

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

**AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE *Candida* spp.  
ISOLADAS DE CANDIDEMIAS: UM ESTUDO DE  
15 ANOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Edileusa Rosa dos Santos**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2012**

**AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE *Candida* spp.  
ISOLADAS DE CANDIDEMIAS: UM ESTUDO DE 15 ANOS**

**Edileusa Rosa dos Santos**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, 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**

**2012**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Rosa dos Santos, Edileusa  
AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE Candida spp. ISOLADAS  
DE CANDIDEMIAS: UM ESTUDO DE 15 ANOS / Edileusa Rosa  
dos Santos.-2012.  
79 p.; 30cm

Orientador: Sydney Hartz Alves  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2012

1. Candidemia 2. Candida species 3. Antifúngicos 4.  
Suscetibilidade I. Hartz Alves, Sydney II. Título.

**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**

**AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE *Candida* spp. ISOLADAS DE  
CANDIDEMIAS: UM ESTUDO DE 15 ANOS**

elaborada por  
**Edileusa Rosa dos Santos**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

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

---

**Cleci Menezes Moreira, Dra. (UNIPAMPA)**

---

**Ângela Regina Maciel Weinmann, Dra. (UFSM)**

Santa Maria, 20 de abril de 2012.

*Dedico este trabalho...*

*... aos meus pais, Antonio Carlos e Oneida pelo amor e incentivo constantes.*

*...às minhas irmãs Tanise e Luciane pela cumplicidade.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela vida, por me iluminar, proteger e permitir com que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais Antonio Carlos e Oneida pelo amor, educação, incentivo e compreensão pelos momentos em que estive ausente. Obrigada por inúmeras vezes abdicarem do seu próprio conforto para proporcionar uma educação de qualidade às suas filhas... Amo vocês.

Às minhas irmãs Tanise e Luciane pelo amor, cumplicidade e preocupação constantes.

Ao meu orientador Prof. Sydney Hartz Alves pela oportunidade, aprendizado, compreensão e ajuda. Obrigada por todos os conhecimentos transmitidos até aqui.

A direção e colegas do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Santa Maria, pelo apoio, em especial as amigas Carmen, Michelle, Renata, Tatiana, Ângela e Mariane pelas palavras de carinho e amizade e ao colega José, pelo companheirismo durante o curso.

Às colegas do setor de microbiologia Adenilde, Bettina, Nara e Roselene pela amizade.

O meu agradecimento especial à colega Loiva Ottonelli de Oliveira pelos primeiros aprendizados práticos de micologia. Obrigada pela amizade, carinho e incentivo.

A minha gratidão e carinho às amigas e colegas Débora e Viviane pela disponibilidade em me ajudar sempre que precisei. Vocês são muito especiais.

Às amigas, Juliana, Suzana e Aline pela companhia, alegria e amizade.

O meu carinho às amigas, Iracema, Magnólia, Elizandra e Caren pelo apoio e confiança.

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Ao Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) pelo auxílio e apoio prestados.

A todos que acreditaram em mim, muito obrigada!

*“Suba o primeiro degrau com fé.  
Não é necessário que você veja toda a escada,  
apenas dê o primeiro passo...”*

*(Martin Luther King)*

## RESUMO

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

### **AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE *Candida* spp. ISOLADAS DE CANDIDEMIAS: UM ESTUDO DE 15 ANOS**

Autora: Edileusa Rosa dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Sydney Hartz Alves

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 20 de abril de 2012.

Nas últimas duas décadas observou-se um grande aumento nas infecções de corrente sanguínea por *Candida* spp. As candidemias estão associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade, bem como ao incremento nos custos hospitalares. O fenômeno da resistência evidencia a importância da realização de testes de suscetibilidade aos agentes antifúngicos. Tais testes estão aprimorando-se constantemente na tentativa de uniformizar suas respectivas interpretações. O presente estudo avaliou a suscetibilidade de *Candida* spp. isoladas de candidemias por um período de 15 anos divididos em três períodos de cinco anos, em Santa Maria, RS, Brasil, interpretando as concentrações inibitórias mínimas de acordo com a proposta do CLSI e os novos *breakpoints* recentemente propostos por Pfaller et al. Entre os 525 isolados nos três períodos avaliados, *C. parapsilosis* foi a espécie predominante (49,14%), seguida por *C. albicans* (34,47%), *C. tropicalis* (8,19%), *C. glabrata* (3,61%), *C. lusitaniae* (1,90%), *C. guilliermondii* (1,71%), e *C. krusei* (0,95%). Durante o período estudado e considerando-se os dois critérios, foram detectados 136 isolados não sensíveis. Segundo o CLSI, foram identificados 40 (7,61%) isolados não sensíveis, sendo 19 (3,61%) resistentes. De acordo com Pfaller et al., 96 (18,28%) isolados apresentaram-se como não sensíveis, sendo 11 (2,09%) resistentes. Todos os isolados foram sensíveis a anfotericina B e 5 e 3 isolados apresentaram-se intermediários a flucitosina e caspofungina, respectivamente. Resistência foi detectada somente entre os antifúngicos azólicos: itraconazol (2,09%), fluconazol (1,14%), e voriconazol (0,38%). O isolamento de espécies resistentes aos agentes antifúngicos utilizados não foi uma característica marcante no presente estudo. Este estudo permitiu uma melhor visão da epidemiologia local. A detecção de um maior número de espécies não sensíveis ressaltou a relevância da avaliação dos testes suscetibilidade através dos novos *breakpoints* a fim de ser direcionada a uma terapia mais eficiente.

**Palavras-chave:** Candidemia. *Candida* species. Antifúngicos. Suscetibilidade.



## ABSTRACT

Master Dissertation  
Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### EVALUATION OF SUSCEPTIBILITY OF *Candida* spp. ISOLATED FROM CANDIDEMIAS: A 15-YEARS STUDY

Author: Edileusa Rosa dos Santos

Advisor: Sydney Hartz Alves

Place and Date: Santa Maria, april, 20<sup>th</sup>, 2012.

In the last two decades it has been seen a large increase in blood stream infections by *Candida* spp. The candidemias are associated with high morbidity and mortality, as well as the increase in hospital costs. The phenomenon of resistance highlights the importance of performing tests for susceptibility to antifungal agents. Such tests are improving constantly in an attempt to standardize their interpretations. This study evaluated the susceptibility of *Candida* spp. isolated from candidemias during a period of 15 years divided into three periods of five years in Santa Maria, RS, Brazil, interpreting minimum inhibitory concentrations according to the proposal of the CLSI and the new breakpoints recently proposed by Pfaller et al. Among the 525 isolates during the three periods, *C. parapsilosis* was the predominant species (49.14%), followed by *C. albicans* (34.47%), *C. tropicalis* (8.19%), *C. glabrata* (3.61%), *C. lusitaniae* (1.90%), *C. guilliermondii* (1.71%) and *C. krusei* (0.95%). During the study period and considering the two criteria, 136 non-susceptible isolates were found. According to CLSI, we identified 40 (7.61%) non-susceptible isolates, from which 19 (3.61%) were resistant. According to Pfaller et al., 96 (18.28%) isolates presented themselves as non-susceptible, being 11 (2.09%) resistant. All isolates were susceptible to amphotericin B and 3 presented themselves dose-dependent or intermediate susceptible to flucytosine and caspofungin. Resistance was detected only among the azole antifungals: itraconazole (2.09%), fluconazole (1.14%) and voriconazole (0.38%). The isolation of species resistant to the antifungal agents used was not a prominent feature in this study. Detecting a higher number of non-susceptible species highlighted the relevance of evaluating of susceptibility tests by new breakpoints in order to find a more efficient therapy.

**Keywords:** Candidemia. *Candida* species. Antifungals. Susceptibility.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### INTRODUÇÃO

<b>Figura 1 -</b>	Forma microscópica de <i>Candida</i> spp.....	15
<b>Figura 2 -</b>	Macromorfologia de <i>Candida</i> spp.....	15
<b>Quadro 1 -</b>	Principais unidades clínicas acometidas por episódios de candidemias.....	19
<b>Quadro 2 -</b>	Principais comorbidades e fatores de risco associados às candidemias.....	20
<b>Quadro 3 -</b>	Incidências mundiais e brasileiras de candidemias e seus respectivos índices de mortalidade.....	21
<b>Quadro 4 -</b>	Incidência das principais espécies de <i>Candida</i> isoladas de candidemias.....	23
<b>Quadro 5 -</b>	Novos <i>breakpoints</i> para fluconazol e voriconazol considerando as espécies de <i>Candida</i> .....	37
<b>Quadro 6 -</b>	Novos <i>breakpoints</i> para equinocandinas considerando as espécies de <i>Candida</i> .....	38

## LISTA DE TABELAS

### MANUSCRITO

Table 1 - Distribution of the species of <i>Candida</i> isolated from episodes of candidemia among 1995-2009 at University Hospital of Santa Maria (HUSM), Santa Maria, RS, Brazil.....	47
Table 2 - Susceptibility profile of <i>Candida</i> spp. isolated from candidemia at University Hospital of Santa Maria (HUSM) among 1995-1999. Detection of non-susceptible isolates by the breakpoints from CLSI (2008) and Pfaller et al. Santa Maria, RS, Brazil.....	50
Table 3 - Susceptibility profile of <i>Candida</i> spp. isolated from candidemia at University Hospital of Santa Maria (HUSM) among 2000-2004. Detection of non-susceptible isolates by the breakpoints from CLSI (2008) and Pfaller et al. Santa Maria, RS, Brazil.....	51
Table 4 - Susceptibility profile of <i>Candida</i> spp. isolated from candidemia at University Hospital of Santa Maria (HUSM) among 2005-2009. Detection of non-susceptible isolates by the breakpoints from CLSI (2008) and Pfaller et al. Santa Maria, RS, Brazil.....	52
Table 5 - Susceptibility profile of <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. lusitaniae</i> and <i>C. krusei</i> isolated from candidemia at University Hospital of Santa Maria (HUSM) among 1995-2009 and detection of non-susceptible isolates by the breakpoints from CLSI (2008) and Pfaller et al. Santa Maria, RS, Brazil.....	53
Table 6 - Number and percentage of isolates of candidemia non-susceptible to antifungals based on CLSI and Pfaller's et al. criteria observed among 1995-2009 at University Hospital of Santa Maria (HUSM), Santa Maria, RS, Brazil.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCD -	Anfotericina B dispersão coloidal
ABLC -	Anfotericina B complexo lipídico
AMB-d -	Anfotericina B desoxicolato
ASM -	American Society for Microbiology
AUC	Area Under Curve
CAPD -	Diálise Peritoneal e Ambulatorial Contínua
CDC -	Center of Diseases Control
CIM -	Concentração inibitória mínima
CLSI -	Clinical and Laboratory Standards Institute
EUCAST -	European Committee for Clinical Laboratory Standards
FDA -	Food and Drug Administration
HIV -	Vírus da Imunodeficiência Humana
IDSA -	Infectious Diseases Society of America
L-AMB -	Anfotericina B lipossomal
MOPS -	Ácido Morfolinopropanosulfônico
NCCLS -	National Committee for Clinical Laboratory Standards
UFC -	Unidade Formadora de Colônia
UTI -	Unidade de tratamento intensivo

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>1.1</b>	<b>O Gênero <i>Candida</i></b> .....	14
<b>1.2</b>	<b>Candidíases</b> .....	16
1.2.1	Manifestações clínicas das candidíases.....	16
1.2.2.1	Candidíase cutâneo-mucosa ou superficial.....	16
1.2.2.2	Candidíase profunda ou disseminada.....	17
<b>1.3</b>	<b>Candidemias</b> .....	18
1.3.1	Principais espécies isoladas de candidemias.....	23
1.3.1.1	<i>Candida albicans</i> .....	23
1.3.1.2	<i>Candida parapsilosis</i> .....	24
1.3.1.3	<i>Candida tropicalis</i> .....	25
1.3.1.4	<i>Candida glabrata</i> .....	25
1.3.1.5	<i>Candida krusei</i> .....	26
1.3.1.6	<i>Candida lusitaniae</i> .....	27
1.3.1.7	<i>Candida guilliermondii</i> .....	27
1.3.2	Suscetibilidade das principais espécies isoladas de candidemias.....	27
<b>1.4</b>	<b>Agentes antifúngicos</b> .....	28
1.4.1	Agentes antifúngicos poliênicos.....	29
1.4.2	Antifúngicos azólicos.....	30
1.4.3	Equinocandinas.....	32
1.4.4	Pirimidinas.....	34
<b>1.5</b>	<b>Testes de suscetibilidade aos agentes antifúngicos</b> .....	34
1.5.1	As novas propostas para interpretação dos testes de suscetibilidade.....	35
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	39
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	39
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	39

<b>3</b>	<b>MANUSCRITO</b> .....	40
	Abstract.....	41
	Resumo.....	42
	Introduction.....	43
	Methods.....	44
	Results.....	46
	Discussion and conclusion.....	54
	References.....	57
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	62
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	66
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	67

## **APRESENTAÇÃO**

Esta dissertação está distribuída na seguinte forma: primeiramente é apresentada a Introdução, a qual inclui o Referencial Teórico. Em seguida são apresentados os Objetivos.

Os resultados, apresentados na forma de manuscrito, encontram-se na seção Manuscrito, apresentada logo após os Objetivos.

Os itens Considerações Finais e Conclusão, dispostos após o manuscrito, contêm interpretações e comentários gerais referentes ao manuscrito.

As Referências Bibliográficas, apresentadas no final da dissertação, referem-se às citações que aparecem nos itens Introdução, Considerações finais e Conclusão.

# 1 INTRODUÇÃO

Nas duas últimas décadas, as doenças fúngicas emergiram como uma das principais causas de morbidade observando-se um significativo aumento na frequência de micoses sistêmicas, especialmente entre pacientes imunocomprometidos, hospitalizados e gravemente doentes. As doenças fúngicas provocadas por *Candida* spp. são as mais recorrentes, sendo as candidemias a forma mais emergente (MONTRAVERS & JABBOUR, 2006; PFALLER & DIEKEMA, 2007).

As elevadas taxas mortalidade observadas nas candidemias são fatores de grande relevância nos hospitais mundiais e brasileiros (ALMIRANTE et al., 2005; AQUINO et al., 2005).

A variação na incidência das espécies e seus diferentes perfis de suscetibilidade ressaltam a importância dos estudos de vigilância frente às candidemias (COLOMBO et al., 2006). O desenvolvimento de resistência entre as espécies de *Candida*, juntamente com a ocorrência de falhas terapêuticas evidenciaram a necessidade da realização dos testes de suscetibilidade aos agentes antifúngicos (PEREA & PATTERSON, 2002). Esses testes são constantemente aprimorados e padronizados na tentativa de permitir a identificação de um maior número de isolados não sensíveis e, com isso, utilizar uma terapia mais adequada e mais segura (PFALLER et al., 2010a, 2011c, 2011d).

## 1.1 O gênero *Candida*

Segundo De Hoog & Guarro (1995) as leveduras do gênero *Candida* pertencem à divisão Ascomycota, classe Endomycetes e família Saccharomycetaceae. São organismos unicelulares constituídos por células esféricas ou elipsóides em brotamento multilateral, as quais apresentam diâmetro variável (3-10µm x 2-7µm) denominadas blastoconídeos. Em algumas espécies os blastoconídeos podem se aderir uns aos outros levando a formação de pseudohifas (Figura 1). Macroscopicamente as colônias apresentam-se viscosas ou secas e de coloração branca a creme (Figura 2). A maioria das espécies do gênero *Candida* é fermentadora e assimila um número limitado de carboidratos.

O gênero *Candida* é formado por aproximadamente 200 espécies, sendo que 20 são consideradas patogênicas (MEYER et al., 1998). Em 1995, Hazen listou sete espécies mais frequentemente isoladas de infecções em humanos: *Candida albicans*, *Candida glabrata*,



*Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*.

As espécies de *Candida* são ubíquas e atuam nos seres humanos como comensais, constituindo a microbiota do trato gastrointestinal, pele, unhas e uretra. O desequilíbrio entre os fatores de virulência desses organismos e os mecanismos de defesa do hospedeiro favorece a ocorrência de infecção, onde essas leveduras podem se tornar importantes patógenos oportunistas (DIGNANI et al., 2003).

Diversos fatores estão associados à virulência atribuída às espécies de *Candida*, entre eles: a) aderência e invasão tecidual; b) dimorfismo; c) produção de proteinases e fosfolipases; d) alteração fenotípica da espécie e) presença de glicoproteínas na superfície celular (mananas); f) formação de biofilmes (SOBEL et al., 1984; NELSON et al., 1991; ODDS, 1997; COTTER & KAVANAGH, 2000; GHANNOUM, 2000; WU et al., 2000; RAMAGE et al., 2001).

O aumento do número de pacientes imunocomprometidos ou com doenças graves hospitalizados por longos períodos favorece o desenvolvimento das infecções causadas por *Candida* spp., uma vez que ocorre diminuição dos mecanismos de defesa do paciente, possibilitando a invasão de mucosas e tecidos mais profundos (PFALLER & DIEKEMA, 2007).

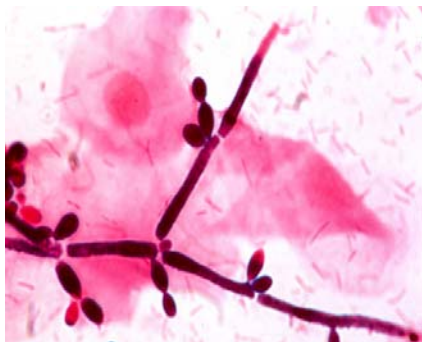


Figura 1 – Forma microscópica de *Candida* spp.  
Fonte: SILVA et al. (2006, p. 388)



Figura 2 – Macromorfologia de *Candida* spp.  
Fonte: Graphicshunt. com

## 1.2 Candidíases

A maioria das infecções causadas por *Candida* spp. apresentam origem endógena, entretanto, essas infecções podem ocorrer através de fontes exógenas de contaminação, como mãos, catéteres e nutrição parenteral contaminada (BONASSOLI et al., 2005; ALMIRANTE et al., 2006).

A ruptura das barreiras cutânea e mucosa, juntamente com desordens metabólicas, extremos de idade e disfunções no sistema fagocitário são alguns dos fatores que favorecem o desenvolvimento de infecções causadas por *Candida* spp. (PFALLER & DIEKEMA, 2007).

### 1.2.1 Manifestações clínicas das candidíases

#### 1.2.1.1 Candidíase cutâneo-mucosa ou superficial

Constituída por lesões que acometem especialmente pele, unhas e mucosas.

As lesões cutâneas que ocorrem em regiões maceradas da pele como axilas e regiões inframamária e crural são conhecidas como candidíase intertriginosa. Aparecem mais frequentemente em indivíduos diabéticos, obesos, com distúrbios endócrinos e em pacientes portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (TSUNEMI et al., 2010). Esse tipo de lesão macerada também pode se manifestar nos interdígitos, principalmente das mãos, como consequência da excessiva exposição à umidade, recebendo a denominação de candidíase interdigital (SEGAL & ELAD, 2005).

Na candidíase do tipo alérgica, as lesões cutâneas são eczematóides ou vesiculosas e dependem do sistema imune do hospedeiro. Essas lesões normalmente desaparecem com o tratamento (RIPPON, 1988).

Na chamada candidíase mucocutânea crônica, as lesões, muitas vezes exacerbadas, tornam-se recorrentes e persistentes; surgem na infância e estendem-se até a vida adulta. Esse fato é devido a uma deficiência endócrina ou imunológica congênita e, além da pele, podem atingir também unhas, mucosa oral e mucosa genital (KIRKPATRICK, 2001).

As lesões ungueais por *Candida* spp. caracterizam-se por apresentar dor, eritema e inflamação e, assim como na candidíase interdigital, atingem mais frequentemente as unhas das mãos, estando relacionadas com exposição excessiva à umidade. As manifestações clínicas incluem paroníquia e onicomicoses, onde há o comprometimento da base e lâmina

ungueal, respectivamente. *Candida albicans* é a espécie mais comumente encontrada causando esse tipo de infecção (ROCKWELL, 2001).

A candidíase da mucosa oral está associada a pacientes debilitados, como portadores de HIV, pacientes com câncer passando por tratamento quimioterápico, diabéticos, exposição prolongada à antibioticoterapia, recém-nascidos entre outros (ROSSIE & GUGGENHEIMER, 1997; HEDDERWICK & KAUFFMANN, 1997; DIGNANI et al., 2003). A candidíase oral pode apresentar-se de diversas formas: a) pseudomembranosa aguda; b) atrófica aguda; c) atrófica crônica; d) hiperplástica; e) queilite angular. Enquanto na candidíase pseudomembranosa aguda as lesões atingem a mucosa oral, na candidíase atrófica aguda as lesões atingem preferencialmente a língua. A queilite angular caracteriza-se por fissuras nos cantos da boca e a candidíase atrófica crônica é comum em usuários de dentaduras (SEGAL & ELAD, 2005).

Outra relevante forma de candidíase com comprometimento de mucosas é a candidíase vulvovaginal, visto que a recorrência da infecção é bastante comum. As lesões apresentam-se na forma de placas na superfície mucosa causando eritema e prurido intenso. Acomete principalmente mulheres no período fértil e possui como fatores predisponentes efeitos imunológicos, nutricionais e hormonais, dentre eles, a gravidez (SOBEL, 1992).

#### 1.2.1.2 Candidíase profunda ou disseminada

Infecção que ocorre em tecidos profundos atingindo órgãos viscerais de maneira isolada ou múltiplos órgãos, transformando-se em doença disseminada. Há o comprometimento de diversos órgãos entre eles os do trato gastrointestinal, urinário, trato respiratório, cardiovascular e sistema nervoso central, normalmente secundário a disseminação hematogênica. Também podem ocorrer infecções oculares e abdominais, entre outras (EDWARDS, 2000).

A infecção cardiovascular mais comum causada por *Candida* spp. é a endocardite, observada em pacientes com catéter venoso central e usuários de drogas endovenosas (ELLIS et al., 2001). Miocardite e pericardite são menos frequentes quando comparadas à endocardite, estando relacionadas à disseminação hematogênica (DIGNANI et al., 2003).

Devido ao fato do trato gastrointestinal ser considerado um reservatório natural de leveduras, torna-se necessário o monitoramento da colonização ou infecção neste sítio, especialmente em pacientes imunocomprometidos ou debilitados (KUSNE et al., 1994). Em infecções abdominais, o isolamento de *Candida* spp. é considerado relevante quando

proveniente de amostras cirúrgicas ou obtidas diretamente de coleção abdominal. Em amostras de drenagem, torna-se importante quando não corresponder a um único isolamento (UBEDA et al., 2010). Peritonite envolvendo *Candida* spp. pode ser observada em pacientes submetidos a diálise peritoneal e ambulatorial contínua (CAPD) e em pacientes com malignidades intra abdominais ou cirrose hepática (SUAREZ et al., 1994; GARCÍA-MARTOS et al., 2009).

As candidíases com disseminação hematogênica são conhecidas como candidemias e apresentam uma grande relevância devido a sua crescente incidência em países do mundo inteiro (DIEKEMA et al., 2002; ALMIRANTE et al., 2006).

### 1.3 Candidemias

As candidemias são as infecções fúngicas mais emergentes observadas nas duas últimas décadas, especialmente entre pacientes hospitalizados (MONTRAVERS & JABBOUR, 2006).

Espécies de *Candida* são responsáveis por uma substancial e relevante parcela das infecções de corrente sanguínea em hospitais do mundo inteiro. Nos Estados Unidos, *Candida* spp. é considerada a quarta causa mais comum dessas infecções, respondendo por aproximadamente 8% a 10% dos casos documentados (EDMOND et al., 1999; TRICK et al., 2002; WISPLINGHOFF et al., 2004; AQUINO et al., 2005; ALMIRANTE et al., 2006; FLÓREZ et al., 2009).

As elevadas taxas de morbidade associadas às infecções de corrente sanguínea por espécies de *Candida* levam ao aumento nos custos hospitalares. O prolongamento do tempo de internação constitui-se no principal responsável por esse aumento, pois corresponde a aproximadamente 85% dos custos. As despesas com terapia antifúngica também contribuem para o aumento nos custos hospitalares em pacientes com candidemia, sendo responsáveis por aproximadamente 10% das despesas (RENTZ et al., 1998; PFALLER & DIEKEMA, 2007). Em 2005, Morgan et al., em estudo sobre candidemias, verificaram aumento de \$ 6,000 para \$ 29,000 nas despesas hospitalares totais em pacientes recebendo tratamento para candidemia, enquanto que nos custos de hospitalização o aumento passou de \$ 3,000 para \$ 22,000. Neste mesmo estudo, o período de internação prolongou-se de 3 para 13 dias, comprovando a relação entre o tratamento adequado e o aumento significativo nas despesas hospitalares.

As candidemias são infecções predominantemente nosocomiais (ORTEGA et al., 2011; PFALLER et al., 2011b) acometendo diferentes enfermarias, especialmente Unidades

de Tratamento Intensivo (UTIs) e enfermarias geral, cirúrgica e oncológica (Quadro 1). Pfaller et al. (2011a) observaram uma taxa de 44,5% de casos de candidemias em pacientes internados em UTIs, enquanto que 55,5% dos casos encontravam-se entre pacientes internados em outras enfermarias. Entretanto, ao contrário dos países europeus e norte-americanos, na América Latina o número de casos de candidemias foi prevalente em UTIs, correspondendo a 56,5%, o que pode estar relacionado à disponibilidade de recursos e às diferenças nos padrões de práticas médicas.

Autores	Unidades Hospitalares					
	UTI (%)	Enfermaria Geral (%)	Enfermaria cirúrgica (%)	Pediatria (%)	Oncologia (%)	Unidade neonatal (%)
Diekema et al., 2002	40	56	--	--	--	--
Tortorano et al., 2004	40,2	--	--	--	--	1,2
Aquino et al., 2005	23,7	40,4	--	16	13,8	3,8
Colombo et al., 2006	46	23	15	11	--	--
França et al., 2008	41	59	--	--	--	--
Labbé et al., 2009	31	--	--	--	30	--
Motta et al., 2010	26,3	56	17,3	--	--	--

Quadro 1 – Principais unidades clínicas acometidas por episódios de candidemias  
(--) Dados não informados pelos estudos.

Os principais fatores de risco relacionados às candidemias podem ser observados no quadro 2 e incluem: a) períodos prolongados de internação hospitalar, especialmente em UTIs; b) uso de catéter venoso central e nutrição parenteral; c) antibioticoterapia de amplo espectro; d) terapia imunossupressiva e) pacientes submetidos a procedimentos invasivos, destacando-se a cirurgia abdominal; f) extremos de idade (TORTORANO et al., 2004; COLOMBO et al., 2006; PFALLER & DIEKEMA, 2007). Pacientes com tumores sólidos, transplantados de medula óssea e portadores do HIV, por serem mais suscetíveis a infecções devido à neutropenia, podem desenvolver candidemia secundária à doença de base (SLAVIN et al., 2010; ORTEGA et al., 2011).

Comorbidades e fatores de risco*	Percentuais de candidemias atribuídas a fatores de risco conforme diferentes autores								
	Pappas et al., 2003	Tortorano et al., 2004	Aquino et al., 2005	Colombo et al., 2006	França et al., 2008	St. Germain et al., 2008	Labbé et al., 2009	Bassetti et al., 2011	Ortega et al., 2011
1	95	--	71,8	70	77	79,9	52	--	64
2	53	--	25,2	21	49	31,8	--	--	22
3	90	--	97,7	94	97	67,3	--	--	--
4	29	--	66,4	32	39	18,3	44	--	30
5	36	44,7	38,1	39	43	31,8	15	45,1	--
6	50	--	48,9	38	26	--	--	--	13
7	10	--	28,2	6	10	--	--	--	14
8	26	22,5	15,2	--	25	18,8	10	41,1	20
9	--	12,3	19,8	10	--	9,6	39	7,7	22
10	26	--	--	13	--	20,9	--	11,2	14
11	--	6	8,4	--	--	4,6	--	--	--
12	4	3	6	3	--	1,8	1	0,9	8
13	3	3,5	5,5	2	--	3	2	1,4	10
14	--	--	12	--	8	1,8	--	--	--

Quadro 2 – Principais comorbidades e fatores de risco associados às candidemias

(--) dados não informados pelos estudos.

\* 1- Catéter venoso central; 2- Nutrição parenteral total; 3- Antibioticoterapia; 4- Corticoesteróides; 5- Cirurgia; 6- Ventilação mecânica; 7- Neutropenia; 8- Tumor sólido; 9- Doença hematológica; 10- Diabetes mellitus; 11- Recém-nascidos; 12- HIV; 13- Transplante; 14- Diálise.

A incidência das candidemias é variável nos diferentes países (Quadro 3). Índices mais reduzidos são encontrados em países como Estados Unidos, Canadá, Finlândia e alguns países europeus. No Brasil observa-se uma incidência substancialmente maior em relação aos demais países (2,49 casos/ 1000 admissões), o que pode estar atribuído às diferenças de recursos e dificuldades de implantação de programas de treinamento e de controle de infecção, entre outros (COLOMBO et al., 2006). Estudos nas diversas regiões brasileiras apontam diferenças na incidência de candidemias em cada região, entretanto todos esses índices são considerados elevados quando comparados aos países europeus e norte-americanos (Quadro 3).

<b>Autores</b>	<b>Origem</b>	<b>Período</b>	<b>Incidência/1000 admissões</b>	<b>Índice de mortalidade (%)</b>
<b>Mundial</b>				
Banerjee et al., 1991	EUA	1980-1989	0,28	--
Pittet & Wenzel, 1995	EUA	1983-1992	0,96	--
Macphail et al., 2002	Canadá	1992-1996	0,45	--
Tortorano et al., 2004	Europa	1997-1999	0,20-0,38	37,9
Almirante et al., 2005	Espanha	2002-2003	--	44
Colombo et al., 2006	Brasil	2003-2004	2,49	54
Poikonen et al., 2010	Finlândia	2004-2007	0,026-0,03	35
Bassetti et al., 2011	Itália	2008-2010	1,73	43,5
Ortega et al., 2011	Espanha	1991-2008	--	32
<b>Brasil</b>				
Aquino et al., 2005	RS	1998-2004	--	51,9
França et al., 2008	PR	2001-2004	1,27	56
Hinrichsen et al., 2008	PE	2003-2004	3,9	61
Motta et al., 2010	SP	2006	1,87	--
Pereira et al., 2010	SP	2004-2008	2,4	50
Sampaio Camargo et al., 2010	SP	1997-2007	0,74	44,2

Quadro 3 – Incidências mundiais e brasileiras de candidemias e seus respectivos índices de mortalidade  
(--) Dados não informados pelos estudos.

Os índices de mortalidade nas infecções de corrente sanguínea por *Candida* spp. são elevados e variam entre 30% e 60% (Quadro 3). Tais índices estão associados à severidade da doença de base e falhas no tratamento, onde a administração de antifúngico inadequado, atraso no início da terapia, doses inadequadas e tempo insuficiente de tratamento podem influenciar diretamente no aumento das taxas de mortalidade (PFALLER & DIEKEMA, 2007). Os maiores índices de mortalidade podem ser encontrados em unidades de tratamento intensivo e em unidades hemato-oncológicas atingindo taxas acima de 40% (TORTORANO, et al., 2004; WISPLINGHOFF et al., 2004). Em UTIs pediátrica e neonatal, podem ser encontradas taxas de mortalidade entre 20% e 30% (EGGIMANN et al., 2003). Em crianças, a mortalidade pode estar associada a neutropenia e intubação traqueal enquanto que em adultos pode estar relacionada com câncer, catéter urinário e terapia com corticoesteróides (PAPPAS et al., 2003).

Entre as espécies de *Candida* consideradas agentes de candidemias, sete são mais frequentemente isoladas. *Candida albicans* é a espécie predominante na maioria dos estudos, entretanto isolados de *Candida* não *albicans* representadas por *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida lusitaniae* e *Candida guilliermondii* possuem grande relevância na etiologia das candidemias (PFALLER & DIEKEMA, 2007; DIEKEMA et al., 2009).

A grande proporção de pacientes imunocomprometidos, entre eles, pacientes com câncer e neutropenia, favoreceu o aumento do número de isolamentos de espécies de *Candida* não *albicans* desde o início dos anos 90, as quais foram responsáveis por 35 a 65% das candidemias entre os anos de 1991 a 1998 (KRCMERY & BARNES, 2002). Esse fato expressa a relevância atribuída ao isolamento dessas espécies, visto que algumas delas tendem a ser mais resistentes à terapia antifúngica, contribuindo para o incremento das taxas de mortalidade (KRCMERY & BARNES, 2002; SLAVIN et al., 2010).

O aumento do uso de agentes antifúngicos como profilaxia nas infecções causadas por *Candida* spp., favorece mudanças na epidemiologia das candidemias (GIRMENIA et al., 1996; ALMIRANTE et al., 2006). Os antifúngicos azólicos, tais como o fluconazol, além de favorecer mudanças quanto ao perfil das espécies isoladas, também são os que mais frequentemente estão implicados no surgimento de resistência, sobretudo entre as espécies de *Candida* não *albicans* (EGGIMANN et al., 2003; MONTRAVERS & JABBOUR, 2006).

Diversos estudos apontam *Candida albicans* como principal isolado de episódios de candidemias (PFALLER et al., 2001; TRICK, et al., 2002; ALMIRANTE et al., 2006), no entanto, outros autores têm relatado que o grupo de espécies de *Candida* não *albicans* supera o número de isolados de *Candida albicans* (GONZÁLEZ et al., 2008; HORN et al., 2009; ORTEGA et al., 2011; PFALLER et al., 2011a).

Dados epidemiológicos revelam que nos Estados Unidos ocorre a prevalência de *C. albicans* seguida por *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, enquanto que em países da Europa, Canadá, América Latina e Ásia predominam *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. (DIEKEMA et al., 2002; ALMIRANTE et al., 2006; FLÓREZ et al., 2009; HORN et al., 2009; PFALLER et al., 2011b). O quadro 4 apresenta alguns dados de distribuição das espécies de *Candida*.

No Brasil, *C. albicans* é a espécie predominante nas candidemias. *C. tropicalis* ocupa a segunda posição entre os isolados em pacientes adultos, seguida por *C. parapsilosis* (COLOMBO et al., 2006).



Diferentemente dos Estados Unidos, porém semelhante aos países da Europa, Canadá, América Latina e Ásia, *C. glabrata* não é frequente no Brasil, ocupando o quinto lugar entre as espécies de *Candida* isoladas de candidemias (COLOMBO, et al., 2006).

Autores	Espécies (%)				
	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida krusei</i>
Aquino et al., 2005	45,0	--	24,4	15,3	--
Da Matta et al., 2007	40,0	4,4	23,8	24,3	--
Hinrichsen et al., 2008	29,0	9,0	33,0	24,0	--
Flórez et al., 2009	49,2	13,7	17,3	15,2	3,6
Horn et al., 2009	45,6	26,0	15,7	8,1	2,5
Pfaller et al., 2011b	48,4	18,2	17,1	10,6	2,0

Quadro 4 - Incidência das principais espécies de *Candida* isoladas de candidemias  
(--) Dados não informados pelos estudos.

Frente aos dados disponíveis é possível observar variação na epidemiologia das candidemias, o que reflete a necessidade constante de estudos de vigilância relativa aos perfis de suscetibilidade e distribuição das espécies para, assim, se obter uma melhor conduta terapêutica (COLOMBO et al., 2006).

### 1.3.1 Principais espécies isoladas de candidemias

#### 1.3.1.1 *Candida albicans*

Considerada o fungo leveduriforme oportunista mais comum na espécie humana, é também a espécie mais isolada de candidemias no mundo inteiro (DIEKEMA et al., 2002; TRICK et al., 2002; ALMIRANTE et al., 2006; COLOMBO, et al., 2006). Devido ao seu dimorfismo com a formação de hifas e pseudohifas, possui uma grande capacidade de aderência a epitélios e mucosas, o que contribui para a sua significativa virulência. Os demais fatores de virulência associados a *Candida albicans* são a produção de enzimas como proteinases e fosfolipases e a termotolerância, entre outros (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003; DIGNANI et al., 2003).

Isolados de *Candida albicans* geralmente mostram-se mais sensíveis aos agentes antifúngicos utilizados no tratamento das candidemias em comparação às demais espécies de *Candida* spp. (FLÓREZ et al., 2009). Entretanto, alguns estudos apontam desenvolvimento de resistência secundária ao fluconazol após exposição prolongada a esse antifúngico. O desenvolvimento de resistência é comumente observado em pacientes infectados pelo HIV que recebem tratamento prolongado com fluconazol no tratamento de candidíase orofaríngea (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003; MONTRAVERS & JABOUR, 2006).

### 1.3.1.2 *Candida parapsilosis*

Apresentando uma prevalência modificada ao longo dos anos, atualmente representa a segunda espécie mais isolada de candidemias na América Latina. Ocorre mais frequentemente em crianças, especialmente recém-nascidos prematuros (KRCMERY & BARNES, 2002; ALMIRANTE et al., 2006; NUCCI et al., 2010).

As infecções por *Candida parapsilosis* estão muitas vezes ligadas a fontes exógenas de contaminação, como por exemplo, mãos dos profissionais de saúde e frequentemente colonizam a pele humana, podendo ser introduzidas diretamente na corrente sanguínea (BONASSOLI et al., 2005; ALMIRANTE et al., 2006; PFALLER et al., 2008a).

*Candida parapsilosis* possui habilidade em formar biofilmes, aderindo eficientemente a catéteres, válvulas cardíacas ou outros dispositivos, além de ser capaz de proliferar-se em soluções de nutrição parenteral. Esses fatos associam os fatores de risco de infecção por esta espécie ao uso de catéter venoso central e de nutrição parenteral. Outros fatores de risco incluem a prematuridade e cirurgias (DIEKEMA et al., 1997; KRCMERY & BARNES, 2002; KUHN et al., 2004; ALMIRANTE et al., 2006).

O índice de mortalidade atribuído a *Candida parapsilosis* é considerado baixo quando comparado às demais espécies de *Candida* (HORN et al., 2009; ORTEGA et al., 2011). Esta espécie possui boa resposta ao tratamento com antifúngicos sendo comumente sensível ao fluconazol, aos novos triazólicos, bem como a anfotericina B. Contudo, pode apresentar sensibilidade reduzida as equinocandinas apresentando Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) mais elevadas e, algumas vezes, desenvolvimento de resistência (FORREST et al., 2008; LABBÉ et al., 2009; SILVA et al., 2009; MOTTA et al., 2010).

Estudos moleculares apontam a existência de três diferentes espécies formando o “Complexo *Candida parapsilosis*”: *Candida parapsilosis* propriamente dita, a qual é predominante, *Candida orthopsilosis* e *Candida metapsilosis* (TAVANTI et al., 2005).

Enquanto essas duas últimas espécies respondem bem ao tratamento com antifúngicos, a primeira pode apresentar suscetibilidade diminuída ao fluconazol, anfotericina B e equinocandinas (SILVA et al., 2009).

#### 1.3.1.3 *Candida tropicalis*

Ocupando o terceiro lugar entre os isolados de candidemias na América Latina e o segundo isolado mais freqüente em algumas regiões brasileiras, *Candida tropicalis* possui virulência semelhante à *Candida albicans*, porém apresenta maior potencial de disseminação, estando associada a elevados índices de mortalidade (KRCMERY & BARNES, 2002; COLOMBO et al., 2006; FRANÇA et al., 2008). Ocorre mais frequentemente em pacientes adultos e idosos, sendo as crianças pouco afetadas. Entre os principais fatores de risco para o desenvolvimento de infecção por *Candida tropicalis*, o câncer ocupa um lugar de destaque, seguido pela presença de diabetes. A neutropenia também é um fator de risco, pois contribui para a maior disseminação da infecção (KRCMERY & BARNES, 2002; NUCCI & COLOMBO, 2007; MUÑOZ et al., 2011).

Isolados de *Candida tropicalis* são comumente sensíveis ao fluconazol e anfotericina B, entretanto, podem apresentar desenvolvimento de resistência após exposição a esses antifúngicos (KRCMERY & BARNES, 2002; FLÓREZ et al., 2009).

#### 1.3.1.4 *Candida glabrata*

Considerada um importante agente causador de candidemias, *Candida glabrata* ocupa o segundo lugar entre os isolados de *Candida* spp. nos Estados Unidos e Europa (DIEKEMA et al., 2002; HORN et al., 2009; PFALLER et al., 2011b). Ocorre mais comumente em pacientes idosos, sendo menos frequente em jovens. Em estudo feito por Diekema et al. (2002) foi observada maior prevalência em adultos acima de sessenta e cinco anos de idade. Entre os principais fatores de risco para infecção encontram-se a profilaxia com antifúngicos azólicos, destacando-se o fluconazol, cirurgia do trato gastrointestinal e cirurgia em pacientes com tumores sólidos (HORN et al., 2009; SLAVIN et al., 2010).

Embora considerada menos patogênica em relação à *Candida albicans*, alguns estudos evidenciaram elevados índices de mortalidade atribuída a *Candida glabrata* (GUMBO et al., 1999, ALONSO- VALLE et al., 2003). Esse fato pode ser devido a menor sensibilidade ou resistência de *Candida glabrata* ao fluconazol e, muitas vezes, a anfotericina B (DIEKEMA

et al., 2002; PFALLER et al., 2001; PFALLER et al., 2002). A profilaxia com fluconazol pode causar uma pressão seletiva levando ao aparecimento de isolados resistentes (KRCMERY & BARNES, 2002).

Os novos agentes triazólicos são mais eficazes que o fluconazol contra isolados de *Candida glabrata*, porém, tem sido evidenciada a existência de resistência cruzada entre esses agentes. Com isso, o uso de antifúngicos azólicos é menos recomendado como tratamento nas infecções por *Candida glabrata*. Neste caso, as equinocandinas tem se tornado uma alternativa bastante segura (PFALLER et al., 2001; COLOMBO et al., 2006; PAPPAS et al., 2009).

#### 1.3.1.5 *Candida krusei*

Esta espécie emergente em candidemias acomete pacientes adultos com câncer, especialmente leucêmicos e transplantados de medula óssea. Sua incidência tem sido raramente observada em neonatos (KCMERY & BARNES, 2002; WISPLINGHOFF et al., 2004).

O aumento na incidência de *Candida krusei* está diretamente relacionada ao uso de fluconazol, pois essa espécie é intrinsecamente resistente a esse antifúngico. Por isso, a profilaxia com fluconazol constitui-se no principal fator de risco de infecção por *Candida krusei*, seguido por neutropenia (KRCMERY & BARNES, 2002; HORN et al., 2009; ORTEGA et al., 2011).

Estudos conduzidos por WISPLINGHOFF et al. (2004), HORN et al. (2009) e ORTEGA et al. (2011) atribuíram à *Candida krusei* o maior índice de mortalidade entre as infecções causadas por espécies de *Candida* nos Estados Unidos e na Espanha; todavia sugerem que tal fato pode estar relacionado às deficiências imunológicas dos pacientes onde esta espécie é frequentemente isolada.

Apesar da resistência intrínseca ao fluconazol, a resistência cruzada *in vitro* com voriconazol em isolados de *Candida krusei* é bastante incomum, fato que pode ser atribuído a melhor ligação do voriconazol à citocromo P-450, favorecendo o sucesso clínico nos pacientes infectados (PFALLER & DIEKEMA, 2007).

Atualmente uma equinocandina é recomendada no tratamento de infecções devido a *Candida krusei* em pacientes neutropênicos. Como alternativa, também pode ser utilizada anfotericina B na sua formulação lipídica ou então, voriconazol (PAPPAS et al., 2009).

### 1.3.1.6 *Candida lusitaniae*

Isolada com menor frequência em infecções de corrente sanguínea, essa espécie está relacionada a infecções em pacientes transplantados de medula óssea e submetidos à quimioterapia intensa (WINGARD, 1995). O isolamento de *Candida lusitaniae* torna-se relevante devido a sua associação com resistência primária ou desenvolvimento de resistência secundária a anfotericina B, a qual não é preconizada como agente profilático e nem como terapia empírica frente a essas espécies (YOON et al., 1999; MILLER et al., 2006; ATKINSON & KONTOYIANNIS, 2008). Assim, o fluconazol pode ser utilizado como terapia inicial no tratamento de candidemias ocasionadas por *Candida lusitaniae* (KRCMERY & BARNES, 2002).

### 1.3.1.7 *Candida guilliermondii*

Espécie raramente isolada em candidemias teve sua proporção aumentada, correspondendo a incidências de 0,7 a 5,5% dos isolados durante a década de 90 (KRCMERY & BARNES, 2002). Em estudos brasileiros *Candida guilliermondii* ocupa a quinta e a sexta posição entre os isolados de candidemias com percentuais de 3,0% e 2,4% respectivamente (COLOMBO et al., 2006; DA MATTA et al., 2007). Essa espécie acomete mais frequentemente pacientes com câncer, internados em UTIs e clínicas cirúrgicas (KRCMERY & BARNES, 2002).

Assim como *Candida lusitaniae*, isolados de *Candida guilliermondii* também podem apresentar menor sensibilidade a anfotericina B, portanto, a terapia inicial com fluconazol sugere um melhor prognóstico (WINGARD et al., 1995; KRCMERY & BARNES, 2002).

## 1.3.2 Suscetibilidade das principais espécies de *Candida* isoladas de candidemias

Atualmente os antifúngicos mais comumente empregados para o tratamento das candidemias são os antifúngicos azólicos seguidos pelas equinocandinas. O uso de anfotericina B, devido ao risco de nefrotoxicidade, é recomendado como alternativa para os casos em que há restrição à utilização dos demais agentes antifúngicos, como por exemplo, isolados de *Candida krusei* e *Candida glabrata*, ambas evidenciando menor suscetibilidade aos azólicos (HORN et al., 2009; PAPPAS et al., 2009).

A suscetibilidade das espécies de *Candida* aos agentes antifúngicos é variável, por isso, o tratamento das candidemias deve considerar a utilização de terapia empírica e a espécie isolada, bem como o seu respectivo perfil de suscetibilidade (HORN et al., 2009).

*C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* apresentam grande sensibilidade ao fluconazol e anfotericina B, enquanto que *C. glabrata* possui sensibilidade reduzida a esses antifúngicos. *C. krusei* apresenta resistência intrínseca ao fluconazol e frequentemente pode ser resistente a anfotericina B. Este antifúngico pode apresentar menor sensibilidade frente a isolados de *C. lusitanae* e *C. guilliermondii* (PFALLER et al., 2001; DIEKEMA et al., 2002; PFALLER & DIEKEMA, 2007; ATKINSON & KONTOYIANNIS, 2008; FLÓREZ et al., 2009).

Os novos triazólicos como posaconazol, ravuconazol e voriconazol possuem elevada atividade *in vitro* contra espécies de *Candida*, inclusive as resistentes ao fluconazol e itraconazol. Entretanto, essas espécies requerem CIMs mais elevadas (DIEKEMA et al., 2002). A ocorrência de resistência cruzada entre os novos triazóis e fluconazol é observada em espécies de *Candida* previamente expostas ao fluconazol (PFALLER et al., 2001; COLOMBO et al., 2006; PFALLER & DIEKEMA, 2007; GONZÁLEZ et al., 2008; MOTTA et al., 2010).

As equinocandinas possuem elevada atividade antifúngica frente às principais espécies de *Candida*. Entretanto, alguns estudos têm detectado reduzida sensibilidade em isolados de *C. parapsilosis* (SILVA, et al., 2009; ). Forrest et al. (2008) apontaram forte correlação entre o uso prévio de caspofungina e o aumento da incidência de candidemias por *C. parapsilosis*. Esse mesmo estudo revelou tendência a menores índices de infecções por *C. glabrata* e *C. tropicalis*.

#### **1.4 Agentes antifúngicos**

Durante muitos anos a terapêutica antifúngica foi baseada em agentes poliênicos e azóis, os quais ainda são bastante utilizados no tratamento de candidemias; entretanto, a ocorrência de falhas terapêuticas e a toxicidade são fatores que podem limitar o emprego desses agentes (CATALÁN & MONTEJO, 2006; PFALLER & DIEKEMA, 2007). O aumento do arsenal terapêutico antifúngico trouxe novas opções de tratamento com agentes menos tóxicos e, ao mesmo tempo, bastante eficazes (MORA-DUARTE et al., 2002; GUBBINS & ANAÏSSIE, 2009). Os novos agentes antifúngicos triazólicos e as equinocandinas possuem maior atividade contra as espécies de *Candida*, sobretudo as mais

resistentes, surgindo como uma nova alternativa ao tratamento dessas infecções (GUBBINS & ANAISSIE, 2009).

Os agentes antifúngicos eficazes para o tratamento das candidemias compreendem quatro principais categorias: a) poliênicos representados pela anfotericina B; b) triazóis, incluindo fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol; c) equinocandinas representadas pela caspofungina, anidulafungina e micafungina; d) os antimetabólitos ou pirimidinas representados pela flucitosina (PAPPAS et al., 2009).

#### 1.4.1 Agentes antifúngicos poliênicos

Representados principalmente pela anfotericina B, os antifúngicos poliênicos foram por muitos anos considerados a terapia padrão no tratamento das infecções fúngicas sistêmicas. O mecanismo de ação desses agentes está relacionado à presença de esteróis na membrana fúngica. Os poliênicos ligam-se hidrofobicamente ao ergosterol da membrana onde ocorre a formação de poros aquosos. Tais poros provocam uma despolarização da membrana, alterando a sua permeabilidade com conseqüente perda de elementos citoplasmáticos vitais e inativação da célula fúngica (GHANNOUM & RICE, 1999; CATALÁN & MONTEJO, 2006).

A anfotericina B, isolada a partir do actinomiceto *Streptomyces nodosus* pode exercer efeito fungistático ou fungicida, dependendo da concentração alcançada no local da infecção. Sua administração é através de infusão intravenosa, pois não é absorvida por via oral (CATALÁN & MONTEJO, 2006). Apesar de ser muito eficaz no tratamento da maioria das infecções fúngicas, a anfotericina B apresenta vários efeitos adversos, sendo a nefrotoxicidade uma das complicações com maior relevância. Devido a esse fato, associado principalmente à forma de anfotericina B desoxicolato (AmB-d), a indústria farmacêutica desenvolveu formulações lipídicas de anfotericina B as quais apresentam maior tolerância, possuem toxicidade reduzida e permitem a administração de dosagens maiores do fármaco; entretanto, essas formulações apresentam um custo mais elevado. Tais formulações são representadas por anfotericina B complexo lipídico (ABLC), anfotericina B dispersão coloidal (ABCD) e anfotericina B lipossomal (L-AmB). Essas diferentes formas farmacêuticas possuem o mesmo espectro de ação que a AmB-d diferindo somente quanto as suas atividades farmacológicas (GHANNOUM & RICCE, 1999; CATALÁN & MONTEJO, 2006; PAPPAS et al., 2009).

O espectro de atividade da anfotericina B é bastante amplo, sendo eficaz contra a maior parte dos fungos leveduriformes e filamentosos. Entretanto existem espécies que

exibem resistência clínica a esse antifúngico ou requerem uma concentração inibitória mínima mais elevada. Entre essas espécies, podem ser citadas *Pseudallescheria boydii*, algumas espécies de *Trichosporon* e *Fusarium*. A maioria das espécies de *Candida* apresenta-se sensível a anfotericina B, no entanto, *Candida glabrata* e *Candida krusei* constituem as espécies que apresentam menor sensibilidade a esse antifúngico. Por isso, recomenda-se que sejam utilizadas dosagens maiores para o tratamento quando a infecção é causada por essas duas espécies (SPELLBERG et al., 2006; PFALLER & DIEKEMA, 2007; PAPPAS et al., 2009). Em estudo feito por Krogh-Madsen et al. (2006) foi observado o aumento da resistência de isolados de *Candida glabrata* a anfotericina B.

Isolados de *Candida lusitanae*, *Candida tropicalis* e *Candida guilliermondii* normalmente apresentam-se sensíveis a anfotericina B, porém, alguns estudos evidenciam o desenvolvimento de resistência secundária em alguns isolados após o tratamento (YOON et al., 1999; KRCMERY & BARNES, 2002; MILLER et al., 2006; PFALLER & DIEKEMA, 2007). Em 2002, McClenny et al. observaram o desenvolvimento de um isolado de *Candida lusitanae* resistente a anfotericina B após terapia com a mesma, ressaltando a importância da realização de novos testes de suscetibilidade durante a realização do tratamento.

#### 1.4.2 Antifúngicos azólicos

Durante vários anos, a anfotericina B foi o único antifúngico eficaz no tratamento das infecções fúngicas invasivas apesar da sua conhecida nefrotoxicidade. O surgimento dos antifúngicos imidazólicos e triazólicos no final dos anos 80 e início dos anos 90 possibilitou uma utilização mais ampla dos antifúngicos, pois tais agentes, além de apresentarem boa atividade antifúngica local e sistêmica, resultando em eficácia clínica, também exibem efeitos menos tóxicos e, portanto, mais seguros quando comparados a anfotericina B (GHANNOUM & RICE, 1999).

Os azólicos caracterizam-se por apresentar um anel imidazólico livre e, de acordo com o número de nitrogênios presentes neste anel, podem ser classificados em imidazólicos, como o miconazol e cetoconazol e os triazólicos, como fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol. Estes três últimos agentes constituem-se nos triazóis de amplo espectro e possuem destacada atividade contra a maioria das espécies de *Candida* quando comparados ao fluconazol (CATALÁN & MONTEJO, 2006; PFALLER & DIEKEMA, 2007).

Os antifúngicos azólicos exercem, de modo geral, atividade fungistática e possuem ação na membrana celular do fungo ao inibirem a enzima 14- $\alpha$ -demetilase, a qual é



dependente da citocromo P-450 comprometendo a síntese do ergosterol da membrana, e, conseqüentemente, aumentando a sua permeabilidade e inativação da célula. A ação desses antifúngicos é bastante ampla, porém, o espectro de atividade varia conforme o grau de inibição da enzima 14- $\alpha$ -demetilase (SANATI et al., 1997; PFALLER et al., 2006).

Desde sua aprovação nos anos 90, o fluconazol vem sendo amplamente utilizado no tratamento de candidemias e outras candidíases invasivas. É um antifúngico com boa atividade e biodisponibilidade, sendo facilmente absorvido por via gastrointestinal, não dependendo do pH gástrico. Apresenta baixa toxicidade, o que o torna amplamente utilizado na profilaxia dessas infecções (CHARLIER et al., 2006; PAPPAS et al., 2009; KETT et al., 2011).

O fluconazol é bastante ativo contra leveduras, contudo, não exerce efeito contra fungos filamentosos. Com exceção de *Candida krusei*, a qual é intrinsecamente resistente, o fluconazol apresenta boa atividade contra a maioria das espécies de *Candida*, apresentando baixos índices de resistência, especialmente entre as espécies de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida lusitaniae* e *Candida kefyr*. No entanto, elevados índices de resistência ou sensibilidade diminuída podem ser observados entre *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida rugosa* e *Candida famata* (PFALLER & DIEKEMA, 2007; GUBBINS & ANAÏSSIE, 2009).

A resistência aos antifúngicos azólicos pode envolver dois mecanismos principais, os quais podem manifestar-se isoladamente ou combinados. Tais mecanismos incluem: a) modificação qualitativa ou quantitativa na enzima 14- $\alpha$ -demetilase na expressão de resistência aos azóis; b) o mecanismo de efluxo que, permitindo a saída do antifúngico do interior da célula, diminui a concentração do mesmo, o que resulta em inibição da enzima alvo (GHANNOUM & RICE, 1999). Parkinson et al. (1995) demonstraram a associação entre a quantidade de fluconazol acumulado em isolados de *Candida glabrata* e o mecanismo de efluxo ativo, onde foi observada menor quantidade do antifúngico nos isolados resistentes.

O aumento do uso do fluconazol como profilático favorece a emergência de espécies resistentes aos azóis, especialmente *Candida krusei* e *Candida glabrata*. Além disso, também é possível observar o surgimento de resistência cruzada entre o fluconazol e os demais antifúngicos azólicos, pois esses agentes apresentam o mesmo mecanismo de ação e, conseqüentemente, podem apresentar o mesmo mecanismo de resistência. Portanto, isolados resistentes ao fluconazol podem apresentar resistência aos demais triazólicos, mesmo que estes sejam considerados mais potentes. O uso desses azólicos deve ser monitorado em pacientes que sofreram exposição prévia ao fluconazol (PFALLER E DIEKEMA, 2007).

De acordo com as diretrizes para o tratamento de candidemias, o fluconazol permanece como recomendação na terapia inicial para pacientes não neutropênicos, clinicamente estáveis e sem exposição recente a antifúngicos azólicos (PAPPAS et al., 2009).

Diferentemente do fluconazol, o itraconazol apresenta maior atividade frente às espécies de *Candida*, incluindo as espécies resistentes ao fluconazol. Também exerce atividade contra fungos filamentosos, entretanto não é efetivo contra *Fusarium* spp. e zigomicetos.

Entre os novos agentes triazólicos (voriconazol, ravuconazol e posaconazol) o voriconazol surge como principal representante dessa classe devido ao seu amplo espectro de ação, exercendo atividade contra a maioria das espécies fúngicas envolvidas em infecções graves. Além de possuir atividade contra as espécies de *Candida* resistentes ao fluconazol, especialmente *Candida krusei* e *Candida glabrata*, este antimicótico é bastante efetivo contra *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Histoplasma* spp. e *Scedosporium* spp. (GUBBINS & ANAÏSSIE, 2009).

Em janeiro de 2005 o voriconazol foi indicado pelo Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento das candidíases invasivas em pacientes não neutropênicos. A determinação de concentrações inibitórias mínimas de voriconazol em isolados de *Candida* spp. com reduzida suscetibilidade ao fluconazol sugerem que pode ocorrer resistência cruzada entre o voriconazol e os demais antifúngicos azólicos (PFALLER et al., 2006).

Disponível nas apresentações oral e parenteral, o voriconazol apresenta uma elevada biodisponibilidade e, apesar da sua absorção não sofrer efeito do pH gástrico, ela pode diminuir na presença de alimentos. Mesmo com significativa eficácia, este antifúngico necessita ser administrado mais frequentemente e possui alguns efeitos adversos, entre eles a baixa tolerância quando comparado aos demais agentes antifúngicos sistêmicos. Isso faz com que, nas candidemias, o voriconazol seja recomendado como terapia oral de apoio quando a infecção é causada por *Candida krusei* ou *Candida glabrata* sensível a este antifúngico (PAPPAS et al., 2009).

#### 1.4.3 Equinocandinas

Representadas pela caspofungina, micafungina e anidulafungina, as equinocandinas agem por inibição não competitiva da enzima 1,3-  $\beta$ -D-glucana sintase impedindo a formação de 1,3-  $\beta$ -D-glucana, um polímero essencial na síntese da parede celular dos fungos. Exercem atividade contra *Aspergillus* spp. e possuem ação fungicida sobre todas as espécies de

*Candida*, inclusive as resistentes aos poliênicos e azóis. No entanto, exercem pouca atividade frente a *Fusarium* spp., *Trichosporon* spp., *Cryptococcus neoformans* e zigomicetos (DENNING, 2002; VAZQUEZ, 2005).

As equinocandinas apresentam baixa absorção por via oral, por isso estão disponíveis apenas para administração endovenosa. Além de apresentarem excelente ação contra as espécies de *Candida* esses antifúngicos possuem baixa toxicidade, poucas interações medicamentosas, e sua farmacocinética permite a administração de uma única dosagem diária. Essas características favorecem a utilização de equinocandinas na terapia inicial em pacientes hemodinamicamente instáveis, que sofreram exposição prévia aos azóis ou ainda, quando o isolado corresponder a *Candida krusei* ou *Candida glabrata* (DENNING, 2002; PAPPAS et al., 2009).

A caspofungina foi a primeira equinocandina a receber aprovação pelo FDA, sendo considerada tão eficaz quanto a anfotericina B, todavia, com a vantagem de apresentar menor toxicidade, o que a torna uma boa alternativa no tratamento das candidíases invasivas (MORA-DUARTE et al., 2002; DENNING, 2003).

A micafungina e a anidulafungina possuem atividade semelhante à caspofungina. Um estudo comparativo entre a atividade do fluconazol e anidulafungina realizado por Kett et al. (2011) demonstrou que esta possui uma atividade superior ao fluconazol frente a isolados de candidemias em pacientes com doenças graves, concordando com as diretrizes propostas recentemente pela Infectious Diseases Society of America (IDSA).

Apesar da elevada eficácia frente às espécies de *Candida*, as equinocandinas apresentam menor atividade contra isolados de *Candida parapsilosis* e *Candida guilliermondii* (DENNING, 2002). Um estudo realizado por Pfaller et al. (2008a) mostrou que isolados de *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* apresentaram valores de CIM mais elevados para a caspofungina em relação às outras espécies de *Candida*, entretanto, esses valores ainda se encontravam dentro da faixa de sensibilidade. A resistência atribuída às equinocandinas é pouco comum, entretanto, já foram observados casos de resistência a caspofungina em isolados de *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis* (MOUDGAL et al., 2005; KROGH-MADSEN et al., 2006).

#### 1.4.4 Pirimidinas

A flucitosina, representante da classe das pirimidinas, atua inibindo a síntese de proteínas na célula fúngica, é uma droga análoga à citosina e possui um amplo espectro de ação contra as espécies de *Candida*, *Cryptococcus neoformans* e *Saccharomyces*, não apresentando atividade contra *Candida krusei*, zigomicetos e fungos dermatófitos (THOMPSON et al., 2009).

Disponível na apresentação oral é um antifúngico bem absorvido pelo trato gastrointestinal, além de possuir uma boa distribuição, metabolização e excreção, o que resulta em baixa toxicidade e efeitos adversos reduzidos (PAPAS et al., 2009).

Na maioria das vezes administrada em combinação com outros agentes antifúngicos como a anfotericina B, a flucitosina raramente é utilizada como único agente no tratamento de infecções fúngicas, visto que o desenvolvimento de resistência pode acontecer rapidamente (PEMÁN et al., 2009).

A combinação de flucitosina com a anfotericina B é bastante comum no tratamento de meningite criptocócica (PAPPAS et al., 2009; THOMPSON et al., 2009).

### 1.5 Testes de suscetibilidade aos agentes antifúngicos

As necessidades de se disponibilizar ensaios com agentes antimicóticos são, a cada dia, mais prementes, quer como consequência do aumento das infecções fúngicas em pacientes imunodeprimidos, quer devido à emergência do fenômeno de resistência apresentado pelas espécies isoladas (PEREA & PATTERSON, 2002).

Embora seja utilizado tratamento adequado, a resposta à terapia antifúngica pode não ser satisfatória, visto que também é dependente das características clínicas do paciente, existindo a possibilidade de ocorrer falhas terapêuticas em aproximadamente 10% dos casos de candidemia (REX & PFALLER, 2002). Devido a tais falhas, os testes de avaliação da suscetibilidade de fungos a agentes antifúngicos passam a ter grande relevância a fim de detectar isolados resistentes e direcionar a terapêutica, pois segundo Rex e Pfaller (2002), a resistência *in vitro* a um agente antifúngico pode ser preditivo de insucesso clínico.

Os testes de suscetibilidade avaliam a atividade inibitória dos antimicóticos frente a patógenos fúngicos leveduriformes e filamentosos. Estes testes têm sido constantemente adaptados e padronizados na tentativa de uniformizar suas interpretações (CLSI, 2008).

Em 1982, o National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), hoje Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), órgão responsável pela normatização de técnicas de laboratório clínico nos Estados Unidos, designou um subcomitê para padronizar os testes de suscetibilidade de fungos a drogas antifúngicas. Em 1997 foi aprovado um documento com a padronização de testes de suscetibilidade para fungos leveduriformes (M27-A), a qual foi aprimorada em 2002 (M27-A2). Em 2008 tornou-se disponível a versão mais recente desses documentos, o M27-A3 (NCCLS, 1997; NCCLS, 2002; CLSI, 2008). Esses documentos preconizam a metodologia de diluição em caldo como padrão ouro para testes de suscetibilidade aos agentes antifúngicos.

O documento M27-A3 apresenta a determinação atualizada dos pontos de corte ou *breakpoints* para a avaliação da suscetibilidade de fluconazol, itraconazol, voriconazol, flucitosina e equinocandinas para fungos leveduriformes (CLSI, 2008).

Os testes de suscetibilidade permitem monitorar a evolução da resistência antifúngica e são bastante úteis frente a isolados de *Candida* oriundas de pacientes em estado grave (PFALLER, et al., 2011b).

Embora a identificação da espécie isolada possa, muitas vezes, direcionar a terapia antifúngica, a realização dos testes de suscetibilidade apresenta significativa relevância, pois os isolados podem apresentar diferentes perfis, o que pode acarretar em falha terapêutica (CLSI, 2008). Com isso, sugere-se que, na rotina laboratorial, seja realizado o teste de suscetibilidade ao fluconazol sempre que for isolada uma espécie de *Candida* a qual apresente possibilidade de resistência aos antifúngicos azólicos ou que não responda à terapia antifúngica inicial. O teste também é preconizado quando *Candida glabrata* for isolada da corrente sanguínea ou outros sítios estéreis (PAPPAS, et al., 2009).

#### 1.5.1 As novas propostas para interpretação dos testes de suscetibilidade

O CLSI determinou os pontos de corte ou *breakpoints* baseado em modelos de infecção em animais de experimentação e em dados de farmacodinâmica dos agentes antifúngicos. O parâmetro mais preditivo da eficácia de um antifúngico é a área sob a curva da concentração de um fármaco (*area under curve* – AUC) dividida pela concentração inibitória mínima (CIM); logo, este parâmetro envolve duas variáveis: AUC/CIM (DIEKEMA & PFALLER, 2012). Por outro lado, a determinação da curva de concentração plasmática de um fármaco em cada paciente, revela-se impraticável. Então, considerando-se que a AUC é muito próxima da dose total diária em miligramas recebida pelo paciente, tem-

se, utilizado este parâmetro (REX et al., 2001). Assim, o CLSI adotou a relação dose de antifúngico/CIM como parâmetro substitutivo para AUC/CIM (REX et al., 2001).

Em seguida, o CLSI analisou as relações entre dose, CIM e a resolução clínica frente aos antifúngicos de onde advém que o quociente dose/CIM sendo  $> 25$  é preditivo de bom desfecho (DIEKEMA & PFALLER, 2012). Com base nestas relações, o CLSI estabeleceu os *breakpoints* vigentes no documento M27-A3 (CLSI, 2008).

O European Committee for Antifungal Susceptibility Tests (EUCAST), baseado em seus próprios parâmetros para o fluconazol, relatou 94% de sucesso dos tratamentos (136 de 145 episódios) quando a CIM para o fluconazol era  $\leq 2,0 \mu\text{g/mL}$ ; sucesso de 66% quando a CIM =  $4,0 \mu\text{g/mL}$  e de 12% quando a CIM  $\geq 8,0 \mu\text{g/mL}$ . Utilizando-se doses inferiores a 400 mg/dia obtiveram relação dose/CIM  $> 25$  para 91,2 % dos casos (RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2007).

Um segundo estudo validou os pontos de corte (*breakpoints*) do EUCAST com base no sucesso clínico dos pacientes. Todavia, os *breakpoints* variavam conforme as espécies de *Candida*: *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* correlacionavam-se com sucesso ou fracasso terapêutico, com base em *breakpoints* diferentes do que os para *C. glabrata*.

Reavaliando as discrepâncias entre os métodos, o CLSI fez um esforço para harmonizar a sua técnica com a do EUCAST (PFALLER et al., 2010a, 2011c). Assim, após estabelecer excelente concordância entre CIM com leitura em 24h e examinar as correlações entre CIM e desfecho com base nos dois métodos, o Subcomitê para Testes de Suscetibilidade aos Antifúngicos do CLSI recomendou o ajuste dos *breakpoints* para *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* nos testes com fluconazol e voriconazol. Os novos *breakpoints* propostos estão dispostos no quadro 5.

<b>Breakpoints para o fluconazol (µg/mL)</b>			
<b>Espécies</b>	<b>Sensível</b>	<b>Sensível dose dependente (SDD)</b>	<b>Resistente</b>
<i>C. albicans</i>	≤ 2,0	4,0	≥ 8,0
<i>C. tropicalis</i>	≤ 2,0	4,0	≥ 8,0
<i>C. parapsilosis</i>	≤ 2,0	4,0	≥ 8,0
<i>C. glabrata</i>	?	≤ 32,0	≥ 64
<b>Breakpoints para o voriconazol (µg/mL)</b>			
<i>C. albicans</i>	≤ 0,125	0,25 – 0,5	≥ 1,0
<i>C. tropicalis</i>	≤ 0,125	0,25 – 0,5	≥ 1,0
<i>C. parapsilosis</i>	≤ 0,125	0,25 – 0,5	≥ 1,0
<i>C. krusei</i>	≤ 0,5	1,0	≥ 2,0
<i>C. glabrata</i>	?	?	?

Quadro 5 – Novos *breakpoints* para fluconazol e voriconazol considerando as espécies de *Candida*  
 Fonte: PFALLER et al., (2010a, 2011c).

Os dados para *C. glabrata* foram considerados ainda insuficientes para se demonstrar com clareza correlações entre os testes *in vitro* e desfecho clínico frente ao voriconazol.

Para as equinocandinas, o CLSI adotou que CIM ≤ 2,0 era preditivo de eficácia do tratamento (PFALLER et al., 2008a). Baseado neste parâmetro o sucesso dos tratamentos foi de 88% para anidulafungina, 79% para a caspofungina e de 80% para a micafungina. Um valor de CIM para definir resistência não pôde ser estabelecido devido à raridade desta resistência entre os isolados de *Candida*. Assim, o CLSI decidiu recomendar *breakpoints* apenas como “Sensível” devido a ausência de *Candida* spp. equinocandina-resistente. Os isolados com CIM > 2,0 foram considerados “não-sensíveis”(PFALLER et al., 2008a).

Por outro lado tal proposta não considerou que o “*cutoff* epidemiológico” (ECV ou *epidemiological cutoff values*) para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* era de 8 a 64 vezes menor do que o considerado como *breakpoint* para definir sensibilidade pelo CLSI (PFALLER et al, 2010b). O “*cutoff* epidemiológico” é um parâmetro utilizado como medida para se detectar cepas que exibam CIM mais elevadas do que a maioria das chamadas “cepas-selvagens”. As cepas “não-selvagens” podem evidenciar mecanismos de resistência e constituem-se em alerta.

Em adição à proposta inicial do CLSI, alguns relatos de resistência a caspofungina somados a estudos de cinética da enzima glucana sintetase, apontavam para a necessidade de

se ajustar o *breakpoint* proposto ( $CIM \leq 2,0$ ) para que os testes pudessem prever a resistência às equinocandinas.

Neste contexto, o CLSI reavaliou os *breakpoints* para as equinocandinas e propôs *breakpoints* espécie-específicos para *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida guilliermondii*, conforme indicados no quadro 6.

<b>Breakpoints para as equinocandinas (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>				
<b>Antifúngico</b>	<b>Espécie</b>	<b>Sensível</b>	<b>Intermediário</b>	<b>Resistente</b>
<b>Anidulafungina</b>	<i>C. albicans</i>	$\leq 0,25$	0,5	$\geq 1$
	<i>C. glabrata</i>	$\leq 0,25$	0,5	$\geq 1$
	<i>C. tropicalis</i>	$\leq 0,25$	0,5	$\geq 1$
	<i>C. krusei</i>	$\leq 0,25$	0,5	$\geq 1$
	<i>C. parapsilosis</i>	$\leq 2,0$	4,0	$\geq 8$
	<i>C. guilliermondii</i>	$\leq 2,0$	4,0	$\geq 8$
<b>Caspofungina</b>	<i>C. albicans</i>	$\leq 0,25$	0,5	$\geq 1$
	<i>C. glabrata</i>	$\leq 0,25$	0,5	$\geq 1$
	<i>C. tropicalis</i>	$\leq 0,25$	0,5	$\geq 1$
	<i>C. krusei</i>	$\leq 0,25$	0,5	$\geq 1$
	<i>C. parapsilosis</i>	$\leq 2,0$	4,0	$\geq 8$
	<i>C. guilliermondii</i>	$\leq 2,0$	4,0	$\geq 8$
<b>Micafungina</b>	<i>C. albicans</i>	$\leq 0,25$	0,5	$\geq 1$
	<i>C. glabrata</i>	$\leq 0,06$	0,12	$\geq 0,25$
	<i>C. tropicalis</i>	$\leq 0,25$	0,5	$\geq 1$
	<i>C. krusei</i>	$\leq 0,25$	0,5	$\geq 1$
	<i>C. parapsilosis</i>	$\leq 2,0$	4,0	$\geq 8$
	<i>C. guilliermondii</i>	$\leq 2,0$	4,0	$\geq 8$

Quadro 6 – Novos *breakpoints* para equinocandinas considerando as espécies de *Candida*  
Fonte: PFALLER et al., 2011d.

Dessa forma, é possível observar as constantes atualizações referentes aos testes de suscetibilidade e seus respectivos *breakpoints* na tentativa de padronizar suas interpretações, melhorando a detecção de isolados não sensíveis e conduzindo a uma terapia mais direcionada.



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Determinar a suscetibilidade de *Candida* spp. isoladas de episódios de candidemia no Hospital Universitário de Santa Maria, entre 1995 e 2009, frente a anfotericina B, flucitosina, fluconazol, itraconazol, voriconazol e caspofungina.

### **2.2 Objetivos específicos**

2.2.1. Comparar as variações na prevalência das espécies de *Candida* no período de 15 anos, divididos em intervalos de 5 anos.

2.2.2. Comparar as variações de suscetibilidade das espécies de *Candida*, distribuídas em intervalos de 5 anos.

2.2.3. Evidenciar isolados não sensíveis a anfotericina B, flucitosina, fluconazol, itraconazol, voriconazol e caspofungina com base nos critérios do documento M27-A3 (CLSI, 2008).

2.2.4. Evidenciar isolados não sensíveis ao fluconazol, voriconazol e caspofungina com base nos critérios recentemente propostos por Pfaller et al. (2010, 2011).

### **3 MANUSCRITO**

Os resultados desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se compondo o próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo.

O manuscrito está estruturado de acordo com as normas do periódico: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

**Susceptibility and prevalence of *Candida* spp. isolated from candidemias:**

**a 15- years study**

**Suscetibilidade e prevalência de *Candida* spp. isoladas de episódios de candidemias:**

**um estudo de 15 anos**

*Edileusa Rosa dos Santos<sup>1,2</sup> & Sydney Hartz Alves<sup>1,3</sup>*

<sup>1</sup>Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Health Science Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>2</sup>University Hospital of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>3</sup>Departament of Microbiology and Parasitology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

Correspondence to: Prof. Dr. Sydney Hartz Alves

Rua dos Andradas 1985/201, CEP 97010-033, Santa Maria, RS, Brazil

Phone: (55) 3220-8906

e-mail: [sydneyalves.ufsm@gmail.com](mailto:sydneyalves.ufsm@gmail.com)

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Candidemias are associated with high mortality rates. The emergence of resistance leads to failure in antifungal therapy, which justifies the employment of susceptibility tests to antifungal agents. The standardization of these tests and the update of their breakpoints allows a better interpretation and determination of the direction that the therapy should go in.

**METHODS:** This study evaluated the susceptibility and prevalence of the different species of *Candida* isolated from candidemias during the years from 1995 to 2009 in based on the CLSI criteria and new breakpoints recently proposed by Pfaller et al.

**RESULTS:** A number of 525 isolates were identified, and, among them, *C. parapsilosis* corresponded to 49.14%, followed by *C. albicans* (34.47%), *C. tropicalis* (8.19%), *C. glabrata* (3.61%), *C. lusitaniae* (1.90%), *C. guilliermondii* (1.71%), and *C. krusei* (0.95%). According to the criteria used we have detected 136 non-susceptible isolates. In accordance with CLSI criteria, we identified 40 (7.61%) non-susceptible isolates, from which 19 (3.61%) were resistant. According to Pfaller et al., 96 (18.28%) isolates were non-susceptible, and 11 (2.09%) were resistant. The resistance among the *Candida* species was not an important characteristic since it occurred only among the azoles: itraconazole (2.09%), fluconazole (1.14%), and voriconazole (0.38%). Resistance to amphotericin B was not observed. In this study, 5 and 3 isolates showed intermediate susceptible to flucytosine and caspofungin respectively.

**CONCLUSION:** Detecting a higher number of non-susceptible species has highlighted the relevance of evaluating susceptibility tests by new breakpoints in order to find a more efficient therapy.

Keywords: Candidemia. *Candida* species. Antifungals. Prevalence. Susceptibility.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** As candidemias estão associadas a elevadas taxas de mortalidade. A emergência de resistência acarreta falhas na terapêutica antifúngica, o que justifica a utilização dos testes de suscetibilidade frente aos agentes antifúngicos. A padronização destes testes, bem como a atualização de seus *breakpoints* possibilita uma melhor interpretação e direcionamento da terapêutica.

**MÉTODOS:** Este estudo avaliou a suscetibilidade e prevalência de diferentes espécies de *Candida* isoladas de candidemias durante os anos de 1995 a 2009 utilizando os critérios do CLSI e os novos *breakpoints* recentemente propostos por Pfaller et al.

**RESULTADOS:** Foram detectados 525 isolados e, dentre eles, *C. parapsilosis* correspondeu a 49,14%, seguida por *C. albicans* (34,47%), *C. tropicalis* (8,19%), *C. glabrata* (3,61%), *C. lusitaniae* (1,90%), *C. guilliermondii* (1,71%), e *C. krusei* (0,95%). De acordo com os dois critérios utilizados, foram detectados 136 isolados não sensíveis. Segundo o CLSI, foram identificados 40 (7,61%) isolados não sensíveis, dos quais 19 (3,61%) foram resistentes. Segundo Pfaller et al., 96 (18,28%) isolados foram classificados como não sensíveis, dos quais 11 (2,09%) foram resistentes. A resistência não foi uma característica marcante, ocorrendo somente entre os azólicos: itraconazol (2,09%), fluconazol (1,14%) e voriconazol (0,38%). Resistência a anfotericina B não foi observada. Neste estudo, 5 e 3 isolados apresentaram-se intermediários a flucitosina e caspofungina, respectivamente.

**CONCLUSÃO:** A detecção de um maior número de espécies não sensíveis ressaltou a relevância da avaliação dos testes suscetibilidade através dos novos *breakpoints*, o que pode direcionar a uma terapia mais eficaz.

Palavras-chave: Candidemia. *Candida* species. Antifúngicos. Prevalência. Suscetibilidade.

## INTRODUCTION

Among the invasive fungal infections, candidemia occupies a prominent place<sup>19</sup>. They are among the most common fungal infections in hospitalized patients and lead to a long stay in hospital, the increase of hospital costs<sup>13</sup> and a mortality rate which reaches 61% in Brazil<sup>8</sup>.

There are several conditions associated with the development of candidemia, and in general they involve: a) the use of antibacterial agents; b) the presence of central venous catheter; c) the use of histamine receptor blockers type 2 (H<sub>2</sub>); d) total parenteral nutrition; e) admission at intensive care unit (ICU); f) the use of corticosteroids; g) surgeries; h) previous hospitalization; i) colonization by *Candida*, among other factors<sup>2, 3, 8, 15</sup>.

From 1997, susceptibility tests of *Candida* to antifungal agents became available due to the standardization developed by National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS-M27-A)<sup>12</sup>. Broth microdilution, as the most used technique, is laborious and also requires skilled people, factors that prevent the use of susceptibility tests to any isolates of *Candida* in a Microbiology laboratory. The indication to evaluate these isolates falls on the ones that come from important clinical situations or from sterile sites; thus, all the candidemia isolates have the indication to evaluate the susceptibility profile to antifungals<sup>4</sup>.

Some of the causes of the high mortality rates observed in candidemia<sup>1, 9</sup> are the failures of antifungal therapies. One of the causes of antifungal therapy failing is the emergence of resistance<sup>9</sup>.

Similarly to what happens with antibacterial agents, antifungal resistance can be innate or secondary to the antifungal agents used. On the other hand, the short number of systemic antimycotics available linked the resistance first against flucytosine and then to fluconazole. Additional studies have shown that cross-resistance may cover other azole class antifungals<sup>17</sup>.

The spectrum of *Candida* species isolated in a hospital is directly linked to the type of patient, geographic location, most used procedures and, overall, it can define the susceptibility profile to the antifungal agents<sup>6, 26</sup>.

In a temporal perspective, antifungal agents used in candidemia have included amphotericin B, flucytosine associated to amphotericin B, ketoconazole (not used), fluconazole, and, more recently, voriconazole and echinocandins<sup>14</sup>.

This study evaluated the susceptibility of *Candida* species isolated from episodes of candidemia from 1995 to 2009, registered at University Hospital of Santa Maria (HUSM), Santa Maria, RS, Brazil.

## METHODS

**1. Period of evaluation:** this study took 15 years divided into 3 periods of 5 years: Period A (1995-1999), Period B (2000-2004) and Period C (2005-2009) according to the main antifungal used to treat the candidemia.

**2. Microorganisms:** five hundred twenty-five of *Candida* spp. strains isolated from episodes of candidemia occurred at University Hospital of Santa Maria (HUSM); Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

**3. Identification:** The blood culture, which were obtained from automated system BACTEC 9120 (Becton Dickinson), were identified by standard methods as chlamydospores production, germ tube assays, micromorfological studies in Corn-meal-Tween 80 agar and biochemical tests by using the commercial system ID32C (bioMérieux Marcy l'Etoile, France). The isolates were stored in BHI with 20% glycerol and 0.2% agar suspensions and frozen at -70°C until processed in the study. Before testing, each isolate was passaged on Sabouraud dextrose agar and CHROMagar to ensure purity and viability.

**4. Susceptibility tests to antifungal agents:** performed by broth microdilution, according to the M27-A3 protocol of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)<sup>4</sup>. All the isolates were tested against amphotericin B (Sigma), fluconazole (Sigma Chemical Co, St Louis, Mo), itraconazole (Janssen-Cilag Pharmaceutica; Belgium), flucytosine (Sigma Chemical Co), voriconazole (Pfizer, Inc) and caspofungin (Merck, Rahway, NJ), which were obtained from pure powder and prepared in the indicated concentrations according to the procedures of the protocol M27-A3. The tests were performed in microdilution plates, in which, 0.1 mL of antifungal 2X concentrate was used. The microplates were sealed with Parafilm and frozen at -70°C until the time of the use. The inocula were prepared from cultures of 24-48 h in Sabouraud dextrose agar, by suspending the fungal cells in sterile distilled water, whose turbidity was spectrophotometrically fixed according to M27-A3. Finally, they were diluted in RPMI 1640 buffered with morpholinepropanesulfonic acid (MOPS). On the day of testing, the microdilution plates with 100 µL of RPMI 1640 with different concentrations of antifungals were then inoculated with 100 µL of diluted inoculum, resulting in  $0.5 \times 10^3$  a  $2.5 \times 10^3$  cells/mL in each well. The plates were closed and incubated at 35°C for 24h-48h and the MIC endpoint was determined according to document M27-A3. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 and *Candida krusei* ATCC 6258 were included for quality control tests, sterility control of the medium and control of the medium with antifungals<sup>5</sup>.

**5. Statistical analysis:** The Wilcoxon nonparametric test was used in comparisons involving two variables. When the comparisons involved three or more variables, was used the Kruskal-Wallis nonparametric test. The values of  $p \leq 0.5$  was considered significative.

## RESULTS

The study of the susceptibility of *Candida* spp. isolated from episodes of candidemia among 1995-2009 included 525 isolates distributed as follows: *C. albicans* (181/34.47%), *C. parapsilosis* (258/49.14%), *C. tropicalis* (43/8.19%), *C. glabrata* (19/3.61%), *C. lusitaniae* (10/1.90%), *C. guilliermondii* (9/1.71%) e *C. krusei* (5/0.95%). The total of the species grouped as *Candida non-albicans* was 344 (65.52%) isolates. The parameters for evaluating antifungal susceptibility (range of susceptibility, MIC50 and MIC90) as well as the percentage of resistance obtained by the criteria of CLSI 2008 and Pfaller et al.<sup>21, 25, 25</sup> are found in tables 2, 3, 4, 5 and 6.

**Susceptibility variation among the species of *Candida*:** For *C. albicans*: in the 3 periods, we detected that with fluconazole and itraconazole, the isolates of the period A (1995-1999), were significantly less susceptible than the isolates of the other periods ( $p < 0.05$ ). In relation to the other antifungals, significant variations were not noticed in the 3 studied periods.

*C. parapsilosis* was characterized as the most isolated species in the 3 studied periods, although in the last period (2005-2009) a statistically significant reduction was observed ( $p < 0.05$ ). Comparing the susceptibility among the 3 periods against amphotericin B and flucytosine, the isolates of *C. parapsilosis* of the period C (2005-2009) were significantly less susceptible than the isolates of the previous periods. On the other hand, the isolates of the period B (2000-2004) were less susceptible ( $p < 0.05$ ) to voriconazole and caspofungin when compared to A and C. Variations of statistically significant susceptibility were not detected in the other antifungals.

In the 3 periods, *C. tropicalis* was the 3<sup>rd</sup> most frequently isolated species. In period B (2000-2004), this species showed a significant increase ( $p < 0.05$ ) in relation to period A. The isolates of the period C (2005-2009) were significantly less susceptible to amphotericin B than the isolates from the previous period. *C. tropicalis* of the periods A and C were



significantly less susceptible to fluconazole than the isolates of the period B; however, significant variations were not detected concerning the other antifungals.

The other species *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii* e *C. krusei* were insufficient in establishing statistical comparisons among themselves. However, the number of *C. glabrata* increased from 2 (1995-1999) to 10 (2000-2004) and to 7 among 2005-2009.

**Table 1** - Distribution of the species of *Candida* isolated from episodes of candidemia among 1995-2009 at University Hospital of Santa Maria (HUSM), Santa Maria, RS, Brazil

Species of <i>Candida</i>	Period A 1995-1999 n (%)	Period B 2000-2004 n (%)	Period C 2005-2009 n (%)	Total n (%)
<i>C. albicans</i>	48 (30.18)	81 (36.16)	52 (36.61)	181 (34.47)
<i>C. parapsilosis</i>	85 (53.45)	108 (48.21)	65 (45.77)	258 (49.14)
<i>C. tropicalis</i>	10 (6.29)	21 (9.37)	12 (8.45)	43 (8.19)
<i>C. glabrata</i>	2 (1.25)	10 (4.46)	7 (4.9)	19 (3.61)
<i>C. guilliermondii</i>	6 (3.77)	1 (0.44)	2 (1.4)	9 (1.71)
<i>C. lusitaniae</i>	5 (3.14)	2 (0.89)	3 (2.11)	10 (1.90)
<i>C. krusei</i>	3 (1.88)	1 (0.44)	1 (0.7)	5 (0.95)
<b>Total</b>	<b>159 (100)</b>	<b>224 (100)</b>	<b>142 (100)</b>	<b>525 (100)</b>

**Susceptibility variations based on the breakpoints used:** in period A (1995-1999) (Table 2), based on CLSI criteria, we detected resistance to itraconazole: *C. albicans* (4/0.76%) and *C. krusei* (1/0.19%) (Table 5) with MIC of 1.0µg/mL; to voriconazole: *C. glabrata* (1/0.19% with MIC of 4.0µg/mL) and fluconazole: *C. krusei* (5/0.95% with MIC of 8.0µg/mL) (Table 5). One isolate of *C. glabrata* (1/0.19%) showed as susceptible-dependent-dose (SDD) to fluconazole and intermediate (I) to flucytosine, and 4 isolates of *C. krusei* (4/0.76%) as SDD to itraconazole (Table 5). Furthermore, based on the new breakpoints proposed by Pfaller et al., we detected 2 (0.38%) isolates of *C. tropicalis* (table 2) and 5 (0.95%) isolates of *C. krusei* (Table 5) resistant to fluconazole. On the other hand, in the susceptible-dependent-dose

(SDD) category, against fluconazole we detected: *C. albicans* (4/0.76%), *C. parapsilosis* (8/1.52%), *C. tropicalis* (5/0.95%) and *C. glabrata* (2/0.38%). The new Pfaller et al.'s classification has inserted the subgroup Intermediate (I) to voriconazole, where we detected: *C. albicans* (2/0.38%), *C. parapsilosis* (2/0.38%), and *C. tropicalis* (1/0.19%). The same criterion has allowed us to classify over this period 2 isolates of *C. glabrata* (2/0.38%) as intermediate susceptibility (I) to caspofungin.

In the period B (2000-2004) (Table 3), based on the breakpoints of CLSI (2008), *C. glabrata* was resistant to itraconazole (4/0.76% with MIC of 1.0 $\mu$ g/mL), and 4 were susceptible-dependent-dose (SDD); five isolates were classified as SDD to fluconazole (5/0.95%), and two of them were classified as intermediate (I) to flucytosine (2/0.38%). On the other hand, based on the new breakpoints, we detected resistance to voriconazole only, verified with *C. tropicalis* (2/0.38% with MIC of 2.0 $\mu$ g/mL). As susceptible-dependent-dose (SDD) to fluconazole we detected 30 isolates distributed as follows: *C. albicans* (7/1.33%), *C. parapsilosis* (8/1.52%), *C. tropicalis* (5/0.95%) and all the other isolates of *C. glabrata* (10/1.90%). The susceptible-dependent-dose (SDD) to voriconazole totalized 7 isolates distributed as follows: *C. albicans* (2/0.38%), *C. parapsilosis* (3/0.57%) and *C. tropicalis* (2/0.38%). All the isolates were classified as susceptible to caspofungin in this period with MIC<sub>90</sub> of 0.25 $\mu$ g/mL.

Susceptibility evaluation in the period C (2005-2009) (Table 4) based on breakpoints established by CLSI (2008) classified one isolate of *C. glabrata* (1/0.19%) as resistant to fluconazole (MIC= 64.0 $\mu$ g/mL), itraconazole (MIC= 2.0 $\mu$ g/mL) and voriconazole (MIC= 4.0 $\mu$ g/mL) and one isolate of *C. tropicalis* as resistant to itraconazole (MIC= 2.0 $\mu$ g/mL). As susceptible-dependent-dose (SDD) or intermediate (I), we detected to flucytosine: *C. parapsilosis* (1/0.19%) and *C. glabrata* (1/0.19%); to fluconazole: *C. tropicalis* (1/0.19%) and one isolate of *C. tropicalis* to itraconazole. By using the new breakpoints proposed by Pfaller

et al. we have detected resistance of *C. tropicalis* (1/0.19%) and *C. glabrata* (1/0.19%) with MIC of 64.0 µg/mL to fluconazole. Sixteen isolates were detected as susceptible-dependent-dose (SDD) to fluconazole: *C. albicans* (8/1.52%), *C. parapsilosis* (2/0.38%) and *C. glabrata* (6/1.14%). To voriconazole, 5 isolates were classified as having intermediate susceptibility: *C. parapsilosis* (3/0.57%) and *C. tropicalis* (2/0.38%). In the same period, only one isolate of *C. glabrata* (1/0.19%) showed intermediate susceptibility to caspofungin.

By evaluating all the 15 years studying the susceptibility of *Candida* isolates in candidemia based on the CLSI criteria (2008), the total resistant isolates were 19: itraconazole n=11 (*C. albicans* =4; *C. glabrata* = 5; *C. tropicalis* = 1; *C. krusei* = 1); fluconazole n=6 (*C. glabrata*= 1; *C. krusei* =5) and voriconazole n= 2 (*C. glabrata* = 2) By using the same criteria, we totalized 21 susceptible-dependent-dose (SDD) or intermediate (I) isolates: flucytosine n=5 (*C. parapsilosis* = 1 and *C. glabrata* = 4); itraconazole n= 9 (*C. tropicalis* = 1; *C. glabrata* = 4 and *C. krusei* = 4) and fluconazole n=7 (*C. tropicalis* = 1 and *C. glabrata* = 6).

Based on the criteria of Pfaller et al., the total of resistant isolates was 11: fluconazole n=9 (*C. tropicalis* = 3; *C. glabrata* = 1 and *C. krusei* = 5) and voriconazole n=2 (*C. tropicalis*). As susceptible dose-dependent (SDD) or Intermediate (I), 85 (16.19%) isolates were detected and distributed as: fluconazole (n=65) [*C. albicans* (19), *C. parapsilosis* (18), *C. tropicalis* (10), *C. glabrata* (18)]; voriconazole (n=17) [*C. albicans* (4), *C. parapsilosis* (8), *C. tropicalis* (5)], caspofungin (n=3) *C. glabrata* (3).

Finally, the gross total of the non-susceptible isolates was 136 (25.9%); however, when fixing this total (by excluding the isolates non-susceptible to fluconazole and voriconazole detected by CLSI breakpoints, and by summing up the others to the non-susceptible isolates detected by the new breakpoints), we detected 121 (23.05%) isolates of candidemia showing some kind of reduction of susceptibility to antifungals.

**Table 2** - Susceptibility profile of *Candida* spp. isolated from candidemia at University Hospital of Santa Maria (HUSM) among 1995-1999. Detection of non-susceptible isolates by the breakpoints from CLSI (2008) and Pfaller et al.\* Santa Maria, RS, Brazil

Species	N	ATF**	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )			Breakpoints CLSI (N)		Breakpoints Pfaller et al.* (N)	
			Range	MIC 50%	MIC 90%	R	SDD/I	R	SDD/I
<i>C. albicans</i>	48	AMB	0.125-1.0	0.25	0.5	0	0	--	--
		FLZ	0.25-4.0	1.0	4.0	0	0	0	4
		ITZ	0.03-1.0	0.125	0.5	4	0	--	--
		5FC	0.03-1.0	0.25	1.0	0	0	--	--
		VOR	0.03-0.25	0.125	0.25	0	0	0	2
		CAS	0.03-0.25	0.125	0.25	0	0	0	0
<i>C. parasilosis</i>	85	AMB	0.125-0.5	0.125	0.25	0	0	--	--
		FLZ	0.5-4.0	2.0	4.0	0	0	0	8
		ITZ	0.03-0.5	0.125	0.5	0	0	--	--
		5FC	0.03-2.0	0.25	2.0	0	0	--	--
		VOR	0.03-0.25	0.125	0.25	0	0	0	2
		CAS	0.03-1.0	0.125	1.0	0	0	0	0
<i>C. tropicalis</i>	10	AMB	0.125-0.125	0.125	0.125	0	0	--	--
		FLZ	0.5-16.0	4.0	8.0	0	0	2	5
		ITZ	0.125-1.0	0.125	0.5	0	0	--	--
		5FC	0.125-2.0	0.25	2.0	0	0	--	--
		VOR	0.06-0.5	0.125	0.5	0	0	0	1
		CAS	0.03-0.25	0.125	0.25	0	0	0	0
<i>C. glabrata</i>	2	AMB	0.125-0.5	0.125	0.5	0	0	--	--
		FLZ	2.0-32.0	2.0	32.0	0	1	0	2
		ITZ	0.03-0.5	0.03	0.5	0	0	--	--
		5FC	0.125-16.0	0.125	16.0	0	1	--	--
		VOR	0.5-4.0	0.5	4.0	1	0	?	?
		CAS	0.5-0.5	0.5	0.5	0	0	0	2

(\*) Pfaller et al.<sup>21, 24, 25</sup>

(\*\*) AMB= amphotericin B; FLZ= fluconazole; ITZ= itraconazole; 5FC= flucytosine; VOR= voriconazole; CAS= caspofungin.

(--) antifungal not contemplated in Pfaller et al.'s proposal.

(?) Pfaller et al.'s proposal does not provide breakpoints for *C. glabrata* against voriconazole.

**Table 3** - Susceptibility profile of *Candida* spp. isolated from candidemia at University Hospital of Santa Maria (HUSM) among 2000-2004. Detection of non-susceptible isolates by the breakpoints from CLSI (2008) and Pfaller et al.\* Santa Maria, RS, Brazil

Species	N	ATF**	MIC (µg/mL)			Breakpoints CLSI (N)		Breakpoints Pfaller et al.* (N)	
			Range	MIC 50%	MIC 90%	R	SDD/ I	R	SDD/ I
<i>C. albicans</i>	81	AMB	0.06-1.0	0.25	0.5	0	0	--	--
		FLZ	0.125-4.0	0.25	4.0	0	0	0	7
		ITZ	0.03-1.0	0.25	0.5	0	0	--	--
		5FC	0.125-4.0	1.0	4.0	0	0	--	--
		VOR	0.03-0.5	0.125	0.5	0	0	0	2
		CAS	0.03-0.25	0.06	0.25	0	0	0	0
<i>C. parasilosis</i>	108	AMB	0.06-0.5	0.125	0.25	0	0	--	--
		FLZ	0.5-4.0	1.0	4.0	0	0	0	8
		ITZ	0.03-0.5	0.125	0.5	0	0	--	--
		5FC	0.06-2.0	0.5	2.0	0	0	--	--
		VOR	0.03-0.5	0.125	0.5	0	0	0	3
		CAS	0.06-2.0	0.5	2.0	0	0	0	0
<i>C. tropicalis</i>	21	AMB	0.25-0.5	0.5	0.5	0	0	--	--
		FLZ	0.25-8.0	2.0	8.0	0	0	0	5
		ITZ	0.06-0.5	0.25	0.5	0	0	--	--
		5FC	0.25-4.0	1.0	4.0	0	0	--	--
		VOR	0.06-2.0	0.25	2.0	0	0	2	2
		CAS	0.03-0.5	0.06	0.25	0	0	0	0
<i>C. glabrata</i>	10	AMB	0.5-1.0	0.5	1.0	0	0	--	--
		FLZ	4.0-32.0	8.0	32.0	0	5	0	10
		ITZ	0.125-1.0	0.5	1.0	4	4	--	--
		5FC	0.5-16.0	4.0	16.0	0	2	--	--
		VOR	0.25-2.0	0.5	2.0	0	0	0	0
		CAS	0.125-0.25	0.125	0.25	0	0	0	0

(\*) Pfaller et al.<sup>21, 24, 25</sup>

(\*\*) AMB= amphotericin B; FLZ= fluconazole; ITZ= itraconazole; 5FC= flucytosine; VOR= voriconazole; CAS= caspofungin.

(--) antifungal not contemplated in Pfaller et al.'s proposal.

(?) Pfaller et al.'s proposal does not provide breakpoints for *C. glabrata* against voriconazole.

**Table 4** - Susceptibility profile of *Candida* spp. isolated from candidemia at University Hospital of Santa Maria (HUSM) among 2005-2009. Detection of non-susceptible isolates by the breakpoints from CLSI (2008) and Pfaller et al.\* Santa Maria, RS, Brazil

Species	N	ATF**	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )			Breakpoints CLSI (N)		Breakpoints Pfaller et al.* (N)	
			Range	MIC 50%	MIC 90%	R	SDD/ I	R	SDD/ I
<i>C. albicans</i>	52	AMB	0.06-1.0	0.25	0.5	0	0	--	--
		FLZ	0.125-4.0	0.5	4.0	0	0	0	8
		ITZ	0.015-0.5	0.06	0.125	0	0	0	0
		5FC	0.5-2.0	0.5	2.0	0	0	--	--
		VOR	0.015-0.25	0.06	0.125	0	0	0	0
		CAS	0.03-0.5	0.125	0.25	0	0	0	0
<i>C. parasilosis</i>	65	AMB	0.125-1.0	0.5	1.0	0	0	0	0
		FLZ	0.125-4.0	1.0	4.0	0	0	0	2
		ITZ	0.03-0.5	0.06	0.5	0	0	--	--
		5FC	0.25-16.0	0.5	2.0	0	1	--	--
		VOR	0.03-0.5	0.06	0.25	0	0	0	3
		CAS	0.125-2.0	0.5	2.0	0	0	0	0
<i>C. tropicalis</i>	12	AMB	0.125-1.0	0.125	0.5	0	0	--	--
		FLZ	0.25-32.0	0.25	0.5	0	1	1	0
		ITZ	0.03-2.0	0.125	0.25	1	1	--	--
		5FC	0.25-1.0	0.5	1.0	0	0	--	--
		VOR	0.03-1.0	0.06	0.5	0	0	0	2
		CAS	0.06-0.5	0.25	0.25	0	0	0	0
<i>C. glabrata</i>	7	AMB	0.125-1.0	0.5	0.5	0	0	--	--
		FLZ	0.5-64.0	8.0	64.0	1		1	6
		ITZ	0.06-2.0	0.125	0.125	1	0	--	--
		5FC	0.5-16.0	4.0	16.0	0	1	--	--
		VOR	0.06-4.0	0.25	4.0	1	0	?	?
		CAS	0.06-0.5	0.25	0.5	0	0	0	1

(\*) Pfaller et al.<sup>21, 24, 25</sup>

(\*\*) AMB= amphotericin B; FLZ= fluconazole; ITZ= itraconazole; 5FC= flucytosine; VOR= voriconazole; CAS= caspofungin.

(--) antifungal not contemplated in Pfaller et al.'s proposal.

(?) Pfaller et al.'s proposal does not provide breakpoints for *C. glabrata* against voriconazole.

**Table 5.** Susceptibility profile of *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* e *C. krusei* isolated from candidemia at University Hospital of Santa Maria (HUSM) among 1995-2009 and detection of non-susceptible isolates by the breakpoints from CLSI (2008) and Pfaller et al.\* Santa Maria, RS, Brazil

Species	N	ATF**	MIC (µg/mL)			Breakpoints CLSI (N)		Breakpoints Pfaller et al.* (N)	
			Range	MIC 50%	MIC 90%	R	SDD/ I	R	SDD/ I
<i>C. guilliermondii</i>	9	AMB	0.125-0.25	0.25	0.25	0	0	--	--
		FLZ	0.5-4.0	2.0	4.0	0	0	0	0
		ITZ	0.03-0.5	0.06	0.5	0	0	--	--
		5FC	0.06-1.0	0.5	1.0	0	0	--	--
		VOR	0.06-0.25	0.06	0.06	0	0	0	0
		CAS	0.03-0.25	0.06	0.06	0	0	0	0
<i>C. lusitaniae</i>	10	AMB	0.125-0.5	0.5	0.5	0	0	--	--
		FLZ	0.25-4.0	2.0	2.0	0	0	--	--
		ITZ	0.03-0.5	0.5	0.5	0	0	--	--
		5FC	0.25-2.0	0.5	2.0	0	0	--	--
		VOR	0.06-0.25	0.25	0.25	0	0	--	--
		CAS	0.06-0.5	0.125	0.25	0	0	--	--
<i>C. krusei</i>	5	AMB	0.125-0.5	0.25	0.5	0	0	--	--
		FLZ	4.0-8.0	8.0	8.0	5	0	5	0
		ITZ	0.25-1.0	0.5	0.5	1	4	--	--
		5FC	0.25-2.0	0.5	2.0	0	0	--	--
		VOR	0.06-0.25	0.25	0.25	0	0	0	0
		CAS	0.06-0.5	0.125	0.25	0	0	0	0

(\*) Pfaller et al.<sup>21, 24, 25</sup>

(\*\*) AMB= amphotericin B; FLZ= fluconazole; ITZ= itraconazole; 5FC= flucytosine; VOR= voriconazole; CAS= caspofungin.

(--) antifungal not contemplated in Pfaller et al.'s criteria.

**Table 6** - Number and percentage of isolates of candidemia non-susceptible to antifungals based on CLSI and Pfaller's et al.\* criteria observed among 1995-2009 at University Hospital of Santa Maria (HUSM), Santa Maria, RS, Brazil

Antifungal Agents	CLSI		Pfaller et al. *		Total
	SDD (n %)	R (n %)	SDD (n %)	R (n %)	
Itraconazole	9 (1.71)	11 (2.09)	--	--	20 (3.80)
Fluconazole	7 (1.33)	6 (1.14)	65 (12.38)	9 (1.71)	87 (16.57)
Voriconazole	0	2 (0.38)	17 (3.23)	2 (0.38)	21 (4.0)
Flucytosine	5 (0.95)	0	--	--	5 (0.95)
Caspofungin	0	0	3 (0.57)	0	3 (0.57)
<b>Total</b>	21 (4.0)	19 (3.61)	85 (16.19)	11 (2.09)	
	<b>40 (7.61)</b>		<b>96 (18.28)</b>		<b>136 (25.90)</b>

(\*) Pfaller et al.<sup>21, 24, 25</sup>

(--) antifungal not contemplated in Pfaller et al.'s criteria.

(%) referent to the total of isolates evaluated in the period (n=525)

## DISCUSSION AND CONCLUSION

The study we presented was divided into 3 periods of 5 years aiming at separate isolates whose treatments included mainly amphotericin B (period A), fluconazole (period B) and voriconazole and echinocandin (period C). Storing the isolates allowed us to evaluate their susceptibility against recently available antifungals, such as voriconazole and caspofungin. Nevertheless, the perfect stratification of the groups based on the antifungals utilized was not possible since many patients had received associated antifungals; even though, some epidemiological and susceptibility characteristics among the 3 periods could be noticed.

Our results indicated little variation in relation to the species of *Candida* involved in the episodes of candidemia: *C. parapsilosis* was the most evident, followed by *C. albicans* and then by *C. tropicalis*. This distribution was the same in the 3 periods studied. The other species also did not show alterations that could be related to antifungal therapy. Another



observation is that the group *Candida non-albicans* was always more prevalent than the species *C. albicans*. These results are in accordance with many Brazilian studies<sup>6, 7, 9, 18</sup> as well as being observed by multicentric international studies<sup>26</sup>.

In this study the detection of resistant isolates was not a relevant phenomenon. The definition of *in vitro* resistance to antifungals is based on the breakpoints established by the methods standardized to yeasts, that is, the document M27-A3 (CLSI, 2008)<sup>4</sup>. Recently, Pfaller et al. proposed new breakpoints in an attempt to balance CLSI and EUCAST breakpoints<sup>21, 24, 25</sup>. Thus, they took into account the distribution of MICs of wild-type of each species of *Candida*, the molecular mechanisms of resistance, the categorical agreement between the MICs generated by both methods (CLSI and EUCAST) as well as the reassessment of the correlation between MICs and the outcomes of candidemias. Due to these recent considerations, in the present study we compared the susceptibility profiles of *Candida* through both parameters.

Based on CLSI, the non-susceptible isolates detected throughout the study were 40 (7.61%) while by adopting the new breakpoints 96 (18.28%) isolates were classified as non-susceptible, which represents 2 times the number of isolates with susceptibility problems (Table 6).

By comparing the detection of resistance with both methods, the resistance was major for the CLSI breakpoints. However, this happens due to the presence of resistance to itraconazole, an absent antifungal among the new proposed breakpoints. On the other hand, the number of susceptible dose dependent (SDD) or intermediate (I) isolates showed an increase of 4 times more by the new breakpoints. The major number of susceptible dose dependent (SDD) or intermediate (I) isolates happened against fluconazole. This is according to previous studies since fluconazole is the most common azole in alterations of susceptibility, and it has been proposed as an indicator of resistance among azoles<sup>20</sup>.

Fluconazole is the main indicator of resistance to azoles. Comparing our results to previous studies carried out in Brazil, fluconazole resistance was 1.14%, which is similar to results obtained by Colombo et al.<sup>6</sup>; on the other hand, in the total of non-susceptible isolates to fluconazole this study detected 13 (2.47%) isolates, which is less than the 5% reported by Colombo et al.<sup>6</sup>, but near to the 2.1% reported by da Matta et al.<sup>7</sup>.

In relation to voriconazole, this study detected 0.38% (n=2) resistant isolates, which is close to the 0.2% reported by da Matta et al.<sup>7</sup> in Brazil, but inferior to the percentage reported by other authors: Lyon et al.<sup>10</sup> has detected 1.1% of resistance and Messer et al., 0.9%<sup>11</sup>.

Resistance to itraconazole (2.09%) was superior to the percentage reported by da Matta et al.<sup>7</sup>, but inferior to the percentage of 11.5% of resistance reported by Messer et al.<sup>11</sup> and of 30% reported by Pemán et al. in Spain<sup>16</sup>.

Against flucytosine, five isolates (5/0.95%) were classified as intermediate (I), which goes against the results of da Matta et al.<sup>7</sup>, where 2.5% of the isolates showed resistant to this agent. On the other hand, most of the Brazilian studies do not evaluate the susceptibility of flucytosine because it has a restricted use of combinations with amphotericin B, once monotherapy is not recommended<sup>17</sup>.

The susceptibility profile intermediate (I) to caspofungin occurred due to three isolates of *C. glabrata*. Although none of these had been classified as resistant, our finding is in accordance with Pfaller et al.<sup>22, 23</sup>, where *C. krusei* and *C. glabrata* are the most involved species in the resistance to caspofungin, respectively 12.5% and 2.5%.

In this study, the evaluation of susceptibility allows us to know better the local epidemiology. Detecting a higher number of non-susceptible species has highlighted the importance of evaluating susceptibility tests through new breakpoints proposed by Pfaller et al. in order to apply a more efficient therapy.

## REFERENCES

1. Almirante B, Rodríguez D, Park BJ, Cuenca- Estrella M, Planes AM, Almela M, et al. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43: 1829-1835.
2. Antunes AGV, Pasqualotto AC, Diaz MC, d'Azevedo PA, Severo LC. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 2004; 46: 239-241.
3. Aquino VR, Lunardi LW, Goldani LZ, Barth AL. Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in southern Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* 2005; 9: 411-418.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, 3<sup>rd</sup> ed. M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute 2008, Wayne, PA.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Informational supplement 3<sup>rd</sup> ed. M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute 2008, Wayne, PA.
6. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44: 2816-2823.

7. Da Matta DA, de Almeida LP, Machado AM, Azevedo AC, Kusano EJU, Travassos NF et al. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2007; 57: 399-404.
8. França JCB, Ribeiro CEL, Queiroz-Telles F. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2008; 41: 23-28.
9. Hinrichsen SL, Falcão E, Vilella TAS, Colombo AL, Nucci M, Moura L et al. Candidemia em hospital terciário no nordeste do Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2008; 41: 394-398.
10. Lyon GM, Karatela S, Sunay S, Adiri Y, *Candida* Surveillance Study Investigators. Antifungal Susceptibility testing of *Candida* isolates from the *Candida* surveillance study. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48: 1270-1275.
11. Messer SA, Moet GJ, Kirby JT, Jones RN. Activity of contemporary antifungal agents, including the novel echinocandin anidulafungin, tested against *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and *Aspergillus* spp.: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance program (2006-2007). *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47: 1942-1946.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing yeasts. Approved standard M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards 1997, Wayne, PA.

13. Olaechea PM, Palomar M, León-Gil C, Alvarez-Lerma F, Jordá R, Nolla-Salas J et al. Economic impact of *Candida* colonization and *Candida* infection in the critically ill patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis.* 2004; 23: 323-330.
14. Pappas PG, Kauffmann CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra, TF, Edwards JE Jr et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 48: 503-535.
15. Pasqualotto AC, Nedel WL, Machado TS, Severo LC. A 9-year study comparing risk factors and outcome of pediatrics and adults with candidemia. *Mycopathologia* 2005; 160: 111-116.
16. Pemán J, Cantón E, Gobernado M, Spanish ECMM Working Group on Candidaemia. Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from blood: results of a 2-year multicenter study in Spain. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2005; 24: 23-30.
17. Pemán J, Cantón E, Espinel- Ingroff A. Antifungal drug resistance mechanisms. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; 7: 453-460.
18. Pereira GH, Muller PR, Szeszs MW, Levin AS, Melhem MSC. Five –year evaluation of bloodstream yeast infections in a tertiary hospital: the predominance of non-*C.albicans* *Candida* species. *Med. Mycol.* 2010; 48: 839-842.

19. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007; 20: 133-163.
20. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ et al. Use of fluconazole as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to voriconazole among 13,338 clinical isolates of *Candida* spp. Tested by clinical and laboratory standards institute-recommended broth microdilution methods. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45: 70-75.
21. Pfaller MA, Andes D, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Sheehan D, CLSI Subcommittee for Antifungal Susceptibility Testing. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resist. Updat.* 2010; 13: 180-195.
22. Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Moet GJ, Jones RN. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus fumigatus*: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiologic cutoff values to characterize resistance in SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2009). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2011; 69: 45-50.
23. Pfaller M, Boyken L., Hollis R, Kroeger J, Messer S, Tendolkar S et al. Use of epidemiological cutoff values to examine 9- year trends in susceptibility of *Candida* species to anidfulafungin, caspofungin and micafungin. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49: 624-629.

24. Pfaller MA, Andes D, Arendrup MC, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Alexander BD et al. Clinical breakpoints for voriconazole and *Candida* spp. revisited: review of microbiologic, molecular, pharmacodynamic, and clinical data as they pertain to the development of species-specific interpretive criteria. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2011; 70: 330-343.
  
25. Pfaller MA, Diekema DJ, Andes D, Arendrup MC, Brown SD, Lockhart SR, Motyl M, Perlin DS, CLSI Subcommittee for Antifungal Testing (2011). Clinical breakpoints for echinocandins and *Candida* revisited: integration of molecular, clinical and microbiological data to arrive at species-specific interpretative criteria. *Drug Resist. Updat.* 2011; 14: 164-176.
  
26. Pfaller MA, Messer SA, Moet GJ, Jones RN, Castanheira M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). *Int. J. Antimicrob. Agents* 2011; 38: 65-69.

## 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos de suscetibilidade de fungos aos agentes antimicóticos, ainda que sigam objetivos similares daqueles desenvolvidos com bactérias, guardam características próprias. Dentre estas, a menor prevalência destes agentes no espectro das infecções, é significativamente menor do que os agentes bacterianos ou virais; este fato epidemiológico determina que os estudos envolvendo patógenos fúngicos requeiram intervalo de tempo mais longo, sobretudo, quando envolvendo apenas uma pequena instituição hospitalar.

Com base nos fundamentos estabelecidos para os ensaios de suscetibilidade aos agentes antifúngicos, a utilidade destes testes, congrega os seguintes objetivos: a) reconhecer o perfil de suscetibilidade dos patógenos fúngicos em distintos centros hospitalares; b) comprovar *in vitro* a atividade dos novos antifúngicos; c) prever a resolução clínica otimizando a terapêutica antifúngica; d) comprovar as causas de falhas terapêuticas, evidenciando-se resistência; e) detectar a emergência de resistência secundária à antifungoterapia; f) evidenciar resistência cruzada entre agentes antifúngicos; g) prever a atividade antifúngica em micoses causadas por patógenos fúngicos mais raros; i) otimizar a seleção da terapêutica a longo prazo em determinado hospital (REX et al., 2002; HOSPENTHAL et al., 2004; ARIKAN 2007; RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2008). Os estudos para vigilância e detecção da emergência de fungos resistentes aos agentes antimicóticos foram oficialmente recomendados pela American Society for Microbiology, USA (ASM) em 1995. Tais estudos de vigilância devem ser abrangentes, coordenados pelas autoridades de saúde com os objetivos de se detectar variações nas taxas de resistência para melhor desempenho da terapêutica antifúngica (PFALLER et al., 2002).

Os melhores programas nesta área têm sido coordenados por cientistas norte-americanos ligados a agências oficiais de saúde como o Center of Diseases Control (CDC) e sociedades científicas, como a ASM. Também são patrocinados pela área científica de grande conglomerados da indústria farmacêutica. Os programas de maior destaque tem sido o ARTEMIS e o SENTRY. Tais programas têm revelado o perfil da suscetibilidade dos principais patógenos fúngicos, sobretudo no gênero *Candida*. O caráter multicêntrico destes programas permite reconhecer as tendências da resistência aos antifúngicos em quase todos os continentes (PFALLER & DIEKEMA, 2007).

O Brasil tem participado de alguns destes estudos multicêntricos onde importantes características particulares foram evidenciadas (COLOMBO et al., 2006; ). Ao mesmo tempo,



considerando a extensão territorial do país e suas marcantes diferenças culturais e econômicas, é pertinente que estudos regionais fossem também realizados. Assim, vários estudos têm sido desenvolvidos por pesquisadores de quase todas as regiões brasileiras: Da Matta et al. em São Paulo (2007), França et al. em Curitiba, PR (2008), Hinrichsen et al. em Recife, PE (2008), Aquino et al. (2005), Boff et al. (2008) e Antunes, et al. (2004) no Rio Grande do Sul e os isolados de *Candida*, a partir de episódios de candidemias, tem sido os mais estudados.

Neste contexto de avaliações locais da suscetibilidade de isolados de *Candida* frente aos antifúngicos, é que o presente estudo foi concebido. Por outro lado, considerando-se que o Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) contando com apenas 300 leitos registra mensalmente, um número médio de zero a três episódios de candidemias foi necessário o monitoramento ininterrupto durante os 15 anos aqui apresentados, para se dispor de um número de isolados representativos das tendências locais. Esta limitação trouxe-nos a vantagem de realizar a avaliação por um período de tempo longo, no qual, antifúngicos como o voriconazol e as equinocandinas foram incluídos na antifungoterapia.

A divisão do estudo em 3 períodos A (1995-1999), B (2000-2004) e C(2005-2009) teve o objetivo de caracterizar perfis de suscetibilidade quanto a anfotericina B, fluconazol, voriconazol e caspofungina, os quais foram, respectivamente, os antifúngicos mais empregados. A diversidade de pacientes e, conseqüentemente, de tratamentos talvez tenha sido a causa por tal estratificação não trazer dados novos e bem caracterizados em relação ao desenvolvimento da resistência entre os isolados de *Candida*.

Por outro lado, a divisão dos 15 anos em 3 períodos permitiu caracterizar epidemiologicamente as espécies do gênero mais implicadas em candidemias no âmbito do Hospital Universitário de Santa Maria. A predominância de *Candida* não *albicans* em nosso estudo é uma característica já reconhecida na América Latina e América do Norte, mas não na Europa e Ásia conforme apontam estudos multicêntricos internacionais. Estudos nacionais também demonstraram a mesma tendência, embora com diferentes percentuais de *Candida* não *albicans* (COLOMBO et al., 2006; DA MATTA, et al., 2007; PEREIRA et al., 2010).

O presente estudo destaca no âmbito do Hospital Universitário de Santa Maria, a espécie *Candida parapsilosis* (49. 14%) como a mais prevalente; esta característica manteve-se ao longo dos 15 anos. Os estudos internacionais apontam a relevância de *Candida parapsilosis* como uma característica da América Latina, representando a segunda espécie mais isolada. Alguns estudos brasileiros também apontam *Candida parapsilosis* como a espécie mais frequentemente isolada (HINRICHSEN, et al., 2008) enquanto em outros, sua

prevalência ocupa o segundo ou terceiro lugar (AQUINO et al., 2005; COLOMBO et al., 2006).

*Candida parapsilosis*, enquanto a espécie mais prevalente no presente estudo, não evidenciou tendência a resistência, pois apenas um isolado (0,38%) evidenciou suscetibilidade intermediária a flucitosina. Este perfil ressalta a sensibilidade de 99,61% dos isolados de *Candida parapsilosis*, o que está de acordo com estudos gerais como o ARTEMIS (PFALLER et al., 2008b) que detectou 95% de sensibilidade ao fluconazol entre 9400 isolados de *Candida parapsilosis*. Com base nos novos critérios, ainda não há estudos mais amplos evidenciando os perfis de suscetibilidade. A temida resistência de *Candida parapsilosis* a caspofungina não foi evidenciada no presente estudo.

Outra peculiaridade que merece comentário é a prevalência de *Candida glabrata*, considerada a segunda espécie mais isolada de candidemias na América do Norte (23,5%) e Europa (15,7%); na América Latina ocupa o 4º lugar (5,2%) conforme Pfaller et al. (2011b). O principal estudo de vigilância de candidemias no Brasil apontou *C. glabrata* (4,9%) ocupando o quinto lugar entre as espécies de *Candida* (COLOMBO et al., 2006). Nossos resultados estão de acordo com as tendências observadas nos estudos acima citados.

De acordo com os critérios do CLSI, a detecção de resistência aos azólicos indicou que a mesma é rara e que os antifúngicos azólicos continuam ativos frente a maioria dos isolados de candidemias.

Recentemente, um estudo desenvolvido na França salientou o papel de alguns antifúngicos no desenvolvimento da resistência (LORTHOLARY et al., 2011). Assim, a prévia exposição ao fluconazol ou a caspofungina determinam a substituição de *Candida albicans* por espécies menos sensíveis como *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*.

Reavaliando nossos resultados à luz dos achados de Lortholary et al. (2011) não se configurou a emergência da resistência a caspofungina; o alto custo da caspofungina no Brasil tem limitado sua utilização, o que pode justificar a ausência de isolados resistentes a esta equinocandina. O impacto da entrada das equinocandinas na antifungioterapia das candidemias ainda requer alguns anos para ser melhor avaliado, sobretudo no Brasil, onde o fluconazol e a anfotericina B são, ainda, os agentes mais utilizados.

A reconhecida menor sensibilidade de *Candida parapsilosis* e *Candida guilliermondii* às equinocandinas é uma característica que, no Brasil, merece atenção, pois, *Candida parapsilosis* tem expressiva prevalência. Logo, a possibilidade de emergência de isolados de *Candida parapsilosis* resistentes a alguma das equinocandinas ou mesmo evidenciando

resistência cruzada entre caspofungina, micafungina e anidulafungina, é um fato ao qual os pesquisadores e infectologistas brasileiros deverão estar atentos. Programas oficiais ou mesmo estudos localizados objetivados a investigar tais variações de suscetibilidade deverão ser instituídos e intensificados no Brasil.

## 5 CONCLUSÕES

- Entre os isolados de candidemias, registrou-se a predominância do grupo *Candida* não *albicans*. Nesse grupo, *Candida parapsilosis* foi a espécie mais frequentemente isolada. A prevalência das espécies não evidenciou alterações entre os três períodos estudados.
- Durante os anos de 1995 a 2009 a resistência atingiu baixas proporções no Hospital Universitário de Santa Maria, estando restrita aos antifúngicos azólicos. A anfotericina B e a caspofungina apresentaram boa atividade frente aos isolados de *Candida* spp.
- A proporção de isolados resistentes evidenciou poucas variações entre os períodos estudados e a resistência ao itraconazol, sem considerar isolados sensíveis dose-dependente, foi a mais evidente. *Candida glabrata* apresentou-se como a espécie mais resistente enquanto que *Candida parapsilosis* foi a mais sensível.
- Com base nos critérios estabelecidos pelo CLSI (M27-A3, 2008) detectou-se 7,61% de isolados de *Candida* spp. não sensíveis aos antifúngicos: 3,8% ao itraconazol, 2,47% ao fluconazol, 0,38% ao voriconazol e 0,95% a flucitosina.
- Com base nos critérios de Pfaller et al. (2010, 2011), detectou-se 18,28% de isolados de *Candida* spp. não sensíveis aos antifúngicos: 14,09% ao fluconazol, 3,61% ao voriconazol e 0,57% a caspofungina.

## 6 REFERÊNCIAS

ALMIRANTE, B.; RODRÍGUEZ, D.; PARK, B. J.; CUENCA- ESTRELLA, M.; PLANES, A. M.; ALMELA, M.; MENSA, J.; SANCHEZ, F.; AVATS, J.; GIMENEZ, M.; SABALLS, P.; FRIDKIN, S. K.; MORGAN, J.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; WARNOCK, D. W.; PAHISSA, A; BARCELONA CANDIDEMIA PROJECTED STUDY GROUP.

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.

ALMIRANTE, B.; RODRÍGUEZ, D.; CUENCA ESTRELLA, M.; ALMELA, M.; SANCHEZ, F.; AYATS, J.; TARRES, C. A.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; PAHISSA, A.; BARCELONA CANDIDEMIA PROJECT STUDY GROUP. Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1681-1685, 2006.

ALONSO-VALLE, H.; ACHA, O.; GARCÍA-PALOMO, J. D.; FARIÑAS-ALVAREZ, C.; FERNÁNDEZ-MAZARRASA, C.; FARIÑAS, M. C. Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology and factors influencing mortality. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 22, n. 4, p. 254-257, 2003.

ANTUNES, A. G.; PASQUALOTTO, A. C.; DIAZ, M. C.; D'AZEVEDO, P. A.; SEVERO, L. C. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 5, p. 239-241, 2004.

AQUINO, V. R.; LUNARDI, L. W.; GOLDANI, L. Z.; BARTH, A. L. 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.

ARIKAN, S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. **Medical Mycology**, v. 45, n. 7, 569-587, 2007.

ATKINSON, B. J.; KONTOYIANNIS, D. P. *Candida lusitanae* fungemia in cancer patients: risk factors for amphotericin B failure and outcome. **Medical Mycology**, v. 46, n. 6, p. 541-546, 2008.

BANERJEE, S. N.; EMORI, T. G.; CULVER, D. H.; GAYNES, R. P.; JARVIS, W. R.; HORAN, T.; EDWARDS, J. R.; TOLSON, J.; HENDERSON, T.; MARTONE, W. J. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. National Nosocomial Infections Surveillance System. **The American Journal of Medicine**, v. 91, n. 3B, p. 86S-89S, 1991.

BASSETTI, M.; TARAMASSO, L.; NICCO, E.; MOLINARI, M. P.; MUSSAP, M.; VISCOLI, C. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility and outcome of nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in Italy. **PloS One**, v. 6, n. 9, e 24198, 2011.

BOFF, E.; LOPES, P. G. M.; SPADER, T.; SCHEID, L. A.; LORETO, E.; DAL FORNO, N. L.; AQUINO, V.; SEVERO, L. C.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. Reavaliação da suscetibilidade de *Candida* à anfotericina B: estudo comparativo com isolados de três hospitais do Estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 1, p. 36-40, 2008.

BONASSOLI, L. A.; BERTOLI, M.; SVIDZINSKI, T. I. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. **The Journal of Hospital Infection**, v. 59, n. 2, p. 159-162, 2005.

CATALÁN, M.; MONTEJO, J. C. Antifúngicos sistêmicos. Farmacodinamia y farmacocinética. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 23, n. 1, p. 39-49, 2006.

CHARLIER, C.; HART, E.; LEFORT, A.; RIBAUD, P.; DROMER, F.; DENNING, D. W.; LORTHOLARY, O. Fluconazole for the management of invasive candidiasis: where do we stand after 15 years? **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 384-410, 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility of yeasts. Approved standard, 3rd ed. M27-A3. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. Wayne, PA, 2008.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J.; BRAZILIAN NETWORK CANDIDEMIA STUDY. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8; p. 2816-2823, 2006.

COTTER, G.; KAVANAGH, K. Adherence mechanisms of *Candida albicans*. **British Journal of Biomedical Science**, v. 57, n. 3, p. 241-249, 2000.

DA MATTA, D. A.; ALMEIDA, L. P.; MACHADO, A. M.; AZEVEDO, A. C.; KUSANO, E. J. U.; TRAVASSOS, N. F.; SALOMÃO, R.; COLOMBO, A. L. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 57, n. 4, p. 399-404, 2007.

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J. **Atlas of Clinical Fungi**. Centraalbureau Voor Schimmelcultures. Universitat Rovira i Virgili, 1995.720p.

DENNING, D. W. Echinocandins: a new class of antifungal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 889-891, 2002.

DENNING, D. W. Echinocandin antifungal drugs. **Lancet**, v. 362, n. 9390, p. 1142-1151, 2003.

DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; WENZEL, R. P.; PFALLER, M. A. An outbreak of *Candida parapsilosis* prosthetic valve endocarditis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 29, n. 3, p. 147-153, 1997.

DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; BRUEGGEMANN, A. B. COFFMAN, S. L.; DOERN, G. V.; HERWALDT, L. A.; PFALLER, M. A. 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.

DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; BOYKEN, L. B.; HOLLIS, R. J.; KROEGER, J.; TENDOLKAR, S.; PFALLER, M. A. In Vitro Activity of Seven Systemically Active Antifungal Agents against a Large Global Collection of Rare *Candida* Species as Determined by CLSI Broth Microdilution Methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 10, p. 3170-3177, 2009.

DIEKEMA, D. J. ; PFALLER, M. A. Utility of antifungal susceptibility testing and clinical correlations. In: HALL, G. S. **Interactions of Yeasts, Moulds, and Antifungal Agents: How to Detect Resistance**. New York : Humana Press, 2012. chap. 8, p. 131- 158.

DIGNANI, M. C.; SOLOMKIN, J. S.; ANAISSIE, E. *Candida*. In: ANAISSIE, E. J.; MCGINNIS, M. R.; PFALLER, M. A. **Clinical Mycology**, 1<sup>st</sup> edition. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2003. chap. 8, p. 195-239.

EDMOND, M. B.; WALLACE, S. E; McCLISH, D. K.; PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; WENZEL, R. P. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, n. 2, p. 239-244, 1999.

EDWARDS, J. E. *Candida* species. In: MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. **Principles and Practice of Infectious Diseases**, 5<sup>th</sup> edition. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000. p. 2656-2674.

EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 11, p. 685-702, 2003.

ELLIS, M. E.; AL- ABDELY, H.; SANDRIDGE, A.; GREER, W.; VENTURA, W. Fungal endocarditis: evidence in the world literature, 1965-1995. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 1, p. 50-62, 2001.

FLÓREZ, C.; MARTÍN-MAZUELOS, E.; RUIZ, M.; CISNEROS, J. M.; HERRERO, M.; GARCÍA, M. V.; MÁRQUEZ, M.; PORRAS, J.; MARTÍN, P.; GAMERO, C.; CASTÓN, J. J.; GRUPO DE ESTUDIO DE LAS CANDIDEMIAS EM ANDALUCÍA (ANDALUZIAN STUDY GROUP FOR CANDIDEMIA). In vitro susceptibilities of bloodstream isolates of *Candida* spp.: results from a multicenter active surveillance program in Andalusia. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 27, n. 9, p. 518-522, 2009.

FORREST, G. N.; WEEKES, E.; JOHNSON, J. K. Increasing incidence of *Candida parapsilosis* candidemia with caspofungin usage. **The Journal of Infection**, v. 56, n. 2, p.126-129, 2008.

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

GARCÍA-MARTOS, P.; GIL DE SOLA, F.; GARCÍA-AGUDO, L.; GARCÍA-AGUDO, R.; TEJUCA, F.; CALLE, L. Fungal peritonitis in ambulatory continuous peritoneal dialysis: description of 10 cases. **Nefrologia**, v. 29, n. 6, p. 534-539, 2009.

GHANNOUM, 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, n. 4, p. 501-517, 1999.

GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 122-143, 2000.

GIRMENIA, C.; MARTINO, P.; DE BERNADIS, F.; GENTILE, G.; BOCCANERA, M.; MONACO, M.; ANTONUCCI, G.; CASSONE, A. Rising incidence of *Candida parapsilosis* fungemia in patients with haematologic malignancies: clinical aspects, predisposing factors and differential pathogenicity of the causative strains. **Clinical Infectious Diseases**, v. 23, n.3, p. 506-514, 1996.

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

GRAPHICHUNTS.COM. **Macromorfologia de *Candida albicans***. Disponível em <[http://www.graphicshunt.com/health/images/candida\\_albicans-673.htm](http://www.graphicshunt.com/health/images/candida_albicans-673.htm)>. Acesso em 3 de abril de 2012.

GUBBINS, P. O.; ANAISSIE, E. Antifungal therapy. **Churchill Livingstone** 2nd ed. p. 160-195, 2009.

GUMBO, T.; ISADA, C. M.; HALL, G.; KARAFKA, M. T.; GORDON, S. M. *Candida glabrata* fungemia. Clinical features of 139 patients. **Medicine**, v. 78, n. 4, p. 220-227, 1999.

HAZEN, K. C. New and emerging yeast pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 462-478, 1995.

HEDDERWICK, S.; KAUFFMANN, C. A. Opportunistic fungal infections: superficial and systemic candidiasis. **Geriatrics**, v. 52, n. 10, p. 50-59, 1997.

HINRICHSEN S. L, FALCÃO, E.; VILELLA, T. A. S.; COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; MOURA, L.; REGO, L.; LIRA, C.; ALMEIDA, L. Candidemia em hospital terciário no nordeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 394-398, 2008.



- HORN, D. L.; NEOFYTOS, D.; ANAISSIE, E. J.; FISHMAN, J. A.; STEINBACH, W. J.; OLYAEI, A. J.; MARR, K. A.; PFALLER, M. A.; CHANG, C. H.; WEBSTER, K. M. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 12, p. 1695–1703, 2009.
- HOSPENTHAL, D. R.; MURRAY, C. K.; RINALDI, M. G. The role of antifungal susceptibility testing in the therapy of candidiasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 48, n. 3, p. 153-160, 2004.
- KETT, D. H.; SCHORR, A. F.; REBOLI, A. C.; REISMAN, A. L.; BISWAS, P.; SCHLAMM, H.T. Anidulafungin compared with fluconazole in severely ill patients with candidemia and other forms of invasive candidiasis: support for 2009 IDSA treatment guidelines for candidiasis. **Critical Care**, v. 15, n. 5, R253, 2011.
- KIRKPATRICK, C. H. Chronic mucocutaneous candidiasis. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 20, n. 2, p. 197-206, 2001.
- 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.
- KROGH-MADSEN, M.; ARENDRUP, M. C.; HESLET, L.; KNUDSEN, J. Amphotericin B and caspofungin resistance in *Candida glabrata* isolates recovered from a critically ill patient. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 7, p. 938-944, 2006.
- KUHN, D. M.; MIKHERJEE, P. K.; CLARK, T. A.; PUJOL, C.; CHANDRA, J.; HAJJEH, R. A.; WARNOCK, D. W.; SOIL, D. R.; GHANNOUM, M. A. *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 6, p. 1074-1081, 2004.
- KUSNE, S. TOBIN, D. PASCULLE, A. W.; VAN THIEL, D. H.; HO, M.; STRATZL, T. E. *Candida* carriage in the alimentary tract of liver transplant candidates. **Transplantation**, v. 57, n. 3, p. 398-402, 1994.
- LABBÉ, A. C.; PÉPIN J.; PATIÑO, C.; CASTONGUAY, S.; RESTIERI, C.; LAVERDIERE, M. A single-centre 10-year experience with *Candida* bloodstream infections. **The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology**, v. 20, n. 2, p. 45-50, 2009.
- LORTHOLARY, O.; DESNOS-OLLIVIER, M.; SITBON, K.; FONTANET, A.; BRETAGNE, S.; DROMER, F.; FRENCH MYCOSIS STUDY GROUP. Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2,441 patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 532-538, 2011.
- MACPHAIL, G. L., TAYLOR, G. D.; BUCHANAN-CHELL, M.; ROSS, C.; WILSON, S.; KUREISHI, A. Epidemiology, treatment and outcome of candidemia: a five-year review at three Canadian hospitals. **Mycoses**, v. 45, n. 5-6, p. 141-145, 2002.

McCLENNY, N. B.; FEI, H.; BARON, E. J.; GALES, A. C.; HOUSTON, A.; HOLLIS, R. J.; PFALLER, M. A. Change in colony morphology of *Candida lusitanae* in association with development of amphotericin B resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 5, p. 1325-1328, 2002.

MEYER, S. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. *Candida* Berkhout. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. D. **The yeasts, a taxonomic study**, 4<sup>th</sup> edition. Amsterdam: Elsevier, 1998, p. 454-573.

MILLER, N. S.; DICK, J. D.; MERZ, W. G. Phenotypic switching in *Candida lusitanae* on copper sulfate indicator agar: association with amphotericin B resistance and filamentation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1536-1539, 2006.

MONTRAVERS, P.; JABBOUR, K. Clinical consequences of resistant *Candida* infections in intensive care. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. 1, p. 1-6, 2006.

MORA-DUARTE, J.; BETTS, R.; ROTSTEIN, C.; COLOMBO, A. L.; THOMPSON-MOYA, L.; SMIETANA, J.; LUPINACCI, R.; SABLE, C.; KARTSONIS, N.; PERFECT, J.; CASPOFUNGIN INVASIVE CANDIDIASIS STUDY GROUP. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 25, p. 2020-2029, 2002.

MORGAN, J.; MELTZER, M. I.; PLIKAYTIS, B. D.; SOFAIR, A. N.; HUIE-WHITE, S.; WILCOX, S.; HARRISON, L. H.; SEABERG, E. C.; HAJJEH, R. A.; TEUTSCH, S. M. Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: a case-control study using data from population-based candidemia surveillance. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 26, n. 6, p. 540-547, 2005.

MOTTA, A. L.; ALMEIDA, G. M.; ALMEIDA JÚNIOR, J. N.; BURATTINI, M. N.; ROSSI, F. Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, p. 441-448, 2010.

MOUDGAL, V.; LITTLE, T.; BOIKOV, D.; VAZQUEZ, J. A. Multiechinocandin- and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 767-769, 2005.

MUÑOZ, P.; GIANNELLA, M.; FANCIULLI, C.; GUINEA, J.; VALERIO, M.; ROJAS, L.; RODRÍGUEZ-CRÉIXEMS, M.; BOUZA, E. *Candida tropicalis* fungaemia: incidence, risk factors and mortality in a general hospital. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1538-1545, 2011.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing yeasts. Approved standard M27-A. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**. Wayne, PA, 1997.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing yeasts 2nd ed. Approved standard M27-A2. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**. Villanova, PA. 2002.

NELSON, R. D.; SHIBATA, N.; PODZORSKI, R. P.; HERRON, M. J. *Candida mannan*: chemistry, suppression of cell-mediated immunity, and possible mechanisms of action. **Clinical Microbiology Review**, v. 4, n. 1, p. 1-19, 1991.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, n. 1, p. 77-82, 2007.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBÓN, A. M.; RESTREPO, A.; COLOMBO, A. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin América. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 5, p. 561-570, 2010.

ODDS, E. C. Switch of phenotype as an escape mechanism of the intruder. **Mycoses**, v. 40, supl 2, p. 9-12, 1997.

ORTEGA, M.; MARCO, F.; SORIANO, A.; ALMELA, M.; MARTÍNEZ, J. A.; LÓPEZ, J.; PITART, C.; MENSA, J. *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. **The Journal of Hospital Infection**, v. 77, n. 2, p. 157-161, 2011.

PAPPAS, P. G.; REX, J. H.; LEE, J.; HAMILL, R. J.; LARSEN, R. A.; POWDERLY, W.; KAUFFMAN, C. A.; HYSLOP, N.; MANGINO, J. E.; CHAPMAN, S.; HOROWITZ, H. W.; EDWARDS, J. E.; DISMUKES, W. E.; NIAID MYCOSES STUDY GROUP. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, n. 5, p. 634-643, 2003.

PAPPAS, P. G.; KAUFFMANN, C. A.; ANDES, D.; BENJAMIN, D. K. Jr.; CALANDRA, T. F.; EDWARDS, J. E. Jr.; FILLER, S. G.; FISCHER, J. F.; KULLBERG, B. J.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI, A. C.; REX, J. H.; WALSH, T. J.; SOBEL, J. D.; INFECTIOUS DISEASES, SOCIETY OF AMERICA. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 5, p. 503-535, 2009.

PARKINSON, T.; FALCONER, D. J.; HITCHCOCK, C. A. Fluconazole resistance due to energy-dependent drug efflux in *Candida glabrata*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 8, p. 1696-1699, 1995.

PEREA, S.; PATTERSON, T. F. Antifungal resistance in pathogenic fungi. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, n. 9, p. 1073-1080, 2002.

PEREIRA, G. H.; MÜLLER, P. R.; SZESZS, M. W.; LEVIN, A. S.; MELHEM, M. S. Five year evaluation of bloodstream yeast infections in a tertiary hospital: the predominance of non-*C. albicans Candida* species. **Medical Mycology**, v. 48, n. 6, p. 839-842, 2010.

PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; ESPINEL-INGROFF, A. Antifungal resistance mechanisms. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 7, n.4, p. 453-460, 2009.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; JONES, R. N.; SADER, H. S.; FLUIT, A. C.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A.; SENTRY PARTICIPANT GROUP. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3254-3259, 2001.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; JONES, R. N.; MESSER, S. A.; HOLLIS, R. J.; SENTRY PARTICIPANTS GROUP. Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 to 2000. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 852-856, 2002.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; REX, J. H.; ESPINEL-INGROFF, A.; JOHNSON, E. M.; ANDES, D.; CHATURVEDI, V.; GHANNOUM, M. A.; ODDS, F. C.; RINALDI, M. G.; SHEEHAN, D. J.; TROKE, P.; WALSH, T. J.; WARNOCK, D. W. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against voriconazole: analysis and proposal for interpretive breakpoints **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 819–826, 2006.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133-163, 2007.

PFALLER, M. A. ; DIEKEMA, D. J. ; OSTROSKY- ZEICHNER, L. ; REX, J. H.; ALEXANDER, B. D.; ANDES, D.; BROWN, S. D.; CHATURVEDI V.; GHANNOUM, M. A.; KNAPP, C. C.; SHEEHAN, D. J.; WALSH, T. J. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against caspofungin, anidulafungin, and micafungin: analysis and proposal for interpretive MIC breakpoints. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 8, p. 2620-2629, 2008a.

PFALLER, M. A; DIEKEMA, D. J.; GIBBS, D. L.; NEWELL, V. A.; NQ, K. P.; COLOMBO, A.; FINQUELIEVICH, J.; BARNES, R.; WADULA, J.; GLOBAL ANTIFUNGAL SURVEILLANCE GROUP. Geographic and temporal trends in isolation and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*: a global assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n.3, p. 842-849, 2008b.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology os invasive mycoses in North America. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 1-53, 2010.

PFALLER, M. A.; ANDES, D.; DIEKEMA, D. J.; ESPINEL-INGROFF, A.; SHEEHAN, D.; CLSI Subcommittee for Antifungal Susceptibility Testing. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. **Drug Resistance Updates**, v. 13, n. 6, p. 180-195, 2010a.

PFALLER, M. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; KROEGER, J.; MESSER, S.; TENDOLKAR, S.; JONES, R. N.; TURNIDGE, J.; DIEKEMA, D. J. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values (ECVs) for the echinocandins and *Candida* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 52-56, 2010b.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; MOET, G. J.; JONES, R. N.; CASTANHEIRA, M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 1, p. 65-69, 2011a.

PFALLER, M. A.; MOET, G. J.; MESSER, S. A.; JONES, R. N.; CASTANHEIRA, M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008-2009. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 561-566, 2011b.

PFALLER, M. A.; ANDES, D.; ARENDRUP, M. C.; DIEKEMA, D. J.; ESPINEL-INGROFF, A.; ALEXANDER, B. D.; BROWN, S. D.; CHATURVEDI, V.; FOWLER, C. L.; GHANNOUM, M. A.; JOHNSON, E. M.; KNAPP, C. C.; MOTYL, M. R.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; WALSH, T. Clinical breakpoints for voriconazole and *Candida* spp. revisited: review of microbiologic, molecular, pharmacodynamic, and clinical data as they pertain to the development of species-specific interpretive criteria. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 70, n. 3, p. 330-343, 2011c.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; ANDES, D.; ARENDRUP, M. C.; BROWN, S. D.; LOCKART, S. R.; MOTYL, M.; PERLIN, D. S.; CLSI SUBCOMMITTEE for ANTIFUNGAL TESTING. Clinical breakpoints for echinocandins and *Candida* revisited: integration of molecular, clinical and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. **Drug Resistance Updates**, v. 14, n. 3, p. 164-176, 2011d.

PITTET, D.; WENZEL, R. P. Nosocomial bloodstream infections. Secular trends in rates, mortality and contribution to total hospital deaths. **Archives of Internal Medicine**, v. 155; n.11, p. 1177-1184, 1995.

POIKONEN, E.; LYYTIKÄINEN, O.; ANTTILA, V. J.; KOIVULA, I.; LUMIO, J.; KOTILAINEN, P.; SYRJÄLÄ, H.; RUUTU, P. Secular trend in candidemia and the use of fluconazole in finland, 2004-2007. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, 2010.

RAMAGE, G. WICKES, B. L.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Biofilms of *Candida albicans* and their associated resistance to antifungal agents. **American Clinical Laboratory**, v. 20, n. 7, p. 42-44, 2001.

RENTZ, A. M.; HALPERN, M. T.; BOWDEN, R. The impact of candidemia on length of hospital stay, outcome, and overall cost of illness. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, n. 4, p. 781-788, 1998.

REX, J. H.; PFALLER, M. A.; WALSH, T. J.; CHATURVEDI, V.; ESPINEL-INGROFF, A.; GHANNOUM, M. A.; GOSEY, L. L.; ODDS, F. C.; RINALDI, M. G.; SHEEHAN, D. J.; WARNOCK, D. W. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 643-658, 2001.

REX, J. H.; PFALLER, M. A. Has antifungal susceptibility testing come of age? **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, n. 8, p. 982-989, 2002.

RIPPON, J. W. Candidiasis and the pathogenic yeasts. In: **Medical Mycology**, 3<sup>rd</sup> edition. Philadelphia: W. B. Saunders, 1988. p. 536-581.

ROCKWELL, P. G. Acute and chronic paronychia. **American Family Physician**, v. 63, n. 6, p. 1113-1116, 2001.

RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; ALMIRANTE, B.; RODRÍGUEZ -PARDO, D.; LAGUNA, F.; DONNELLY, J. P.; MOUTON, J. W.; PAHISSA, A.; CUENCA-ESTRELLA, M. Correlation of the MIC and Dose MIC ratio of fluconazole to the therapeutic response of patients with mucosal candidiasis and candidemia. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 10, p. 3699-3604, 2007.

RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; ARENDRUP, M. C.; BARCHIESI, F.; BILLE, J.; CHRYSSANTHOU, E.; CUENCA-ESTRELLA, M.; DANNAOUI, E.; DENNING, D. W.; DONNELLY, J. P.; DROMER, F.; FEGELER, W.; LASS-FLÖRL, C.; MOORE, C.; RICHARDSON, M.; SANDVEN, P.; VELEGRAKI, A.; VERWEIJ, P. EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. **Clinical Microbiology and infection**, v. 14, n. 4; p. 398-405, 2008.

ROSSIE, K.; GUGGENHEIMER, J. Oral candidiasis: clinical manifestations, diagnosis, and treatment . **Practical Periodontic Aesthetic Dentistry**, v. 9, n. 6, p.635-641, quiz 642, 1997.

SAMPAIO CAMARGO, T. Z.; MARRA, A. R.; SILVA, C. V.; CARDOSO, M. F.; MARTINO, M. D.; CAMARGO, L. F.; CORREA, L. Secular trends of candidemia in a tertiary care hospital. **American Journal of Infection Control**, v. 38, n. 7, p. 546-541, 2010.

SANATI, H.; BELANGER, P.; FRATTI, R.; GHANNOUM, M. A new triazole, voriconazole (UK-109,496), blocks sterol biosynthesis in *Candida albicans* and *Candida krusei*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 11, p. 2492-2496, 1997.

SEGAL & ELAD. Candidiasis. In: MERZ, W. G; HAY, R. J. **Medical Mycology**, 10<sup>th</sup> edition. London: Hodder Arnold, 2005. cap. 30, p. 579-623.

SILVA, C. H. P. M.; NEUFELD, P. M.; LEITE, C. Q. F.; SATO, D. N. **Bacteriologia e micologia para o laboratório clínico**. Rio de Janeiro: Revinter, 2006. 498 p.

SILVA, A. P.; MIRANDA, I. M.; LISBOA, C.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A. Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in a tertiary care hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 8, p. 2392-2397, 2009.

SLAVIN, M. A.; SORREL, T. C.; MARRIOTT, D.; THURSKY, K. A.; NGUYEN, Q.; ELLIS, D. H.; MORRISSEY, C. O.; CHEN, S. C.; AUSTRALIAN CANDIDEMIA, STUDY, AUSTRALASIAN SOCIETY FOR INFECTIOUS DISEASES. Candidaemia in adult cancer patients: risks for fluconazole-resistant isolates and death. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 5; p. 1042-1051, 2010.

SOBEL, J. D.; MULLER, G.; BUCKLEY, H. R. Critical role of germ tube formation in the pathogenesis of candidal vaginitis. **Infection and Immunity**, v. 44, n. 3, p.576-580, 1984.

SOBEL, J. D. Vulvovaginitis. **Dermatologic Clinics**, v. 10, n. 2, p. 339-359, 1992.

SPELLBERG, B. J.; FILLER, S. G.; EDWARDS, J. E. Jr. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 2, p. 244-251, 2006.

St-GERMAIN, G.; LAVERDIÈRE, M.; PELLETIER, R.; RENÉ, P. BORGAULT, A. M.; LEMIEUX, C.; LIBMAN, M. Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream *Candida* isolates in Quebec: Report on 453 cases between 2003 and 2005. **The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 55-62, 2008.

SUAREZ, A.; OTERO, L.; NAVASCUES, C. A.; MENÉNDEZ, M. T.; ROMÁN, F. J.; GARCÍA, R.; SARO, C.; RODRÍGUEZ, A. Ascitic peritonitis due to *Candida albicans*. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**, v. 86, n. 3, p. 691-693, 1994.

TAVANTI, A.; DAVIDSON, A. D.; GOW, N. A.; MAIDEN, M. C.; ODDS, F. C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 284-292, 2005.

THOMPSON, G. R.; CADENA, J.; PATTERSON, T. F. Overview of antifungal agents. **Clinics in Chest Medicine**, v. 30, n. 2, p. 2003-215, 2009.

TORTORANO, A. M.; PEMÁN, J.; BERNHARDT, H.; KLINGSPOR, L.; KIBBLER, C. C.; FAURE, O.; BIRAGHI, E.; CANTÓN, E.; ZIMMERMANN, K.; SEATON, S.; GRILLOT, R.; ECMM WORKING GROUP ON CANDIDAEMIA. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 23, n. 4, p. 317-322, 2004.

TRICK, W. E.; FRIDKIN, S. K.; EDWARDS, J. R.; HAJJEH, R. A.; GAYNES, R. P.; NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE SYSTEM HOSPITALS. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, n. 5, p. 627-630, 2002.

TSUNEMI, Y.; KADONO, T.; SAEKI, H.; KIKUCHI, K.; TAMAKI, K.; SATO, S. Secondary cutaneous candidiasis with eosinophilia. **The Journal of Dermatology**, v. 37, n. 2., p. 175-178, 2010.

UBEDA, A.; VÁZQUEZ, A. L.; GIL, C. L. *Candida* peritonitis. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, supl. 2, p. 42-48, 2010.

VAZQUEZ, J. A. Anidulafungin: a new echinocandin with a novel profile. **Clinical Therapeutics**, v. 27, n. 6, p. 657-673, 2005.

WINGARD, J. R. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 115– 125, 1995.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S. M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R. P.; EDMOND, M. B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 3, p. 309-317, 2004.

WU, T.; WRIGHT, K.; HURST, S. F.; MORRISON, C. J. Enhanced extracellular production of aspartyl proteinase, a virulence factor, by *Candida albicans* isolates following growth in subinhibitory concentrations of fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 5, p. 1200-1208, 2000.

YOON, S. S.; STEFFAN, P. E.; SOBEL, J. D.; AKINS, R. A. High-frequency, in vitro reversible switching of *Candida lusitanae* clinical isolates from amphotericin B susceptibility to resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 4, p. 836-845, 1999.