base suplementado com dextrose

##### 3.4.4.1 Composição (10X)

Yeast Nitrogen Base.....	6,7 g
Dextrose.....	20,0 g
Água Destilada.....	100 mL

##### 3.4.4.2 Preparação

Após solubilização dos componentes, o meio era esterilizado por filtração nas mesmas condições descritas em 4.3.2. O meio era conservado em refrigeração ou sob congelamento a -10°C até o momento do uso. Este meio requeria sempre sua diluição a 1:10 em água destilada estéril, por ocasião de seu uso.

### 3.5 Testes de Suscetibilidade

Basicamente foram realizados de acordo com os procedimentos descritos no documento M27-A2 do NCCLS, atualmente referido como CLSI.

Neste estudo foram avaliadas um maior número de concentrações de anfotericina B do que o documento M27-A2 propõe. Assim, foram utilizadas as seguintes concentrações de



anfotericina B: 0,1 µg/mL; 0,2 µg/mL; 0,3 µg/mL; 0,4 µg/mL; 0,5 µg/mL; 0,6 µg/mL; 0,7 µg/mL; 0,8 µg/mL; 0,9 µg/mL; 1,0 µg/mL; 1,1 µg/mL; 1,2 µg/mL; 1,3 µg/mL; 1,4 µg/mL; 1,5 µg/mL; 1,6 µg/mL; 1,7 µg/mL; 1,8 µg/mL; 1,9 µg/mL; 2,0 µg/mL.

### 3.5.1 Determinação CIM

#### 3.5.1.1 Preparação das concentrações de anfotericina B

Inicialmente utilizou-se a anfotericina B em concentração de 5.120 µg/mL (estoque), da qual foram realizadas diversas diluições para se ter as vinte concentrações que o estudo requeria.

O procedimento realizado foi o seguinte: a) Anfotericina B a 640 µg/mL: 1 mL de anfotericina B concentrada 5120 µg/mL + 7 mL do meio de cultura (RPI 1640/AM3/YNBd); b) Anfotericina B a 20 µg/mL: 1 mL de anfotericina B diluída em 640 µg/mL + 31 mL do meio de cultura; c) Anfotericina B a 2,0 µg/mL: 4,5 mL de anfotericina B diluída em 20 µg/mL + 40,5 mL do meio de cultura; d) Anfotericina B a 1,9 µg/mL: 9,0 mL de anfotericina B diluída na concentração de 2,0 µg/mL + 9,0 mL de anfotericina B diluída na concentração de 1,8 µg/mL; e) Anfotericina B a 1,8 µg/mL: 3,5 mL de anfotericina B diluída em 20 µg/mL + 35,0 mL do meio de cultura; f) Anfotericina B a 1,7 µg/mL: 3,0 mL de anfotericina B diluída em 20 µg/mL + 33,0 mL do meio de cultura; g) Anfotericina B a 1,6 µg/mL: 18,0 mL de anfotericina B diluída na concentração de 1,7 µg/mL + 18,0 mL de anfotericina B diluída na concentração de 1,5 µg/mL; h) Anfotericina B a 1,5 µg/mL: 3,0 mL de anfotericina B diluída em 20 µg/mL + 36,0 mL do meio de cultura; i) Anfotericina B a 1,4 µg/mL: 2,0 mL de anfotericina B diluída em 20 µg/mL + 26,0 mL do meio de cultura; j) Anfotericina B a 1,3 µg/mL: 1,5 mL de anfotericina B diluída em 20 µg/mL + 21,0 mL do meio de cultura; l) Anfotericina B a 1,2 µg/mL: 2,0 mL de anfotericina B diluída em 20 µg/mL + 32,0 mL do meio de cultura; m) Anfotericina B a 1,1 µg/mL: 1,0 mL de anfotericina B diluída em 20 µg/mL + 17 mL do meio de cultura; n) Anfotericina B a 1,0 µg/mL: 14,0 mL de anfotericina B diluída na concentração de 2,0 µg/mL + 14 mL do meio de cultura; o) Anfotericina B a 0,9 µg/mL: 9,0 mL de anfotericina B diluída na concentração de 1,8 µg/mL +

9,0 mL do meio de cultura; p) Anfotericina B a 0,8 µg/mL: 17,0 mL de anfotericina B diluída na concentração de 1,6 µg/mL + 17,0 mL do meio de cultura; q) Anfotericina B a 0,7 µg/mL: 9,0 mL de anfotericina B diluída na concentração de 1,4 µg/mL + 9,0 do meio de cultura; r) Anfotericina B a 0,6 µg/mL: 14,0 mL de anfotericina B diluída na concentração de 1,2 µg/mL + 14,0 mL do meio de cultura; s) Anfotericina B a 0,5 µg/mL: 9,0 mL de anfotericina B diluída na concentração de 1,0 µg/mL + 9,0 mL do meio de cultura; t) Anfotericina B a 0,4 µg/mL: 16,0 mL de anfotericina B diluída na concentração de 0,8 µg/mL + 16,0 mL do meio de cultura; u) Anfotericina B a 0,3 µg/mL: 9,0 mL de anfotericina B diluída na concentração de 0,6 µg/mL + 9,0 mL do meio de cultura; v) Anfotericina B a 0,2 µg/mL: 14,0 mL de anfotericina B diluída na concentração de 0,4 µg/mL + 14,0 mL do meio de cultura; x) Anfotericina B a 0,1 µg/mL: 9,0 mL de anfotericina B diluída na concentração de 0,2 µg/mL + 9,0 mL do meio de cultura.

A anfotericina B, nestas concentrações, era armazenada em microtubos do tipo EPPENDORF® sob refrigeração a -10°C, até momento do uso.

#### 3.5.1.2 Ativação dos inóculos

Com 24 horas de antecedência à realização dos ensaios, os cultivos eram repicados para ágar Sabouraud dextrose e incubados a 35°C. Só eram selecionados para o ensaio os cultivos que evidenciavam crescimento vigoroso e ausência de contaminação bacteriana ou fúngica. Exame direto a fresco das colônias de cada cultivo era realizado para comprovação da pureza e adequação das amostras.

#### 3.5.1.3 Preparação do inóculo

Em tubos de ensaio contendo 2,0 mL de água destilada estéril, era agregada parte da colônia fúngica que, após rápida agitação para homogeneização, tornava o meio turvo. Esta turvação era ajustada pelo acréscimo de água destilada estéril ou de cultura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 530 nm devendo resultar em transmitância entre 88 a 92%.

Após esta primeira padronização, todos os inóculos eram diluídos a 1:20 em água destilada e, em seguida, nova diluição (1:50) com o meio de cultura a ser empregado.

#### 3.5.1.4 Execução da prova

Em placas de microtitulação de poliestireno com 96 poços (12 x 8) e com tampa (NUNC<sup>®</sup>) estéreis, eram depositados volumes de 100 µL das diferentes concentrações (20) de anfotericina B. A cada concentração de anfotericina B agregou-se posteriormente, 100 µL do inoculo padronizado e diluído, de modo a resultar em cada poço  $2,5 - 5,0 \times 10^3$  UFC/mL.

A seguir, as placas eram incubadas, com tampa, a 35°C durante 48 horas.

O controle de esterilidade do meio e da droga foi realizado como segue: numa das colunas da placa eram depositadas todas as concentrações de anfotericina B avaliadas (100 µL) às quais não se agregava o inóculo. Após o período de incubação a ausência de indícios de turvação, referente a crescimento microbiano, era indicativo da esterilidade do meio.

Para o controle dos inóculos, os tubos de ensaio contendo volumes excedentes da preparação dos inóculos eram também incubados no mesmo período e temperatura dos testes. Assim, após 48 horas de incubação, a presença de turvação era referente ao crescimento fúngico adequado.

#### 3.5.1.5 Leitura dos testes e determinação das CIMs

Após 48 horas de incubação a 35°C, observava-se o crescimento nos controles dos inóculos e nos controles de esterilidade do meio e da droga. Quando ambos evidenciavam as condições esperadas, passava-se a leitura dos testes. A menor concentração da droga que evidenciava completa ausência de crescimento microbiano, era registrada como CIM. Como os testes foram realizados em triplicada, requeria-se, no mínimo, duas concordâncias para aceitação do resultado.

### 3.5.2 Determinação da CFM

Após a determinação das CIMs, todas as concentrações de anfotericina B que inibiam o crescimento microbiano, eram subcultivadas em agar Sabouraud dextrose isento de antifúngicos, incubando-se a 35°C/48 horas. A menor concentração de anfotericina B capaz de causar a morte do inóculo fúngico foi considerada concentração fungicida mínima.

### 3.6 Análise estatística

Nas comparações entre os resultados de CIMs ou entre os resultados de CFMs, agrupados conforme a instituição hospitalar, espécie de *Candida*, candidemia com óbito ou não e meio de cultivo utilizado, considerou-se o número de variáveis em cada uma destas relações avaliadas.

Nas comparações envolvendo duas variáveis, empregou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon. Quando, porém, as comparações envolviam três ou mais variáveis, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Comparação das variações na suscetibilidade de *Candida spp* isoladas de pacientes que evoluíram ao óbito ou sobreviveram a candidemias, com base em testes empregando o caldo RPMI 1640

Utilizando-se o Caldo RPMI 1640 tamponado, avaliou-se a suscetibilidade de leveduras do gênero *Candida* provenientes de pacientes internados no HUSM, HCPA e SCPA, todos com episódios de candidemia.

Os isolados do gênero *Candida* foram agrupados pelas espécies em *Candida albicans* e *Candida não-albicans* e também pelo desfecho dos episódios de candidemia, gerando quatro grupos: a) *Candida albicans* de pacientes que evoluíram ao óbito (Grupo I); b) *Candida não-albicans* dos pacientes que evoluíram ao óbito (Grupo II); c) *Candida albicans* dos pacientes que sobreviveram às candidemias (Grupo III); d) *Candida não-albicans* dos pacientes que sobreviveram às candidemias (Grupo IV).

No âmbito do HUSM, as CIMs e CFMs dos grupos I e II (Tabelas 1 e 2), não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com os isolados dos grupos III e IV (Tabelas 3 e 4) ( $p>0,05$ ; Teste de Wilcoxon). Quando se compara a suscetibilidade do gênero *Candida*, observou-se que as CIMs e CFMs dos isolados de pacientes que evoluíram ao óbito não evidenciaram diferenças estatísticas significativas dos mesmos parâmetros dos isolados de pacientes que sobreviveram ( $p>0,05$ ; Teste de Wilcoxon).

**TABELA 1 – Variação da suscetibilidade de *Candida albicans* a anfotericina B, utilizando-se o meio RPMI 1640 para isolados de pacientes que evoluíram ao óbito, em três hospitais do Rio Grande do Sul**

Parâmetros para suscetibilidade- $\mu\text{g/mL}$	HUSM	HCPA	SCPA	Geral
Variação das CIMs	0,4-0,6	0,1-0,6	0,3-0,6	0,1-0,6
CIM <sub>50</sub>	0,4	0,5	0,4	0,4
CIM <sub>90</sub>	0,6	0,6	0,6	0,6
Variação das CFMs	0,5-0,8	0,3-0,9	0,5-0,6	0,3-0,9
CFM <sub>50</sub>	0,6	0,6	0,5	0,6
CFM <sub>90</sub>	0,8	0,8	0,6	0,8

**TABELA 2 – Variação da suscetibilidade de *Candida não-albicans* a anfotericina B, utilizando-se o meio RPMI 1640 para isolados de pacientes que evoluíram ao óbito, em três hospitais do Rio Grande do Sul**

<b>Parâmetros para suscetibilidade-<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math></b>	<b>HUSM</b>	<b>HCPA</b>	<b>SCPA</b>	<b>Geral</b>
Varição das CIMs	0,2-0,5	0,2-0,8	0,2-0,5	0,2-0,8
CIM <sub>50</sub>	0,4	0,4	0,3	0,4
CIM <sub>90</sub>	0,5	0,7	0,5	0,7
Varição das CFMs	0,4-0,7	0,3-1,0	0,3-0,6	0,3-0,9
CFM <sub>50</sub>	0,7	0,7	0,5	0,6
CFM <sub>90</sub>	0,7	1,0	0,6	1,0

**TABELA 3 – Variação da suscetibilidade de *Candida albicans* a anfotericina B, utilizando-se o meio RPMI 1640 para isolados de pacientes que sobreviveram, em três hospitais do Rio Grande do Sul**

<b>Parâmetros para suscetibilidade-<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math></b>	<b>HUSM</b>	<b>HCPA</b>	<b>SCPA</b>	<b>Geral</b>
Varição das CIMs	0,1-0,7	0,1-0,6	0,4-0,6	0,1-0,7
CIM <sub>50</sub>	0,4	0,4	0,4	0,4
CIM <sub>90</sub>	0,6	0,6	0,6	0,6
Varição das CFMs	0,2-0,8	0,1-0,8	0,5-0,7	0,1-0,8
CFM <sub>50</sub>	0,5	0,6	0,6	0,5
CFM <sub>90</sub>	0,7	0,7	0,7	0,7

**TABELA 4 – Variação da suscetibilidade de *Candida não-albicans* a anfotericina B, utilizando-se o meio RPMI 1640 para isolados de pacientes que sobreviveram, em três hospitais do Rio Grande do Sul**

<b>Parâmetros para suscetibilidade-<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math></b>	<b>HUSM</b>	<b>HCPA</b>	<b>SCPA</b>	<b>Geral</b>
Varição das CIMs	0,1-0,6	0,1-0,5	0,1-0,6	0,1-0,6
CIM <sub>50</sub>	0,5	0,4	0,3	0,4
CIM <sub>90</sub>	0,6	0,4	0,4	0,5
Varição das CFMs	0,1-0,9	0,2-0,8	0,2-0,6	0,1-0,9
CFM <sub>50</sub>	0,5	0,5	0,4	0,5
CFM <sub>90</sub>	0,9	0,7	0,5	0,7

Já no âmbito do HCPA, as CIMs e CFMs de *Candida albicans* dos pacientes que evoluíram ao óbito não diferiram estatisticamente dos parâmetros de suscetibilidade das isoladas dos pacientes que sobreviveram às candidemias (Tabelas 1 e 3) ( $p > 0,05$ ; Teste de Wilcoxon). Por outro lado, as CIMs e CFMs de *Candida* não *albicans* isoladas de pacientes que evoluíram ao óbito, foram significativamente maiores do que os parâmetros observados nos isolados dos sobreviventes (Tabelas 2 e 4) ( $p < 0,05$ ; Teste de Wilcoxon). Da mesma forma, reunindo-se os isolados de *Candida albicans* e *Candida* não *albicans*, num só grupo, observou-se que as CIMs e CFMs dos isolados dos pacientes que evoluíram ao óbito foram significativamente maiores do que os mesmos parâmetros dos isolados dos sobreviventes (Tabelas 1, 2, 3, 4) ( $p < 0,05$ ; Teste de Wilcoxon).

Na SCPA, as CIMs e CFMs para *Candida albicans* isoladas dos pacientes que evoluíram ao óbito, não diferiram significativamente das CIMs e CFMs para *Candida albicans* dos sobreviventes (Tabelas 1 e 3) ( $p > 0,05$ ; Teste de Wilcoxon). As comparações das CIMs para *Candida* não *albicans* também não evidenciaram diferenças entre os grupos óbito e sobrevivência (Tabelas 2 e 4) ( $p > 0,05$ ; Teste de Wilcoxon). Todavia, as CFMs para *Candida* não *albicans*, dos pacientes que evoluíram ao óbito foram significativamente maiores do que as CFMs dos isolados dos sobreviventes (Tabelas 2 e 4) ( $p < 0,05$ ; Teste de Wilcoxon). Considerando-se apenas o gênero *Candida*, sem dividi-lo em *Candida albicans* e *Candida* não *albicans*, não se observaram diferenças significativas nas CIMs e CFMs dos isolados provenientes do grupo que evoluiu ao óbito com às dos sobreviventes ( $p > 0,05$ ; Teste de Wilcoxon).

Ao reunir os isolados de *Candida albicans* dos três hospitais, verificou-se que as CIMs e CFMs das leveduras isoladas de pacientes que evoluíram ao óbito (Grupo I), não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, quando comparadas com as CIMs e CFMs de *Candida albicans* isoladas de pacientes que sobreviveram às candidemias (Grupo III) ( $p > 0,05$ ; Teste de Wilcoxon). Da mesma forma, também não observou-se diferenças estatísticas significativas quando comparou-se as CIMs e CFMs de *Candida* não *albicans* isoladas de pacientes que evoluíram ao óbito (Grupo II), em relação as CIMs e CFMs de *Candida* não *albicans* isoladas de pacientes que sobreviveram às candidemias (Grupo IV), também dos três hospitais ( $p > 0,05$ ; Teste de Wilcoxon). Agrupando-se *Candida albicans* e *Candida* não *albicans* em um único grupo, dos três hospitais, verificou-se que as CIMs e CFMs não evidenciaram diferenças estatisticamente

significativas ao se considerar se provinham do grupo de pacientes que evoluiu ao óbito ou dos que sobreviveram às candidemias ( $p > 0,05$ ; Teste de Wilcoxon).

Ao se comparar as CIMs e CFMs apenas de *Candida albicans* dos três hospitais, não foram detectadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ; Teste de Kruskal-Wallis). Na comparação dos mesmos parâmetros entre *Candida não albicans*, observou-se que as comparações dos isolados do HUSM e da SCPA com os do HCPA não evidenciaram diferenças das CIMs e CFMs ( $p > 0,05$ ; Teste de Kruskal Wallis); mas as do HUSM foram estatisticamente maiores que as da SCPA, tanto para as CIMs, como também para as CFMs ( $p < 0,05$ ; Teste de Kruskal-Wallis).

Observando a suscetibilidade (CIM e CFM) de leveduras do gênero *Candida*, isoladas de episódios de candidemias, entre os três hospitais estudados, não foram detectadas diferenças significativas entre o HUSM e o HCPA; também não se detectou diferenças significativas nos parâmetros de suscetibilidade entre os isolados do HCPA e os da SCPA ( $p > 0,05$ ; Teste de Kruskal-Wallis). Por outro lado, ao se comparar os parâmetros de suscetibilidade dos isolados do HUSM com os da SCPA, os valores de CIM e CFM do HUSM foram estatisticamente maiores que os valores da SCPA ( $p < 0,05$ ; Teste de Kruskal-Wallis).

#### **4.2 Variações na suscetibilidade de *Candida* spp isoladas de pacientes que evoluíram ao óbito ou sobreviveram a candidemias, com base em testes empregando caldo AM3**

Utilizando-se o caldo AM3, avaliou-se a suscetibilidade de leveduras do gênero *Candida* provenientes de pacientes internados no HUSM, HCPA e SCPA, todos com episódios de candidemias.

No âmbito do HUSM, as CIMs e CFMs de *Candida albicans* (Grupo I) bem como *Candida não albicans* (Grupo II) isoladas de pacientes que evoluíram ao óbito (Tabelas 5 e 6) não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com os isolados de pacientes que sobreviveram às candidemias (Grupos III e IV) (Tabelas 7 e 8) ( $p > 0,05$ ; Teste de Wilcoxon). Considerando-se a suscetibilidade do gênero *Candida* observou-se que as CIMs e CFMs dos isolados de pacientes que evoluíram ao óbito não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas dos mesmos parâmetros dos isolados de pacientes sobreviventes ( $p > 0,05$ ; Teste de Wilcoxon).



**TABELA 5 – Variação da suscetibilidade de *Candida albicans* a anfotericina B, utilizando-se o meio AM3 para isolados de pacientes que evoluíram ao óbito, em três hospitais do Rio Grande do Sul**

<b>Parâmetros para suscetibilidade-<math>\mu\text{g/mL}</math></b>	<b>HUSM</b>	<b>HCPA</b>	<b>SCPA</b>	<b>Geral</b>
Faixa de CIM	0,5–0,9	0,2-0,8	0,5-0,8	0,2-0,9
CIM <sub>50</sub>	0,6	0,6	0,7	0,6
CIM <sub>90</sub>	0,9	0,7	0,7	0,8
Faixa de CFM	0,6-1,3	0,4-1,2	0,6-1,0	0,4-1,3
CFM <sub>50</sub>	0,8	0,9	0,7	0,8
CFM <sub>90</sub>	1,3	1,1	0,9	1,2

**TABELA 6 – Variação da suscetibilidade de *Candida não-albicans* a anfotericina B, utilizando-se o meio AM3 para isolados de pacientes que evoluíram ao óbito, em três hospitais do Rio Grande do Sul**

<b>Parâmetros para suscetibilidade-<math>\mu\text{g/mL}</math></b>	<b>HUSM</b>	<b>HCPA</b>	<b>SCPA</b>	<b>Geral</b>
Faixa de CIM	0,3-0,9	0,2-1,2	0,2-0,7	0,2-1,2
CIM <sub>50</sub>	0,7	0,7	0,5	0,6
CIM <sub>90</sub>	0,9	1,0	0,7	0,9
Faixa de CFM	0,8-1,5	0,3-1,5	0,3-1,3	0,3-1,5
CFM <sub>50</sub>	1,3	0,8	0,7	0,8
CFM <sub>90</sub>	1,5	1,4	1,1	1,4

**TABELA 7 – Variação da suscetibilidade de *Candida albicans* a anfotericina B, utilizando-se o meio AM3 para isolados de pacientes que sobreviveram, em três hospitais do Rio Grande do Sul**

<b>Parâmetros para suscetibilidade-<math>\mu\text{g/mL}</math></b>	<b>HUSM</b>	<b>HCPA</b>	<b>SCPA</b>	<b>Geral</b>
Faixa de CIM	0,3-0,8	0,2-0,8	0,6-0,8	0,2-0,8
CIM <sub>50</sub>	0,6	0,5	0,6	0,6
CIM <sub>90</sub>	0,7	0,7	0,8	0,7
Faixa de CFM	0,4-1,0	0,2-1,1	0,6-1,0	0,2-1,1
CFM <sub>50</sub>	0,7	0,7	0,7	0,7
CFM <sub>90</sub>	1,0	0,9	1,0	1,0

**TABELA 8 – Variação da suscetibilidade de *Candida não-albicans* a anfotericina B, utilizando-se o meio AM3 para isolados de pacientes que sobreviveram, em três hospitais do Rio Grande do Sul**

<b>Parâmetros para suscetibilidade-<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math></b>	<b>HUSM</b>	<b>HCPA</b>	<b>SCPA</b>	<b>Geral</b>
Faixa de CIM	0,3-0,9	0,2-0,6	0,2-0,7	0,2-0,9
CIM <sub>50</sub>	0,7	0,4	0,4	0,4
CIM <sub>90</sub>	0,9	0,5	0,6	0,7
Faixa de CFM	0,3-1,5	0,2-0,9	0,3-1,1	0,2-1,5
CFM <sub>50</sub>	0,7	0,7	0,6	0,7
CFM <sub>90</sub>	1,4	0,8	1,0	1,0

No HCPA, as CIMs e CFMs de *Candida albicans* dos pacientes que evoluíram ao óbito não diferiram estatisticamente dos parâmetros de suscetibilidade dos isolados de pacientes que sobreviveram às candidemias (Tabelas 5 e 7) ( $p > 0,05$ ; Teste de Wilcoxon). Ao se comparar as suscetibilidades de *Candida não albicans*, as CIMs e CFMs dos isolados de pacientes que evoluíram ao óbito (Grupo II) foram significativamente mais elevadas do que os mesmos parâmetros observados entre isolados de pacientes sobreviventes (Grupo IV) ( $p < 0,05$ ; Teste de Wilcoxon). Quando se considerou o gênero *Candida* como um só grupo, as CIMs e CFMs dos isolados dos pacientes que evoluíram ao óbito (Grupo I e II) foram significativamente maiores do que os mesmos parâmetros nos isolados dos pacientes que sobreviveram às candidemias (Grupos III e IV) ( $p < 0,05$ ; Teste de Wilcoxon).

Na SCPA as CIMs e CFMs de *Candida albicans* (Grupo I) bem como de *Candida não albicans* (Grupo II), isoladas de pacientes que evoluíram ao óbito (Tabelas 5 e 6) não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com os isolados de pacientes que sobreviveram às candidemias (Grupos III e IV) (Tabelas 7 e 8) ( $p > 0,05$ ; Teste de Wilcoxon). Quando, porém, se considerou o gênero *Candida* como um só grupo, as CIMs e CFMs dos isolados dos pacientes que evoluíram ao óbito (Grupos I e II) foram significativamente maiores do que os mesmos parâmetros nos isolados dos pacientes que sobreviveram às candidemias (Grupos III e IV) ( $p < 0,05$ ; Teste de Wilcoxon).

Quando se reuniu os isolados de *Candida albicans* dos três hospitais, verificou-se que as CIMs e CFMs de *Candida albicans* isoladas de pacientes que evoluíram ao óbito, eram significativamente maiores do que os mesmos parâmetros nos isolados dos sobreviventes ( $p < 0,05$ ; Teste de Wilcoxon). Comportamento idêntico foi observado quando se considerou o

grupo *Candida* não *albicans*, onde os pacientes que evoluíram ao óbito evidenciaram CIMs e CFMs maiores do que as dos pacientes que sobreviveram às candidemias ( $p < 0,05$ ; Teste de Wilcoxon).

Finalmente, somando-se os três hospitais, quando se considerou todo o gênero *Candida*, as CIMs e CFMs dos isolados dos pacientes que evoluíram ao óbito foram significativamente maiores do que as CIMs e CFMs observadas nos isolados de pacientes que sobreviveram às candidemias ( $p < 0,05$ ; Teste de Wilcoxon).

Quando se particulariza a espécie *Candida albicans* e compara-se a suscetibilidade entre as instituições hospitalares, observamos que não há diferenças entre o HUSM e a SCPA ou entre o HUSM e o HCPA para os valores das CIMs e CFMs ( $p > 0,05$ ; Teste de Kruskal-Wallis); todavia comparando-se a SCPA com o HCPA, os parâmetros de suscetibilidade da SCPA foram maiores que os do HCPA ( $p < 0,05$ ; Teste de Kruskal-Wallis).

Ao se particularizar o grupo *Candida* não *albicans* e se comparar a suscetibilidade destes isolados nas três instituições hospitalares, observou-se que os isolados do HUSM são similares aos do HCPA e os do HCPA não diferem dos da SCPA ( $p > 0,05$ ; Teste de Kruskal-Wallis). Todavia, ao compararmos os parâmetros de suscetibilidade do HUSM com a SCPA, os parâmetros do HUSM foram estatisticamente maiores que os obtidos na SCPA ( $p < 0,05$ ; Teste de Kruskal-Wallis).

Ao considerarmos o gênero *Candida* (*Candida albicans* e *Candida* não *albicans*) em cada hospital, observamos que: a) Os parâmetros de suscetibilidade (CIM e CFM) foram similares entre o HCPA e a SCPA ( $p > 0,05$ ; Teste de Kruskal-Wallis); b) Também não se observou diferenças significativas entre resultados do HUSM e da SCPA ( $p > 0,05$ ; Teste de Kruskal-Wallis); c) Os parâmetros de suscetibilidade (CIM e CFM) do HUSM foram significativamente maiores que os do HCPA ( $p < 0,05$ ; Teste de Kruskal-Wallis).

#### **4.3 Comparação das variações na suscetibilidade de *Candida* spp isoladas de pacientes que evoluíram ao óbito ou sobreviveram a candidemias, com base em testes empregando o caldo YNB-dextrose**

Utilizando-se o caldo YNB-dextrose, avaliou-se a suscetibilidade de leveduras do gênero *Candida* provenientes de pacientes internados no HUSM, HCPA e SCPA, todos com episódios de candidemia.

No HUSM, as CIMs e CFMs de *Candida albicans* (Grupo I), bem como de *Candida não albicans* (Grupo II), isoladas de pacientes que evoluíram ao óbito (Tabelas 9 e 10) não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com os isolados de pacientes que sobreviveram às candidemias (Grupos III e IV) (Tabelas 11 e 12) ( $p>0,05$ ; Teste de Wilcoxon). Considerando-se a suscetibilidade do gênero *Candida*, observou-se que as CIMs e CFMs dos isolados de pacientes que evoluíram ao óbito não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas dos mesmos parâmetros dos isolados de pacientes sobreviventes ( $p>0,05$ ; Teste de Wilcoxon).

**TABELA 9 – Variação da suscetibilidade de *Candida albicans* a anfotericina B, utilizando-se o meio YNB-dextrose para isolados de pacientes que evoluíram ao óbito, em três hospitais do Rio Grande do Sul**

Parâmetros para suscetibilidade- $\mu\text{g/mL}$	HUSM	HCPA	SCPA	Geral
Faixa de CIM	0,5-1,0	0,2-1,0	0,5-0,9	0,2-1,0
CIM <sub>50</sub>	0,5	0,7	0,7	0,7
CIM <sub>90</sub>	0,9	0,9	0,9	0,9
Faixa de CFM	0,6-1,2	0,4-1,2	0,6-1,0	0,4-1,2
CFM <sub>50</sub>	0,8	0,8	0,8	0,8
CFM <sub>90</sub>	1,2	1,1	0,9	1,2

**TABELA 10 – Variação da suscetibilidade de *Candida não-albicans* a anfotericina B, utilizando-se o meio YNB-dextrose para isolados de pacientes que evoluíram ao óbito, em três hospitais do Rio Grande do Sul**

Parâmetros para suscetibilidade- $\mu\text{g/mL}$	HUSM	HCPA	SCPA	Geral
Faixa de CIM	0,3-0,9	0,4-1,0	0,3-0,8	0,3-1,0
CIM <sub>50</sub>	0,6	0,7	0,6	0,6
CIM <sub>90</sub>	0,9	0,9	0,8	0,9
Faixa de CFM	0,6-1,2	0,4-1,2	0,3-1,1	0,3-1,2
CFM <sub>50</sub>	0,9	0,9	0,7	0,8
CFM <sub>90</sub>	1,2	1,2	1,0	1,2

**TABELA 11 – Variação da suscetibilidade de *Candida albicans* a anfotericina B, utilizando-se o meio YNB-dextrose para isolados de pacientes que sobreviveram, em três hospitais do Rio Grande do Sul**

<b>Parâmetros para suscetibilidade-<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math></b>	<b>HUSM</b>	<b>HCPA</b>	<b>SCPA</b>	<b>Geral</b>
Faixa de CIM	0,4-0,8	0,2-0,8	0,6-0,7	0,2-0,8
CIM <sub>50</sub>	0,6	0,5	0,7	0,6
CIM <sub>90</sub>	0,8	0,7	0,7	0,8
Faixa de CFM	0,5-1,0	0,2-1,0	0,7-1,0	0,2-1,0
CFM <sub>50</sub>	0,7	0,7	0,7	0,7
CFM <sub>90</sub>	1,0	0,9	1,0	1,0

**TABELA 12 – Variação da suscetibilidade de *Candida não-albicans* a anfotericina B, utilizando-se o meio YNB-dextrose para isolados de pacientes que sobreviveram, em três hospitais do Rio Grande do Sul**

<b>Parâmetros para suscetibilidade-<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math></b>	<b>HUSM</b>	<b>HCPA</b>	<b>SCPA</b>	<b>Geral</b>
Faixa de CIM	0,3-0,9	0,2-0,7	0,3-0,8	0,2-0,9
CIM <sub>50</sub>	0,7	0,5	0,5	0,5
CIM <sub>90</sub>	0,8	0,6	0,7	0,7
Faixa de CFM	0,6-1,5	0,2-1,0	0,3-1,1	0,2-1,5
CFM <sub>50</sub>	0,7	0,7	0,6	0,7
CFM <sub>90</sub>	1,3	0,9	1,0	1,0

No âmbito do HCPA, ao se particularizar o grupo de *Candida albicans*, os parâmetros de suscetibilidade (CIMs e CFMs) dos isolados de pacientes que evoluíram ao óbito (Grupo I) não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas daqueles obtidos com isolados que sobreviveram às candidemias ( $p > 0,05$ ; Teste de Wilcoxon). Por outro lado quando se avaliou o grupo *Candida não albicans*, observou-se que as CIMs e CFMs dos isolados de pacientes que evoluíram ao óbito foram estatisticamente mais elevadas do que os observados entre isolados de pacientes que sobreviveram (Tabelas 10 e 12) ( $p > 0,05$ ; Teste de Wilcoxon). Ainda se observou que os parâmetros de suscetibilidade para o gênero *Candida* foram estatisticamente mais elevados entre os isolados dos pacientes que evoluíram ao óbito do que os observados com isolados de pacientes que sobreviveram às candidemias ( $p > 0,05$ ; Teste de Wilcoxon).

Na SCPA, as CIMs e CFMs de *Candida albicans* (Grupo I) bem como de *Candida* não *albicans* (Grupo II) isoladas de pacientes que evoluíram ao óbito (Tabelas 9 e 10) não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com os isolados de pacientes que sobreviveram às candidemias ( $p > 0,05$ ; Teste de Wilcoxon). Considerando-se o gênero *Candida*, as CIMs e CFMs dos isolados de pacientes que evoluíram ao óbito foram significativamente mais elevadas do que os mesmos parâmetros dos isolados de pacientes que sobreviveram às candidemias ( $p < 0,05$ ; Teste de Wilcoxon).

Quando se reuniu os isolados de *Candida albicans* dos três hospitais, verificou-se que as CIMs e CFMs de *Candida albicans* isoladas de pacientes que evoluíram ao óbito, eram significativamente maiores do que os mesmos parâmetros nos isolados dos sobreviventes ( $p < 0,05$ ; Teste de Wilcoxon). Comportamento igual observou-se quando se considerou o grupo *Candida* não *albicans*, onde os pacientes que evoluíram ao óbito evidenciaram CIMs e CFMs maiores do que as dos pacientes que sobreviveram às candidemias ( $p < 0,05$ ; Teste de Wilcoxon).

Da mesma forma, somando-se os três hospitais, quando se considerou todo o gênero *Candida*, as CIMs e CFMs dos isolados dos pacientes que evoluíram ao óbito foram significativamente maiores do que as CIMs e CFMs observadas nos isolados de pacientes que sobreviveram às candidemias ( $p < 0,05$ ; Teste de Wilcoxon).

Quando se comparou as CIMs de *Candida albicans* entre os três hospitais, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ; Teste de Kruskal-Wallis). Por outro lado, quando se comparou as CFMs de *Candida albicans* entre os três hospitais, não se constatou diferenças significativas entre o HUSM e o HCPA ou entre o HUSM e a SCPA, entretanto, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as CFMs obtidas com os isolados da SCPA, que foram maiores do que as CFMs obtidas nos isolados do HCPA ( $p < 0,05$ ; Teste de Kruskal-Wallis).

Quando se comparou os padrões de suscetibilidade (CIMs e CFMs) de *Candida* não *albicans* entre os três hospitais, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes ( $p > 0,05$ ; Teste de Kruskal-Wallis).

Quando se comparou a suscetibilidade do gênero *Candida*, entre os três hospitais, os testes estatísticos não revelaram diferenças significativas entre os três grupos ( $p > 0,05$ ; Teste de Kruskal-Wallis).

#### 4.4 Comparação entre os diferentes meios de cultura utilizados para a avaliação da suscetibilidade de *Candida* spp isoladas de episódios de candidemia a anfotericina B, em três hospitais do Rio Grande do Sul

Inicialmente comparou-se a suscetibilidade dos isolados considerando-se apenas a instituição hospitalar de origem. Os isolados foram, para tanto, agrupados em *Candida albicans* e os demais como *Candida* não-*albicans*. Também se considerou a suscetibilidade de todos os isolados, de cada instituição.

A Tabela 13 evidencia as diferenças entre as suscetibilidades, com base nas CIMs e/ou CFMs. Ressalta-se que o caldo AM3 foi o que melhor constatou diferenças entre os grupos e que os isolados do HUSM evidenciaram menor sensibilidade a anfotericina B, quando se comparou *Candida* não-*albicans* ou se considerou o total dos isolados. O caldo YNBd foi o que constatou menores diferenças de suscetibilidade entre os isolados. Por outro lado, a única discrepância observada, foi quando se comparou a suscetibilidade do gênero *Candida*, entre os hospitais, utilizando-se o caldo RPMI 1640.

**TABELA 13 – Variação na suscetibilidade (CIMs e CFMs) de *Candida* spp a anfotericina B em função do meio utilizado nos testes, frente a isolados de candidemia, em três hospitais do Rio Grande do Sul**

Grupos comparados (Teste de Kruskal-Wallis)	Meio: Caldo RPMI 1640	Meio: Caldo AM3	Meio: Caldo YNBd
I(A) x I(B) x I(C)	ns	C>B <sup>a</sup>	C>B <sup>b</sup>
II(A) x II(B) x II(C)	A>C <sup>a</sup>	A>C <sup>a</sup>	ns
III(A) x III(B) x III(C)	A>C <sup>a</sup>	A>B <sup>a</sup>	ns

<sup>a</sup> As diferenças foram observadas nas CIMs e CFMs (p<0,05)

<sup>b</sup> As diferenças só foram observadas nas CFMs (p<0,05)

A (HUSM)

B (HCPA)

C (SCPA)

I *Candida albicans*

II *Candida* não-*albicans*

III Gênero *Candida*

ns Não Significativo

A seguir, passou-se a comparar a suscetibilidade de *Candida* spp levando-se em consideração o desfecho do episódio de candidemia (sobrevivência ou óbito) do qual foram

isolados, no contexto de cada instituição, bem como num contexto mais amplo, desconsiderando-se a instituição de origem. A Tabela 14 resume estas constatações e seus achados.

**TABELA 14 – Comparações da suscetibilidade (CIMs e CFMs) de *Candida* spp a anfotericina B, em função do meio utilizado nos testes, frente a isolados de pacientes que sobreviveram ou não, a episódios de candidemia, em três hospitais do Rio Grande do Sul**

Grupos comparados (Teste de Wilcoxon)	Meio: Caldo RPMI 1640	Meio: Caldo AM3	Meio: Caldo YNBd
I(A)(s) x I(A)(ob)	ns	ns	ns
II(A)(s) x II(A)(ob)	ns	ns	ns
III(A)(s) x III(A)(ob)	ns	ns	ns
I(B)(s) x I(B)(ob)	ns	ns	ns
II(B)(s) x II(B)(ob)	ob>s <sup>a</sup>	ob>s <sup>a</sup>	ob>s <sup>a</sup>
III(B)(s) x III(B)(ob)	ob>s <sup>a</sup>	ob>s <sup>a</sup>	ob>s <sup>a</sup>
I(C)(s) x I(C)(ob)	ns	ns	ns
II(C)(s) x II(C)(ob)	ob>s <sup>b</sup>	ns	ns
III(C)(s) x III(C)(ob)	ns	ob>s <sup>a</sup>	ob>s <sup>a</sup>
I(A+B+C)(s) x I(A+B+C)(ob)	ns	ob>s <sup>a</sup>	ob>s <sup>a</sup>
II(A+B+C)(s) x II(A+B+C)(ob)	ns	ob>s <sup>a</sup>	ob>s <sup>a</sup>
III(A+B+C)(s) x III(A+B+C)(ob)	ns	ob>s <sup>a</sup>	ob>s <sup>a</sup>

<sup>a</sup> As diferenças foram observadas nas CIMs e CFMs ( $p < 0,05$ )

<sup>b</sup> As diferenças só foram observadas nas CFMs ( $p < 0,05$ )

A (HUSM)

B (HCPA)

C (SCPA)

I *Candida albicans*

II *Candida* não-*albicans*

III Gênero *Candida*

s Sobrevivência

ob Óbito

ns Não Significativo

No âmbito do HUSM, nenhum meio empregado foi capaz de constatar diferenças de suscetibilidade entre os grupos estudados.

Já nos isolados do HCPA, os três meios utilizados detectaram que os grupos *Candida* não-*albicans* e gênero *Candida* provenientes de episódios que evoluíram ao óbito foram menos sensíveis a anfotericina B do que as dos pacientes que sobreviveram ( $p < 0,05$ ; Teste de Wilcoxon). Nas demais comparações, os resultados foram variáveis.



Considerando-se somente o caldo RPMI 1640, as diferenças de suscetibilidade a anfotericina B, entre os isolados, foram detectadas em três situações; com o caldo AM3 as diferenças foram detectadas em seis situações e em seis situações também quando se utilizou o caldo YNB-dextrose.

Os três meios concordaram entre si somente quando se comparou os grupos de *Candida* não-*albicans* e o gênero *Candida* do HCPA, considerando-se o óbito ou sobrevivência dos pacientes; em todas as situações as leveduras isoladas de pacientes que evoluíram ao óbito foram significativamente menos sensíveis do que as isoladas dos sobreviventes às candidemias.

Os caldos AM3 e YNB-dextrose concordaram entre si nas seis ocasiões em que detectaram diferenças de suscetibilidade a anfotericina B, enquanto o caldo RPMI 1640 só concordou em duas ocasiões.

**TABELA 15 – Variação das médias aritméticas (desvio padrão), faixa de variação e médias geométricas das CIMs e CFMs a anfotericina B obtidas por 3 meios de cultura, para *Candida* spp. isoladas de pacientes que evoluíram ao óbito ou sobreviveram a episódios de candidemias.**

Meios	CIM		CFM	
	Óbito	Sobrevivência	Óbito	Sobrevivência
AM3	0,63(±0,19)µg/mL média aritmética	0,51(±0,16)µg/mL média aritmética	0,88(±0,26)µg/mL média aritmética	0,66(±0,26)µg/mL média aritmética
	0,44 a 0,82 µg/mL faixa de variação	0,35 a 0,67 µg/mL faixa de variação	0,62 a 1,14 µg/mL faixa de variação	0,40 a 0,92 µg/mL faixa de variação
	0,58 µg/mL média geométrica	0,48 µg/mL média geométrica	0,81 µg/mL média geométrica	0,61 µg/mL média geométrica
RPMI 1640	0,44(±0,13)µg/mL média aritmética	0,68(±0,13)µg/mL média aritmética	0,62(±0,14)µg/mL média aritmética	0,49(±0,18)µg/mL média aritmética
	0,31 a 0,57 µg/mL faixa de variação	0,55 a 0,81 µg/mL faixa de variação	0,48 a 0,76 µg/mL faixa de variação	0,31 a 0,67 µg/mL faixa de variação
	0,42 µg/mL média geométrica	0,35 µg/mL média geométrica	0,59 µg/mL média geométrica	0,45 µg/mL média geométrica
YNB-dextrose	0,66(±0,19)µg/mL média aritmética	0,55(±0,15)µg/mL média aritmética	0,85(±0,22)µg/mL média aritmética	0,69(±0,23)µg/mL média aritmética
	0,47 a 0,85 µg/mL faixa de variação	0,40 a 0,70 µg/mL faixa de variação	0,63 a 1,07 µg/mL faixa de variação	0,46 a 0,92 µg/mL faixa de variação
	0,63 µg/mL média geométrica	0,53 µg/mL média geométrica	0,81 µg/mL média geométrica	0,65 µg/mL média geométrica

A Tabela 15 dispõe as médias aritméticas, faixa de variação e médias geométricas das CIMs e CFMs de *Candida* spp relacionadas ao desfecho das candidemias. Os desvios padrões das médias aritméticas não permitem a caracterização de CIMs ou CFMs, obtidas com quaisquer dos meios empregados como pontos de corte (breakpoints) que possam indicar o prognóstico das candidemias. As médias geométricas também não guardam suficientes distanciamentos para caracterizar os referidos parâmetros.

## 5 DISCUSSÃO

As doenças fúngicas têm sua incidência muito reduzida se comparadas com as doenças bacterianas e virais, apesar de, nos últimos 30 anos, evidenciaram significativa ameaça à saúde humana, sobretudo em pacientes imunocomprometidos.

Em conseqüência da menor incidência, as micoses têm tido menor desenvolvimento no campo terapêutico, contando com um número significativamente menor de fármacos para seu combate. Outra característica da terapêutica antifúngica são as freqüentes recidivas e/ou falhas terapêuticas contribuindo com a elevação das taxas de morbidade e mortalidade.

As candidíases são as mais freqüentemente diagnosticadas no homem, apresentando um espectro muito amplo, pois inclui desde onicomicoses de pequena morbidade até infecções sistêmicas generalizadas com elevados percentuais de mortalidade; nas últimas décadas, as candidemias têm se tornado uma manifestação clínica freqüente em hospitais de todas as regiões do mundo.

A terapêutica das candidemias tem sido modernizada com a aprovação de protocolos que incluem triazólicos como o voriconazol ou inibidores da síntese de glucanas como a caspofungina. Todavia, em função dos elevados custos destes medicamentos, as opções terapêuticas recaem, com enorme freqüência sobre a anfotericina B.

Conforme já descrito, este poliênico tem atividade fungistática e fungicida e efeitos adversos que requerem atenção; muitas vidas são salvas pela anfotericina B, mas as falhas terapêuticas são freqüentes e preocupantes.

Adentrando-se na questão das falhas terapêuticas, Canuto & Roderó listam as seguintes causas: a) doses inadequadas; b) absorção, distribuição ou metabolismo deficientes; c) interações medicamentosas; d) estado imunológico do paciente; e) presença de corpo estranho ou dispositivos que favoreçam a permanência do fungo; f) abscessos não drenados; g) resistência do fungo à terapêutica instituída.

Neste contexto, a necessidade de detecção da resistência tem determinado avanços laboratoriais importantes como foi o desenvolvimento das metodologias para avaliação da suscetibilidade de fungos leveduriformes (M27-A2) e para avaliação de fungos filamentosos (M38-A) ambas com a chancela do NCCLS atualmente chamado CLSI.

A disponibilidade destas técnicas gerou avanços no reconhecimento da resistência de *Candida* spp a azólicos como fluconazol e itraconazol, e mesmo na detecção de resistência cruzada entre azólicos como fluconazol e voriconazol. Por outro lado, a detecção da resistência a anfotericina B não se efetivou.

Vários autores têm abordado esta questão e as indagações recaem sobre: 1) Existe mesmo resistência a anfotericina B ou *Candida* é invariavelmente sensível a este agente? 2) Seria um evento muito raro? 3) E as falhas terapêuticas dos pacientes sob esta antifungoterapia? Seriam somente questões imunológicas? 4) Ou as técnicas para avaliação da suscetibilidade (M27-A2) não estão adequadas a esta detecção?

Com relação as questões da técnica M27-A2, em 1995 quando ainda em fase de proposta (M27-P) Rex *et al* ao avaliarem cepas de *Candida* spp sensíveis e resistentes a anfotericina B; verificaram que o meio de cultura empregado, o caldo RPMI 1640, não era adequado para a detecção das cepas resistentes. Ao mesmo tempo verificaram que o caldo AM3 evidenciava melhor desempenho.

No presente estudo propusemos comparar a suscetibilidade de *Candida* spp, isoladas de episódios de candidemia, utilizando-se três meios de cultura: RPMI 1640 o qual é indicado na técnica M27-A2, o AM3 que também é sugerido para testes com anfotericina B e o YNB-dextrose por ser quimicamente definido e proporcionar crescimento fúngico superior ao RPMI 1640.

Uma outra questão abordada foi comparar, com cada meio, se a suscetibilidade dos isolados à anfotericina B guardava relação com o desfecho das candidemias: óbito ou sobrevivência. Tal investigação foi desenvolvida por Powderly *et al*, em 1988, relatando que todas as candidemias cujos isolados evidenciavam CIM maior ou igual 0,8 µg/mL a anfotericina B, evoluíam ao óbito e quando menor a esta concentração a sobrevivência era maior. Este sinalizador do prognóstico das candidemias traz vantagens para a tomada de novas decisões terapêuticas como manutenção ou substituição de doses ou ajuste(s) antifúngico(s). Entretanto, aquele estudo foi conduzido com pequeno número de isolados e os testes de suscetibilidade foram com base na técnica de Shadomy *et al* pois, não se dispunha, então, dos procedimentos do CLSI (NCCLS).

### 5.1 Avaliação da suscetibilidade utilizando-se o Caldo RPMI 1640

Considerando-se as 144 amostras do gênero *Candida* incluídas neste estudo, a análise das Tabelas 1, 2, 3 e 4 permite observar que as CIMs de anfotericina B variaram entre 0,1 e 0,8 µg/mL. Embora o documento M27-A2 não disponibilize breakpoints que permitam classificar os isolados como sensíveis ou resistentes, a maioria dos autores considera como resistentes CIMs maiores ou iguais a 2 µg/mL. Assim, todos os isolados incluídos neste estudo são considerados sensíveis a anfotericina B. Ao analisarmos somente *Candida albicans* a faixa de CIMs varia entre 0,1 e 0,7 µg/mL enquanto que para *Candida não-albicans* a variação é entre 0,1 e 0,8 µg/mL. Tais resultados estão absolutamente dentro do observado pelos estudos similares, pois se os procedimentos laboratoriais empregados fossem os da M27-A2 teríamos utilizado as concentrações de 0,125, 0,25, 0,5 e 1 e as faixas de CIMs seriam de 0,125 a 1,0 µg/mL.

Com relação as CFMs, as técnicas do CLSI não contemplam tais determinações; assim os resultados aqui gerados requerem interpretações mais cautelosas. Considerando-se toda a população estudada, as CFMs variaram entre 0,1 e 0,9 µg/mL (Tabelas 1, 2, 3 e 4) podendo ser consideradas sensíveis. Conforme já referido, a tolerância as atividades fungicidas e bactericidas é definida como CFM maior ou igual a 32 vezes o valor da CIM; todavia outros autores tem considerado tolerância quando as CFMs são maiores ou iguais a 8 vezes o valor das CIMs (PFALLER *et al*, 2004).

As comparações entre suscetibilidades de amostras isoladas de pacientes que evoluíram ao óbito com a de pacientes que sobreviveram às candidemias não revelaram diferenças estatisticamente significativas quando se comparou os grupos de *Candida albicans*, *Candida não-albicans* ou mesmo o gênero *Candida* oriundas do hospital A (Tabela 14).

No hospital B observou-se que no grupo de *Candida não-albicans* bem como ao se considerar todas as leveduras isoladas (*Candida albicans* + *Candida não-albicans*) as CIMs e CFMs das leveduras isoladas dos pacientes que evoluíram ao óbito foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) do que as isoladas de pacientes que sobreviveram as candidemias. No hospital C estas relações só foram significativas entre *Candida não-albicans*, onde as CFMs das amostras dos pacientes que evoluíram ao óbito foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) do que as oriundas dos pacientes que sobreviveram às candidemias (Tabela 14).

## 5.2 Avaliação da suscetibilidade utilizando-se o Caldo AM3

Considerando-se as 144 amostras do gênero *Candida* incluídas neste estudo, as Tabelas 5, 6, 7 e 8 evidenciaram que a suscetibilidade (CIM) variou entre 0,2 e 1,2  $\mu\text{g/mL}$ , destacando-se que valores superiores a 0,9  $\mu\text{g/mL}$  só foram observados no grupo de *Candida não-albicans* cujos pacientes infectados evoluíram ao óbito. Apesar da faixa de suscetibilidade observada com o emprego do AM3 requerer concentrações de AM3 superiores do que as observadas com o RPMI 1640, todos os isolados foram considerados sensíveis. Com relação as CFMs a faixa de suscetibilidade variou entre 0,2 e 1,5  $\mu\text{g/mL}$  não se detectando isolados resistentes ou tolerantes.

Ao se comparar os perfis de suscetibilidades dos grupos, relacionando-os com sua origem, notou-se que em vários grupos as leveduras isoladas de pacientes que evoluíram ao óbito foram significativamente menos sensíveis ( $p < 0,05$ ) do que as isoladas de pacientes que sobreviveram às candidemias. Cabe ainda ressaltar que as diferenças foram observadas tanto em relação as CIMs quanto as CFMs (Tabela 4).

Quando se compara o desempenho do AM3 com o caldo RPMI 1640 (Tabela 14) fica bem delineado que o caldo AM3 foi capaz de detectar maior número de diferenças entre os grupos (óbito x sobreviventes) do que o caldo RPMI 1640. Estas observações estão de acordo com Rex *et al* (1995) que ao testar amostras resistentes a anfotericina B, obteve melhor desempenho na detecção deste fenômeno com o AM3 do que com o caldo RPMI 1640.

## 5.3 Avaliação da suscetibilidade utilizando-se o Caldo YNB-dextrose

Considerando-se as 144 amostras do gênero *Candida* incluídas neste estudo, as Tabelas 9, 10, 11 e 12 evidenciam que as CIMs variaram entre 0,2 e 1,0  $\mu\text{g/mL}$  enquanto as CFMs variaram de 0,2 a 1,5  $\mu\text{g/mL}$ ; todas as amostras avaliadas foram consideradas sensíveis a anfotericina B.

Similarmente ao observado com o AM3, o caldo YNB-dextrose permitiu a geração de CIMs e CFMs superiores às obtidas com o RPMI 1640.

A Tabela 14 resume as comparações de suscetibilidade entre os três meios e ainda considera a origem das amostras em relação ao desfecho das candidemias. Assim claramente se observa que o caldo YNB-dextrose gerou resultados equivalentes aos obtidos com o AM3. Com

ambos os meios (AM3 e YNB-dextrose) quando se considerou todas as amostras de *Candida albicans* notou-se que a sensibilidade (CIM e CFM) das oriundas de pacientes que evoluíram ao óbito era significativamente maior das dos pacientes sobreviventes às candidemias. Este mesmo perfil foi observado com o grupo *Candida não-albicans* e com o gênero *Candida*.

Ao considerarmos a distribuição das CIMs nos três meios, obtivemos: RPMI 1640 (0,1 a 0,8 µg/mL); AM3 (0,2 a 1,2 µg/mL) e YNB-dextrose (0,2 a 1,0 µg/mL). No caso da utilização da técnica preconizada pelo CLSI (M27-A2) as concentrações testadas seriam em menor número e resultariam nas seguintes faixas de suscetibilidade: RPMI 1640 (0,125 a 1,0 µg/mL); Caldo AM3 (0,25 a 2,0 µg/mL) e YNB-dextrose (0,25 a 1,0 µg/mL). Desta forma não se pode afirmar que o AM3 e YNB-dextrose sejam vantajosos em relação a melhor distribuição das CIMs, pois ambos (RPMI 1640 e AM3) compactaram a faixa de suscetibilidade das CIMs em quatro concentrações e o YNB-dextrose compactou-as em três concentrações (0,25 a 1,0 µg/mL).

Neste contexto, ao apontarmos diferenças, os meios AM3 e YNB-dextrose permitem afirmar que nas candidemias as CIMs dos isolados dos pacientes que evoluirão ao óbito será significativamente maior do que as CIMs/CFMs dos isolados de pacientes que sobreviverão a estes episódios. Todavia, com o Caldo RPMI 1640 tal afirmação seria absolutamente incorreta.

A capacidade de meios de cultura em detectar diferenças de suscetibilidade entre isolados de candidemias e relaciona-las com o desfecho da infecção poderá ter importante impacto clínico; todavia após estas constatações, seguirá a pergunta sobre qual a CIM ou CFM que, de forma segura, poderão indicar o provável desfecho. Estas concentrações poderão funcionar como pontos de corte ou “breakpoints” não para indicar sensibilidade ou resistência, mas para indicar um provável desfecho das candidemias.

#### **5.4 Avaliação da suscetibilidade com base nas CFMs**

A utilização das concentrações fungicidas mínimas como parâmetro de suscetibilidade tem sido muito menos explorada do que as CIMs. Tal constatação é justificada porque os antifúngicos fungicidas incluem somente a anfotericina B e a caspofungina. Some-se a isto, as dificuldades de interpretação das CFMs.

Embora de interpretação difícil e não padronizada, há estudos instigantes que sinalizam a CFM como um parâmetro a ser também avaliado. Tem sido demonstrado que elevadas CFM para

anfotericina B em *Candida* spp, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* e *Trichosporon* tem se correlacionado com falhas terapêuticas (REX & PFALLER, 2002; PFALLER *et al*, 2001; REX *et al*, 2001; PATTERSON *et al*, 2000; VAZQUEZ *et al*, 1997).

Em outro estudo Nguyen *et al* determinaram as CFMs de anfotericina B sobre 105 isolados de *Candida* spp e observaram que CFM maiores que 1,0 µg/mL se correlacionava com falhas terapêuticas. A especificidade deste breakpoint foi de 94% e valor preditivo de 78%.

No presente estudo, ao analisarmos a Tabela 14, a qual resume os achados significativos ou não, observa-se que excetuando-se a comparação da suscetibilidade de *Candida não-albicans* do hospital C, onde somente as CFMs evidenciaram diferenças, nas demais situações os achados foram concordantes para CIM e CFM

É pertinente ressaltar que, mesmo na determinação das CFM, os meios de cultura exercem influência pois, o maior número de achados significantes ocorreu quando se empregou o caldo AM3 ou o Yeast Nitrogen base-dextrose. Conforme já relatado por outros autores o caldo RPMI 1640 foi o que menor diferenças de suscetibilidade conseguiu apontar.

A análise da Tabela 15 indica que os resultados de CIM e CFM do presente estudo não permitem sugerir breakpoints que possam ser utilizados na prática clínica, como indicadores de prognóstico.

Recentemente Park *et al*, em estudo similar a este também não obtiveram breakpoints que diferenciasse isolados sensíveis de resistentes. Por outro lado não compararam grupos de *Candida* spp relacionados ao desfecho das candidemias.



## 6 CONCLUSÃO

As CIMs e CFMs de anfotericina B sobre *Candida* variaram em função dos meios utilizados nos ensaios. Quando se utilizou os caldos AM3 e YNB-dextrose foi possível observar diferenças significativas entre as CIMs e CFMs dos isolados de pacientes que evoluíram ao óbito versus os sobreviventes; em 50% das comparações (6/12) os parâmetros relacionados a óbito foram significativamente maiores do que os relacionados a sobreviventes. Quando se utilizou o caldo RPMI 1640 tais diferenças só foram observadas em 2 das 12 comparações (16,6%).

Entre os hospitais estudados, o hospital A (HUSM) foi o único onde não se evidenciaram diferenças nas CIMs e/ou CFMs relacionadas a óbito ou sobrevivência dos pacientes a episódios de candidemia.

Não foi possível estabelecer pontos de corte nas CIMs/CFMs a anfotericina B que pudessem sinalizar o provável desfecho (óbito/sobrevivência) dos episódios de candidemia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABI-SAID, D.; ANAISSIE, E.; UZUN, O. *et al.* The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. **Clinical Infectious Diseases**. v. 24, n. 6, p. 1122-1128, 1997.

ALMIRANTE, B.; RODRÍGUEZ, D.; PARK, B.J. *et al.* Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, n. 4, p. 1829-1835, 2005.

AQUINO, V.R.; LUNARDI, L.W.; GOLDANI, L.Z. *et al.* Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in southern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 9, n. 5, p. 411-418, 2005.

ARIF, S.; BARKHAM, T.; POWER, E.G. *et al.* Techniques for investigation of an apparent outbreak of infections with *Candida glabrata*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 34, p. 2205-2209, 1996.

ÁSMUNDSDÓTTIR, L.R.; ERLENDSDÓTTIR, H.; GOTTFREDSSON, M. *et al.* Increasing incidence of candidemia: results from a 20-year nationwide study in Iceland. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, n. 9, p. 3489-3492, 2002.

ATHAR, M.A.; WINNER, H.I. The development of resistance by *Candida* species to polyene antibiotics *in vitro*. **Journal of Medicine Microbiology**. v. 4, p. 505-517, 1971.

BARAN, J.J.; MUCKATIRA, B.; KHATIB, R. Candidemia before and during the fluconazole era: prevalence, type of species and approach to treatment in a tertiary care community hospital. **Journal Infectious Diseases**. v. 33, p. 137, 2001.

BEGGS, W.H.; HUGHES, C.E. Role of pH in the lethal direct cell damaging action of miconazole. **Chemist Pathology Pharmacology**. v. 53, n. 3, p. 407-410, 1986.

BODENHOFF, J. Resistance studies of *Candida albicans*, with special reference to two patients subjected to prolonged antimycotic treatment. **Odontologic Tidskr.** V. 76, p. 279-294, 1968.

BODENHOFF, J. Development of strains of genus *Candida* and genus *Torulopsis* resistant to antimycotics. **Acta Pathology Microbiology Scand.** V. 75, p. 622-630, 1969.

BODEY, G.P. Azole antifungal agents. **Clinical Infectious Diseases**. Chicago, v. 14, n. 1, p. 161-169, 1992.

- BOSSCHE, H.V.; WILLWMSSENS, G; COOLS, W. *et al.* Hypothesis on the molecular basis of the antifungal activity of N-substituted imidazoles and triazoles. **Biochem. Soc. Trans.** v. 11, p. 665-667, 1983.
- BRADLEY, S.G.; FARBER, P.J. Interactions among pH, buffer, and nystatin in *Candida stellatoidea*. **Antibiot Chemother.** v. 10, n. 3, p. 174-179, 1960.
- BRASS, C.; SHAINHOUSE, J.Z.; STEVENS, D.A. Variability of agar dilution-replicator method of yeast susceptibility testing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v. 15, n. 6, p. 763-768, 1979.
- BRINCKER, H. Prevention of mycosis in granulocytopenic patients with prophylactic ketoconazole treatment. **Mykosen.** v. 26, n. 5, p. 242-247, 1983.
- BRUUN, B.; WESTH, H.; STENDERUP, J. Fungemia: an increasing problem in a Danish university hospital 1989 to 1994. **Clinical of Microbiology and Infection.** v. 1, p. 124-126, 1995.
- CANUTO, M.M.; RODERO, F.G. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. **Infectious Diseases.** v. 2, p. 550-562, 2002.
- CAPEK, A.; SIMEK, A. Antimicrobial agents. Relationship between biochemical resistance and microbial degradation of antimycotics. **Folia Microbiology.** v. 16, p. 472-475, 1971.
- CASIDA, L.E.; Mc COY, E. Acquired resistance in *Candida albicans* to an antibiotic produced by a sporeforming bacillus. **Journal of Infectious Diseases.** V. 90, p. 283-290, 1952.
- CASTAGNOLA, E.; MACHETTI, M.; CAPPELLI, B. *et al.* Caspofungin associated with liposomal amphotericin B or voriconazole for treatment of refractory fungal pneumonia in children with acute leukaemia undergoing allogeneic bone marrow transplant. **Clinical Microbiology and Infection.** v. 10, n. 3, p. 255-257, 2004.
- CHENG, J.T.; WITTY, R.T.; ROBINSON R.R. *et al.* Amphotericin B nephrotoxicity: increased renal resistance and tubule permeability. **Kidney Int.** v. 22, p. 626-633, 1982.
- COLLIN, B.; CLANCY, C.J.; NGUYEN, M.H. Antifungal resistance in non-albicans *Candida* species. **Drug Resistance Updates.** v. 2, p. 9-14, 1999.
- COLOMBO, A.L.; NAKAGAWA, Z.; VALDETARO, F. *et al.* Susceptibility profile of 200 bloodstream isolates of *Candida* spp. Collected from Brazilian tertiary care hospitals. **Medical Mycology.** v. 41, n. 3, p. 235-239, 2003.
- CURY, A.E.; MICHE, M.P.; MINAMI, P.S. Leveduras isoladas de pacientes com câncer: incidência e sensibilidade a antibióticos poliênicos. **Revista de Microbiologia.** v. 20, n. 1, p. 102-107, 1989.

DE KRUIJFF, B.; DEMEL, R.A. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 339, p. 57-70, 1974.

DICK, J.D.; MERZ, W.G.; SARAL, R. Incidence of polyene resistant yeasts recovered from clinical specimens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 18, n. 1, p. 158-163, 1980.

DICK, J.D.; ROSENGARD, B.R.; MERZ, W.G. Fatal disseminated candidiasis due to amphotericin B resistant *Candida guilliermondii*. **Annals Internal Medicine**. v. 102, n. 1, p. 67-68, 1985.

DIEKEMA, D.J.; MESSER, S.A.; BRUEGGEMANN, A.B. *et al.* Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, n. 4, p. 1298-1302, 2002.

DIGNANI, M.C.; SOLOMKIN, J.S.; ANAISSIE, E. *et al.* **Candida**. 1. ed. Churchill Livingstone, 2003. p. 195-239.

DORSTHORST, D.T.A.; VERWEIJ, P.E.; MEIS, J.F.G.M. *et al.* Relationship between *in vitro* activities of amphotericin B and flucytosine and pH for clinical yeast and mold isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 49, n. 8, p. 3341-3346, 2005.

DOWNING, D.; CLARK, J. Métodos estatísticos. In: \_\_\_ **Estatística Aplicada**. 2. ed. São Paulo: Saraiva, 2005. cap. 7, p. 278-286.

DRUTZ, D.J.; LEHRER, R.I. Development of amphotericin B – resistant *Candida tropicalis* in a patient with defective leukocyte function. **Journal Medical Science**. v. 276, p. 77-92, 1978.

EDWARDS, J.E. **Candida species: Principles and practice of infections diseases**. 5. ed. Churchill Livingstone, 2000. v. 2, p. 2656.

EISEMBERG, G.M.; WEISS, W.; FLIPPIN, H.F. Microbiologic studies and preliminary clinical experiences with nystatin. *In vitro* susceptibility of *Candida albicans*. **Antibiotic Annual 1955-1956**. New York, 1956. p. 837-841.

ELLIS, D. Amphotericin B: spectrum and resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 49, p. 7-10, 2002.

ESPINEL-INGROFF, A. *In vitro* fungicidal activities of voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against opportunistic moniliaceous and dematiaceous fungi. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 39, n. 3, p. 954-958, 2001.

FRYBERG, M. Sterol biosynthesis in antibiotic-resistant yeast: nystatin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 160, p. 83-89, 1974.

- GALE, E.F.; KERRIDGE, J.D.; KOH, T.Y. Factors affecting the changes in amphotericin B sensitivity of *Candida albicans* during growth. **Journal of General Microbiology**. v. 87, p. 20-36, 1975.
- GALLIS, H.A.; DREW, R.H.; PICKARD, W.W. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. **Review of Infections Diseases**. v. 12, p. 308-329, 1990.
- GEBHART, R.J.; ESPINEL-INGROFF, A.; SHADOMY, S. *In vitro* susceptibility studies with oxiconazole (RO 13-8996). **Chemotherapy**. v. 30, p. 244-247, 1984.
- GHANNOUD, M.A.; RICE, L.B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 12, p. 501-517, 1999.
- GOTTLEIB, D.H.; CARTER, H.E.; SLONEKER, J.H. *et al.* Protection of fungi against polyene antibiotics by sterols. **Science**. v. 128, p. 361-365, 1958.
- GRAYBILL, J.R.; MONTALBO, E.; KIRKPATRICK, W.R. *et al.* *Candida albicans*: less predictable than we may think. In: 13<sup>th</sup> INTERNATIONAL CONFERENCE FOR HUMAN AND ANIMAL MYCOLOGY, 049, 1997. **Annals**.
- GUDLAUGSSON, O.; GILLESPIE, S.; LEE, K. *et al.* Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. **Clinical of Infectives Diseases**. v. 37, n. 9, p. 1172-1177, 2003.
- GUINET, R.; CHASNAS, J.; GOULLIER, A. A fatal septicemia due to amphotericin B resistant *Candida lusitanae*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 18, p. 443-444, 1983.
- HALLER, I.; PLEMPEL, M. Experimental *in vitro* and *in vivo* comparison of modern antimycotics. **Curr. Med. Res. Opin.** v. 5, p. 315-319, 1978.
- HAMILTON-MILLER, J.M.T. Physiological properties of mutagem-induced variants of *Candida albicans* resistant to polyene antibiotics. **Journal of Medical Microbiology**. v. 5, p. 425-440, 1972.
- HAZEN, K.C.; GLEE, P.M. Hydrophobic cell wall protein glycosylation by the pathogenic fungus *Candida albicans*. **Journal Microbiology**. v. 40, p. 266-272, 1994.
- HEBEKA, E.K.; SOLOTOROVSKY, M. Development of strains of *Candida albicans* resistant to candidin. **Journal Bacteriology**. v. 84, p. 237-241, 1962.
- HEBEKA, E.K.; SOLOTOROVSKY, M. Development of resistente to polyene antibiotics in *Candida albicans*. **Journal Bacteriology**. v. 89, n. 6, p. 1533-1539, 1965.
- HELL, R.C.; BROGDEN, R.N.; SPEIGHTT, T.M. Econazole: a review of its antifungal activity and therapeutic efficacy. **Drugs**. v. 16, p. 177-201, 1978.

- HITCHCOCK, C.A.; RUSSEL, N.J. Sterol in *Candida albicans* mutants resistant to polyene or azole antifungals and of a double mutant *Candida albicans* 6,4. **Review in Microbiology**. v. 15, n. 1, p. 111-115, 1987.
- HOEPRICH, P.D.; MERRY, J.M. Influence of culture medium on susceptibility testing with BAY n 7133 and ketoconazole. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 24, n. 2, p. 269-271, 1986.
- HOLT, R.J. Laboratory tests of antifungal drugs. **Journal of Clinical Pathology**. v. 28, p. 767-774, 1975.
- HOLZ, R.W. The effects of the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B on thin lipid membranes. **Annals New York Academic Science**. v. 235, p. 469-479, 1974.
- HOPE, W.; MORTON, A.; EISEN, D.P. Increase in prevalence of nosocomial non- *Candida albicans* candidemia and the association of *Candida krusei* with fluconazole use. **Journal of Hospital Infection**. v. 50, p. 56-65, 2002.
- HOSPENTAL, D.R.; MURRAY, C.K.; RINALDI, M.G. The role of antifungal susceptibility testing in the therapy of candidiasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**. v. 48, n. 3, p. 153-160, 2003.
- HSUCHEN, C.C.; FEINGOLD, D.S. Selective membrane toxicity of the polyene antibiotics: studies on natural membranes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 4, n. 3, p. 316-319, 1973.
- JARVIS, W.R. Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. **Clinical of Infectious Diseases**. v. 20, p. 1526-1530, 1995.
- JULIANO, R.; GRANT, C.W.M.; BARBER, K.R. *et al.* Mechanism of the selective toxicity of amphotericin B incorporated into liposomes. **Mol. Pharmacology**. v. 31, p. 1-11, 1987.
- KERRIDGE, D. The plasma membrane of *Candida albicans* and its role in the action of antifungal drugs. **The eukaryotic microbial cell**. Cambridge: Cambridge University Press, 1980. p. 103.
- KERRIDGE, D. The protoplast membrane and antifungal drugs. **Fungal protoplasts: applications in biochemistry and genetics**. New York: Marcel Dekker Inc., 1985. p. 135.
- KLEINSCHMIDT, M.G.; CHOUGH, K.S.; MUDD, J.B. Effect of filipin on liposomes prepared with different types of steroids. **Plant Physiologic**. v. 49, p. 852, 1972.
- KRCMERY V.; BARNES, A.J. Non-*albicans Candida* spp. Causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **Journal of Hospital Infection**. v. 50, n. 4, p. 243-260, 2002.
- KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. **Medical Mycology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992.

LAMPEN, J.O.; ARNOW, P.M.; SAFFERMAN, R.S. Mechanism of protection by sterol against polyene antibiotics. **Journal of Bacteriology**. v. 80, p. 200-206, 1960.

LARSCH, H.W. The prevalence and the drug resistance of *H. capsulatum* and *Candida albicans* in patients with pulmonary histoplasmosis. **Laboratory Investigation**. v. 11, p. 1140-1145, 1962.

LITTMAN, M.L.; PISANO, M.A.; LANCASTER, R.M. Induced resistance of *Candida* species to nystatin and amphotericin B. **Antibiotic Annuals 1957 – 1958**. p. 981-987, 1958.

LOEFFLER, J.; STEVENS, D. Antifungal drug resistance. **Clinical Infectious Diseases**. v. 30, suppl. 1, p. 31-41, 2003.

LOMBARDI, G.; CAVANNA, C.; GRAMEGNA, G. Routine application of the evaluation of yeast susceptibility to the main antimycotic drugs. **Microbiologica**. v. 10, p. 189-196, 1987.

LÓPEZ, C.; GIRO, L.; RAMOS, L. *et al.* Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*. **Revista Argentina de Microbiología**. v. 37, p. 16-21, 2005.

LOPEZ-BERESTEIN, G.; BODEY, G.; FRANKEL, L.S. *et al.* Treatment of hepatosplenic candidiasis with liposomal amphotericin. **Br. Clin. Oncol.** v. 5, p. 310-317, 1987.

LUPETTI, A.; DANESI, R.; CAMPA, M. *et al.* Molecular basis of resistance to azole antifungals. **TRENDS in Molecular Medicine**. v. 8, n. 2, p. 76-81, 2002.

MACHADO, A. R. L. Antifúngicos: fundamentos da terapêutica. In: \_\_ **Farmacologia Clínica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. cap. 3, p. 1207 – 1216.

MARR, K.A.; CARTER, R.A.; CRIPPA, F. *et al.* Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. **Clinical Infectious Diseases**. v. 34, n. 7, p. 909-917, 2002.

MARTINS, M.D.; REX, J.H. Resistance to antifungal agents in the critical care setting: problems and perspectives. **New Horizons**. v. 4, p. 338-344, 1996.

MBONGO, N.; LOISEAU, P.M.; BILLION, M.A. *et al.* Mechanism of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 42, p. 352-357, 1998.

MERZ, W.G.; SANFORD, G.R. Isolation and characterization of a polyene-resistant variant of *Candida tropicalis*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 9, p. 677-680, 1979.

MICHAELIS, S.; BERKOWER, C. Sequence comparison of yeast ATP binding cassette (ABC) proteins. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.** v. 60, p. 291-309, 1995.

MOLZAHN, S.W.; WOODS, R.A. Polyene resistance and the isolation of sterol mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**. v. 72, p. 339-348, 1972.

MURPHY, J.W.; FRIEDMAN, H.; BENDINELLI, M. **Fungal infections and immune responses**. New York: Plenum Press, 1993.

NATH, C.E.; SHAW, P.J.; GUNNING, R. *et al.* Amphotericin B in children with malignant disease: a comparison of the toxicities and pharmacokinetics of amphotericin B administered in dextrose versus lipid emulsion. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 43, n. 6, p. 1417-1423, 1999.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Approved standard M27-A2, 2<sup>nd</sup> ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002 Villanova Pa.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Proposed Standard M27-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1992 Villanova Pa.

NGUYEN, M.H.; CLANCY, C.J.; YU, V.L. Does *in vitro* susceptibility data predict the microbiologic response to amphotericin B? Results of a prospective study of patients with *Candida* fungemia. **Journal of Infection Diseases**. v. 17, p. 425-430, 1998.

NOLTE, F.S.; PARKINSON, T.; FALCONER, D.J. *et al.* Isolation and characterization of fluconazole and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 44, n. 1, p. 196-199, 1997.

NORMAN, A.W.; DEMEL, B.K.; VAN DEENEN, L.L.M. *et al.* Studies on the biological properties of polyene antibiotics: comparison of other polyenes with filipin in their ability to interact specifically with sterol. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 290, p. 1-14, 1972.

Nosocomial Infection National Surveillance Service. **Surveillance of hospital-acquired bacteraemia in English hospitals 1997 – 2000**. London: Public Health Laboratory Service, 2000.

NUCCI, M.; COLOMBO, A.L. Emergence of resistant *Candida* in neutropenic patients. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 6, n. 3, p. 124-128, 2002.

PAPPAGIANIS, D.; COLLINS, M.S.; HECTOR, R. Development of resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae* infecting a human. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 16, n. 2, p. 123-126, 1979.

PARK, B.J.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; HAJJEH, R.A. *et al.* Evaluation of amphotericin B interpretive breakpoints for *Candida* Bloodstream isolates by correlation with therapeutic outcome. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 50, n. 4, p. 1287-1292, 2006.



PAYNE, N.I.; COSGROVE, R.F.; GREEN, A.P. *et al.* *In vivo* studies of amphotericin B liposomes derived from proliposomes; effect of formulation on toxicity and tissue disposition of the drug in mice. **Journal of Pharmaceutic Pharmacology**. v. 39, p. 24-28, 1987.

PEREA, S.; PATTERSON, T.F. Antifungal resistance in pathogenic fungi. **Clinical Infectious Diseases**. v. 35, p. 1073-1080, 2002.

PETER, J.; ARMSTRONG, D.; LYMAN, C.A. *et al.* Use of fluorescent probes to determine MICs of amphotericin B and caspofungin against *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, n. 8, p. 3788-3792, 2005.

PFALLER, M.A. Epidemiology of fungal infections: current perspectives and future directions. **Clinical Infectious Diseases**. v. 20, p. 1525, 1995.

PFALLER, M.A.; JONES, G.V.; DOREN, G.V. *et al.* National surveillance of nosocomial bloodstream infection due to *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE program. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**. v. 31, p. 327-332, 1998.

PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; GREE, S. *In vitro* susceptibilities of *Candida dubliniensis* isolates tested against the new triazole and echinocandin antifungal agents. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 37, n. 3, p. 870-872, 1999.

PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; BOYKEN, L. *et al.* Geographic variation in the susceptibilities of invasive isolates of *Candida glabrata* to seven systemically active antifungal agents: a global assessment from the ARTEMIS antifungal surveillance program conducted in 2001 and 2002. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n. 7, p. 3142-3146, 2004.

POWDERLY, W.G.; KOBAYASHI, G.S.; HERZIG, G.P. *et al.* Amphotericin B-resistant yeast infection in severely immunocompromised patients. **The American Journal of Medicine**. v. 84, p. 826-832, 1988.

QUINDÓS, G. Las micosis en el amanecer del siglo XXI. **Revista Iberoamericana de Micología**. n. 19, p. 1-4, 2002.

RAO, T.V.G.; DAS, S.; PRASAD, R. Effect of phospholipid enrichment on nystatin action: differences in antibiotic sensitivity between *in vivo* and *in vitro* conditions. **Microbios**. v. 42, p. 145-153, 1985. (a)

RAO, T.V.G.; TRIVEDI, A.; PRASAD, R. Phospholipid enrichment of *Saccharomyces cerevisiae* and its effect on polyene sensitivity. **Journal of Microbiology**. v. 31, p. 322-326, 1985. (b)

REX, J.H.; COOPER JR, C.R.; MERZ, W.G. *et al.* Detection of amphotericin B-resistant *Candida* isolates in a broth-based system. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 39, n. 4, p. 906-909, 1995.

REX, J.H.; PFALLER, M.A.; WALSH, T.J. *et al.* Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 14, n. 4, p. 643-658, 2001.

REYES & GHANNOUM. Antifungal susceptibility testing of yeasts: uses and limitations. **Drug Resistance Updates**. n. 3, p. 14-19, 2000.

REYNOLDS, A.V.; HAMILTON-MILLER, J.M.T.; BRUMFITT, W. Discrepant behaviour of clotrimazole against *Bacteroides fragilis* in liquid and solid media. **Journal Antimicrobiology Chemother**. v. 3, p. 622-623, 1977.

RICHARDSON, M.D.; WARNOCK, D.W. **Fungal Infections: Diagnosis and Management**. USA: Blackwell Scientific, 1993.

RIPPON, J.W. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. **Medical Mycology**. Philadelphia: Saunders, 1982.

RYLEY, J.F.; WILSON, R.G.; BARRET-BEE, K.J. Azole resistance in *Candida albicans*. **Sabouraudia**. v. 1, n. 22, p. 53-63, 1984.

SAFE, L.M.; SAFE, S.H.; SUBDEN, R.E. Sterols content and polyene antibiotic resistance in isolates of *Candida krusei*, *Candida parakrusei* and *Candida tropicalis*. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 23, p. 398-401, 1977.

SANT'ANA P.L.; MILAN, E.P.; MARTINEZ, R. *et al.* Multicenter Brazilian study of oral *Candida* species isolated from AIDS patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 97, n. 2, p. 253-257, 2002.

SCHOLER, H.J.; POLAK, A. Resistance to systemic antifungal agents. **Antimicrobial drug resistance**. Orlando: Academic Press, 1984. p. 393-460.

SHADOMY, S.; CALHOUN, D.L.; ROBERTS, G.D. *et al.* Results of a survey of antifungal susceptibility tests in the United States and interlaboratory comparison of broth dilution testing of flucytosine and amphotericin B. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 23, n. 2, p. 298-301, 1986.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Candidíase. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 25, p. 265-273.

SOBEL, J.D.; OHMIT, S.E.; SCHUMAN, P. *et al.* The evolution of *Candida* species and fluconazole susceptibility among oral and vaginal isolates recovered from Human Immunodeficiency Virus (HIV)-seropositive and at-risk HIV-seronegative women. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 183, n. 2, p.286-293, 2000.

SOCOL-ANDERSON, M.; SLIGH JR, J.E.; ELBERG, S. *et al.* Role of cell defense against oxidative damage in the resistance of *Candida albicans* to the killing effect of amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 32, n. 5, p. 702-705, 1988.

SORENSEN, I.J.; MCNALL, E.G.; STERNBERG, T.H. The development of strains of *Candida albicans* and *Coccidioides immitis* which are resistant to amphotericin B. **Antibiotic Annual 1958 – 1959**. p. 920-923, 1959.

SUGAR, A.M. The polyene macrolide antifungal drugs. **Antimicrobial agents**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1986, p. 229-244.

THOMAS, A.H. Suggested mechanisms for the antimycotic activity for the polyene antibiotics and the N-substituted imidazoles. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. London, v. 17, n. 3, p. 269-279, 1986.

TITSWORTH, E.; GRUNBERG, E. chemotherapeutic activity of 5-fluorocytosine and amphotericin B against *Candida albicans* in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 4, p. 306-308, 1973.

VARGAS, K.G.; JOLY, S. Carriage frequency, intensity of carriage, and strains of oral yeast species vary in the progression to oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive individuals. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, n. 2, p. 341-350, 2002.

VERDUYN, F.M.L.; MEIS, J.F.; VOSS, A. *et al.* Nosocomial fungal infections: candidemia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**., v. 34, n. 3, p. 213-220, 1999.

VISCOLI, C.; GIRMENIA, C.; MARINUS, A. *et al.* Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the invasive fungal infection group (IFIG) of the European Organization for Research and treatment of cancer (EORTC). **Clinical Infectious Diseases**. v. 28, n. 5, p. 1071-1079, 1999.

WALSH, T.J.; LEE, J.W. Prevention of invasive fungal infections in patients with neoplastic diseases. **Clinical Infectious Diseases**. Chicago, v. 17, suppl. 2, p. 5468-5480, 1993.

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

WIEBE, V.J.; DE GREGORI, M.W. Liposome-encapsulated amphotericin B: a promising new treatment for disseminated fungal infections. **Review of Infectious Diseases**. v. 10, p. 1097-1101, 1988.

WOODS, R.A.; BARD, M.; JACKSON, I.E. Resistance of polyene antibiotics and correlated sterol changes in two isolates of *Candida tropicalis* from patient with an amphotericin B – resistant funguria. **Journal Infectology Diseases**. v. 129, n. 1, p. 53-58, 1974.

YOUNG, L.Y.; HULL, C.M.; HEITMAN, J. Disruption of ergosterol biosynthesis confers resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 47, n. 9, p. 2717-2724, 2003.

ZYGMUNT, W.A.; TAVORMINA, P.A. Steroid interference with antifungal activity of polyene antibiotics. **Appl. Microbiology**. v. 14, p. 865-869, 1966.