

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

**ATIVIDADE DAS EQUINOCANDINAS,
ANFOTERICINA B E VORICONAZOL FRENTE A
ISOLADOS DE *Candida glabrata* SENSÍVEIS E
RESISTENTES AO FLUCONAZOL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Débora Alves Nunes Mario

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**ATIVIDADE DAS EQUINOCANDINAS, ANFOTERICINA B E
VORICONAZOL FRENTE A ISOLADOS DE *Candida glabrata*
SENSÍVEIS E RESISTENTES AO FLUCONAZOL**

por

Débora Alves Nunes Mario

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle da Qualidade e Avaliação Biofarmacêutica de Insumos e Medicamentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Sydney Hartz Alves

Santa Maria, RS, Brasil

2012

© 2012

Todos os direitos autorais reservados a Débora Alves Nunes Mario. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito da autora.

Endereço eletrônico: debora_alves6@hotmail.com

**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

**ATIVIDADE DAS EQUINOCANDINAS, ANFOTERICINA B E
VORICONAZOL FRENTE A ISOLADOS DE *Candida glabrata*
SENSÍVEIS E RESISTENTES AO FLUCONAZOL**

elaborada por
Débora Alves Nunes Mario

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Sydney Hartz Alves, Dr.
(Presidente/Orientador)

Carlos Eduardo Linares, Dr (URI)

Janio Moraes Santúrio, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 28 de fevereiro de 2012

DEDICATÓRIA

À minha avó, Iolanda (in memorian), e à minha mãe,

Marta, por todo amor, carinho e apoio,

compartilho esta conquista com vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Sydney, pela acolhida desde 2006 quando me aceitou como sua aluna de iniciação científica, pela paciência e confiança em meu trabalho. Agradeço pela amizade e carinho demonstrados, pelos ensinamentos e oportunidades que me foram oferecidas, e pela paixão pela pesquisa que me despertou. Muito Obrigada.

Aos meus pais, Marta e Arnaldo, Luis Eduardo e Márcia, pelo amor, carinho, paciência e compreensão diante de tantas horas de ausência, e por simplesmente estarem ao meu lado nas escolhas mais importantes da minha vida. Serei eternamente grata a vocês.

Aos meus irmãos, João Pedro, Ighor e Melinna, pela amizade e incentivo nesta caminhada, pelos exemplos de amor e pela presença contínua em minha vida.

Ao meu namorado, Ricardo, por todo seu amor, apoio e respeito por minha dedicação a este trabalho. Agradeço por não me deixar desanimar nos momentos mais difíceis, por acreditar na minha capacidade, e por me incentivar a continuar sempre.

A todos os colegas de LAPEMI, pelos momentos de apoio, amizade e descontração, que certamente contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial, agradeço a minha “eterna” bolsista e grande amiga, Laura, por seu empenho incansável, responsabilidade e disposição para acompanhar meus estudos e viabilizar a conclusão deste trabalho.

Às minhas queridas amigas, Caroline, Luana, Laíssa, Larissa e Bebel, pelo companheirismo, amizade e carinho constantes, pelos momentos difíceis que me ajudaram a sustentar e pelos ótimos momentos pudemos compartilhar nesses anos. Muito obrigada!

Ao Professor Janio M. Santurio, pela acolhida, pela amizade, ensinamentos, e apoio laboratorial disponibilizado para o desenvolvimento deste trabalho.

À Sandra, pela amizade e grande ajuda em nosso dia-a-dia laboratorial.

À Professora Margareth L. Atháide, em nome de todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela disponibilidade e carinho prestados e por todo o conhecimento que me foi transmitido.

À CAPES, pelo apoio financeiro fornecido através de bolsa de estudos.

“...Então agireis como bravos soldados que, longe de fugirem do perigo, preferem as lutas dos combates temerários, à paz que não pode dar nem glória, nem progresso. Que importa ao soldado perder no túmulo suas armas, sua bagagem e seu uniforme, contanto que dele saia vencedor com glória! Que importa àquele que tem fé no futuro deixar sobre o campo de batalha da vida sua fortuna e seu manto de carne, contanto que sua alma entre, radiosa, no reino celeste?”

(Delphine de Girardin)

RESUMO

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

ATIVIDADE DAS EQUINOCANDINAS, ANFOTERICINA B E VORICONAZOL FRENTE A ISOLADOS DE *Candida glabrata* SENSÍVEIS E RESISTENTES AO FLUCONAZOL

Autora: Débora Alves Nunes Mario

Orientador: Sydney Hartz Alves

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 28 de fevereiro de 2012.

O uso prolongado e indiscriminado dos azólicos nos últimos anos permitiu um rápido desenvolvimento de resistência aos fármacos nas espécies de *Candida*. Em *Candida albicans*, a resistência ao fluconazol causa resistência cruzada a outros antifúngicos e aumento na virulência, tornando o tratamento ainda mais complicado por causa das opções terapêuticas limitadas. Ainda assim, fenômeno semelhante tem sido observado para *Candida glabrata*, espécie que emergiu como patógenos de importância clínica. A resistência ao fluconazol tem sido clinicamente descrita em isolados de *Candida glabrata*, e é facilmente induzida pela exposição *in vitro* ao azólico, mas pouco se conhece sobre suas consequências.

No presente estudo, dois grupos de isolados de *C. glabrata* foram avaliados. Um grupo era composto de isolados clínicos sensíveis ao fluconazol (FS), e o outro, derivado do primeiro através de técnica de indução de resistência, era composto de isolados resistentes ao fluconazol (FR), com o intuito de comparar a atividade das três maiores classes de agentes antifúngicos – azóis, equinocandinas e poliênicos. Os derivados resistentes obtidos evidenciaram concentrações inibitórias mínimas (CIMs) maiores ou iguais a 64 µg/mL. Foram realizados testes de suscetibilidade aos antifúngicos através da técnica de microdiluição em caldo.

Com base nos parâmetros de suscetibilidade (faixa de CIM, CIM₅₀, CIM₉₀ e média geométrica), o grupo FS foi suscetível à anfotericina B (CIM₉₀ de 0,125 µg/ml). Entretanto, o grupo FR requereu doses maiores do antifúngico para ser inibido (CIM₉₀ de 2 µg/ml). O grupo de *C. glabrata* FR evidenciou resistência cruzada com voriconazol (CIM₉₀ de 16 µg/ml). As equinocandinas mostraram os melhores resultados frente a ambos os grupos, sensíveis e resistentes. Micafungina demonstrou os menores valores de CIM entre todos os agentes antifúngicos estudados (CIM₉₀ de 0.008 µg/ml para FS e 0.015 µg/ml para FR).

Os resultados deste estudo mostraram que a resistência ao fluconazol afeta a suscetibilidade do voriconazol, mas não das equinocandinas, as quais mostraram excelente atividade frente aos grupos de *C. glabrata* testados.

Palavras-chaves: *Candida glabrata*, resistência, fluconazol, agentes antifúngicos.

ABSTRACT

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

ACTIVITY OF ECHINOCANDINS, ANFOTERICIN B AND VORICONAZOLE AGAINST FLUCONAZOLE-SUSCEPTIBLE AND - RESISTANT *Candida glabrata* ISOLATES

Autora: Débora Alves Nunes Mario

Orientador: Sydney Hartz Alves

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 28 de fevereiro de 2012.

Widespread and prolonged usage of azoles in recent years has led to the rapid development of drug resistance in *Candida* species. In *Candida albicans*, resistance to fluconazole causes cross-resistance to other antifungals and an increase in virulence, making treatment still more difficult because of the limited therapeutical options. Nonetheless, similar phenomenon has been observed for *Candida glabrata*, specie that has emerged as a pathogen of clinical importance. Fluconazole resistance has been clinically described in *Candida glabrata* isolates and it is easily induced by *in vitro* exposure to the drug, but little is known about its consequences.

In the present study, two groups of *C. glabrata* isolates were evaluated. One group was composed by fluconazole-susceptible clinical isolates (FS), and the other was composed by fluconazole-resistant (FR) laboratory derivatives from the former through an *in vitro* method of fluconazole resistance induction, in order to compare the activitie of the three major antifungal agent classes – azoles, echinocandins and poliens. Resistant derivatives showed minimal inhibitory concentrations equal or higher than 64 µg/mL. All yeasts were tested by the broth microdilution method.

Based on susceptibility parameters (MIC range, MIC₅₀, MIC₉₀ and geometric mean), the fluconazole-susceptible *C. glabrata* group (FS) was susceptible to amphotericin B (MIC₉₀ of 0.125 µg/ml). For inhibition, the fluconazole-resistant *C. glabrata* group (FR) required higher concentrations of amphotericin B (MIC₉₀ of 2 µg/ml). *C. glabrata* FR group showed cross-resistance with voriconazole (MIC₉₀ of 16 µg/ml). Echinocandins showed the lowest MICs against to both group, flucoanzole-susceptible and –resistant. Micafungin demonstrated the lowest MIC values among all antifungal agents evaluated (MIC₉₀ of 0.008 µg/ml in FS and 0.015 µg/ml in FR).

Our results showed that resistance to fluconazole affected voriconazole susceptibility but not the echinocandin susceptibility, which demonstrated excellent activitie against tested *C. glabrata* groups.

Keywords: *Candida glabrata*, resistance, fluconazole, antifungal agents.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Suscetibilidade ($\mu\text{g/mL}$) <i>in vitro</i> dos isolados de <i>Candida glabrata</i> frente ao fluconazol antes (FS) e após (FR) os 15 dias de crescente exposição ao azólico.....	40
Tabela 2: Suscetibilidade ($\mu\text{g/mL}$) <i>in vitro</i> dos isolados de <i>Candida glabrata</i> frente aos agentes antifúngicos antes (FS) e após (FR) os 15 dias de crescente exposição ao fluconazol.....	41

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Suscetibilidade ($\mu\text{g/mL}$) dos isolados de *Candida glabrata* sensíveis ao fluconazol (FLC) frente a voriconazol (VRC), anfotericina B (AMB), caspofungina (CSP), anidulafungina (AND) e micafungina (MCF).....75

APÊNDICE B - Suscetibilidade ($\mu\text{g/mL}$) dos isolados de *Candida glabrata* resistentes ao fluconazol (FLC) frente a voriconazol (VRC), anfotericina B (AMB), caspofungina (CSP), anidulafungina (AND) e micafungina (MCF).....77

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	O gênero <i>Candida</i>	15
2.2	Candidíases	16
2.3	<i>Candida glabrata</i>	18
2.4	Agentes Antifúngicos	24
2.4.1	Poliênicos	24
2.4.2	Azólicos	27
2.4.3	Equinocandinas.....	20
3	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivo Geral	35
3.2	Objetivos Específicos	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	Microrganismos	36
4.2	Agentes antifúngicos	36
4.3	Indução de resistência ao fluconazol <i>in vitro</i>	36
4.4	Testes de suscetibilidade aos antifúngicos	37
4.4.1	Preparação do inóculo	37
4.4.2	Preparação das microplacas.....	38
4.4.3	Incubação e leitura dos resultados.....	38
4.4.4	Análise estatística	39
5	RESULTADOS	40
5.1	Indução de resistência ao fluconazol <i>in vitro</i>	40
5.2	Testes de suscetibilidade aos antifúngicos	40
6	DISCUSSÃO	43
7	CONCLUSÕES.....	51
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
10	APÊNDICES	75
11	ANEXOS	78
11.1	Preparação dos meios de cultura	78

1 INTRODUÇÃO

No contexto das infecções fúngicas, nas duas últimas décadas assistiu-se a um substancial aumento das micoses oportunistas, e as espécies do gênero *Candida* emergiram como uma das causas crescentes de infecções superficiais, cutâneas, mucocutâneas e sistêmicas (WARNOCK, 2007). Estas infecções comprometem principalmente pacientes severamente imunossuprimidos como os transplantados de medula óssea, pacientes com câncer, submetidos a grandes procedimentos cirúrgicos, pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), etc (GROLL, 1998).

As candidíases são causadas por fungos leveduriformes do gênero *Candida*. Este gênero comporta em torno de 200 espécies, das quais as de maior importância são: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. rugosa*, *C. krusei* e *C. dubliniensis*. Aproximadamente 50% das candidíases são causadas por *C. albicans* e a outra metade envolve as demais espécies (HAYNES, 2001).

Na Europa e nos Estados Unidos, *Candida glabrata* tem emergido como a segunda maior causa de candidíase invasiva, e um significativo aumento no número de casos tem evidenciando sua importância nas infecções sanguíneas e de mucosa (PFALLER & DIEKEMA, 2007). Infecções sistêmicas causadas por *C. glabrata* são caracterizadas por alta taxa de mortalidade, por serem infecções de difícil tratamento devido à sua reduzida sensibilidade aos antifúngicos azólicos, notadamente, ao fluconazol (PFALLER et al, 2004a,b). Numerosos isolados de *C. glabrata* mostram resistência primária ao fluconazol, enquanto outros apenas desenvolvem resistência após exposição a esse tratamento (BENNETT et al, 2004).

No Brasil, Colombo et al (2006) avaliaram a etiologia dos episódios de candidemia em 11 centros médicos brasileiros e foi constatado que eles ocorrem em 2.49 casos de cada 1000 admissões hospitalares, taxa 2 a 15 vezes mais frequente que aquelas reportadas em centros do hemisfério norte. Assim, com base em porcentagem (4,9%) *C. glabrata* aparentemente é menos importante no Brasil (5º lugar entre as espécies de *Candida*), mas isso corresponde a 0,12 casos de cada 1000 admissões hospitalares, similar aos dados da Europa e Estados Unidos. Neste contexto, *C. glabrata* passa a ter destaque no cenário da

infectologia brasileira, onde as questões referentes a tratamentos podem ser complexas, temerárias e com desfechos fatais.

A resistência de *C. glabrata* aos azólicos e, em menor grau, a outros antifúngicos, tem representado grande desafio para a clínica, frente às dificuldades observadas no tratamento de candidíases (DENNING et al, 1997; SANGUINETTI et al, 2005).

Entre os azólicos, o voriconazol tem sido sugerido como alternativa terapêutica frente a *C. glabrata* resistente ao fluconazol. Entretanto, quando se comparam as concentrações inibitórias mínimas (CIMs), há evidentes correlações entre voriconazol e as CIMs frente ao fluconazol, comprovando resistência cruzada (BENNETT et al, 2004). A anfotericina B tem sido uma das principais e mais eficazes terapias antifúngicas utilizadas. A alta incidência de toxicidade relacionada à infusão e nefrotoxicidade com anfotericina B e o surgimento de cepas de *Candida* resistentes a diversos antifúngicos, sobretudo azólicos, têm instigado a busca de alternativas. As equinocandinas constituem-se uma nova classe de agentes antifúngicas que agem através da inibição da beta (1, 3)-D-glucana sintase, uma enzima necessária para a integridade da parede celular (DENNING, 2003). Este grupo, no qual se inclui a caspofungina, anidulafungina e micafungina, têm demonstrado excelente atividade a um amplo espectro de patógenos fúngicos (ODABASI et al, 2004).

As três equinocandinas disponíveis possuem atividade fungicida frente à maioria das espécies de *Candida*, incluindo aquelas resistentes aos poliênicos e aos azólicos. Além disso, possuem excelente eficácia clínica somada a baixa toxicidade. Estas observações suportam a importância da realização de testes de suscetibilidade das equinocandinas para detecção de raros perfis de resistência.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O gênero *Candida*

O gênero *Candida* pertence ao filo ascomycota, ordem Saccharomycetales e família Saccharomycetales (Webster & Weber). Este gênero compreende mais de 200 espécies, das quais aproximadamente 10% são consideradas agentes etiológicos (CHAVES et al, 2003). Embora *C. albicans* seja a espécie mais frequentemente isolada de amostras clínicas, durante as últimas três décadas houve um aumento significativo nas espécies não-*albicans*, entre elas *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. dubliniensis* (HAYNES, 2001; FERRAZA et al, 2005; TAMURA et al, 2007).

Os fungos do gênero *Candida* constituem-se em células leveduriformes, elípticas ou esféricas, com diâmetro que varia de 3 a 6 μm , geralmente formam múltiplos brotamentos e pseudohifas. Em ágar Sabouraud dextrose suas colônias evidenciam cor branca ou branco-amarelada, com aspecto cremoso (JOKLIK et al, 1995).

Hazen (1995) cita em seu estudo de revisão sobre agentes leveduriformes emergentes que o grupo de leveduras potencialmente patogênicas ao homem é composto em sua grande maioria pelo gênero *Candida*. As espécies do gênero *Candida* fazem parte da microbiota humana da pele, do trato gastrointestinal e trato genitourinário. Por se tratar de fungos oportunistas, a transição da forma comensal desta levedura para sua forma patogênica ocorre quando há alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro; desta forma, o microrganismo se multiplica, causando a infecção. O crescente número de indivíduos imunocomprometidos tem determinado crescimento das infecções fúngicas, em particular, candidíase oral e sistêmica (SCHUMAN et al, 1998; BALKIS et al, 2002; BODEY et al, 2002; TRICK et al, 2002).

2.2 Candidíases

Segundo Lacaz et al (2002), candidíase ou candidoses são infecções provocadas por leveduras do gênero *Candida*, e envolvem um amplo espectro de doenças superficiais e invasivas oportunistas, acometendo pacientes expostos a uma grande diversidade de fatores de risco. As manifestações clínicas das candidíases são extremamente variadas, atingem a superfície cutânea ou membranas mucosas, resultando em: candidíase oral, candidíase vaginal, intertriginosa, paroníquia e onicomicose. Também podem ocorrer nas formas sistêmicas, como septicemia, endocardite e meningite (LACAZ et al, 2002; SIDRIM & ROCHA, 2004).

O homem é reservatório do gênero *Candida*, onde as infecções por este gênero constituem-se em 25% das micoses superficiais. As espécies deste gênero são encontradas no tubo gastrointestinal em 80% da população adulta saudável. Entre as mulheres, cerca de 20 a 30% apresentam colonização por *Candida* na vagina (ABRAHAMSEN et al, 1992). Em hospitais o gênero *Candida* responde por cerca de 80% das infecções fúngicas documentadas, representando um grande desafio aos clínicos de diferentes especialidades devido às dificuldades diagnósticas e terapêuticas que estas infecções representam (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).

Numerosos fatores contribuem para as infecções por *Candida*, dentre os quais podemos destacar: o rompimento das barreiras cutânea e mucosa, disfunção dos neutrófilos, defeito na imunidade mediada por células, desordem metabólica, exposição direta aos fungos, extremos de idade (recém-nascidos e idosos), desnutrição aguda, longo tratamento com antibióticos, quimioterapia, transplantes, resistência a antifúngicos, dentre outros (PFALLER & DIEKEMA, 2007).

Candidíases emergiram como um problema médico significativo ao término do século XX, pela prevalência das infecções oportunistas em pacientes infectados pelo vírus HIV e outros estados de imunossupressão (GROLL, 1998; SIDRIM & ROCHA, 2004).

A candidíase oral foi descrita como doença associada no primeiro caso de SIDA publicado, e constitui a infecção fúngica mais freqüente nos pacientes HIV-positivos (LUPETTI et al, 1995). Considera-se que até 90% dos indivíduos acometidos pelo vírus HIV sofrerão pelo menos um episódio de candidíase orofaríngea (SÁNCHEZ-VARGAS et al, 2002; URIZAR, 2002).

Em relação à candidíase vaginal estima-se que 20 a 25% das mulheres saudáveis e sem sintomas apresentam culturas positivas para *Candida*, e cerca de 75% das mulheres adultas tiveram episódios de candidíase vaginal durante a vida, das quais 5% tornam-se recorrentes. A recorrência desta infecção também está associada a algumas enfermidades como: *diabetes mellitus*, imunodepressão, terapia hormonal exógena e SIDA (CARDONA-CASTRO et al, 2002). A espécie *C. albicans*, ainda é a mais freqüente, entretanto *C. glabrata* representa 5 a 15% dos casos (BUZZINI & MARTINI, 2001).

Infecções de pele e mucosas por *Candida* podem ser documentadas em pacientes saudáveis, sem nenhuma doença de base, entretanto manifestam pequenas alterações locais de resposta do hospedeiro no sítio da infecção. Por outro lado, infecções sistêmicas por *Candida* podem comprometer vísceras como resultado de disseminação hematogênica. Complicações infecciosas são geralmente documentadas em pacientes críticos, como portadores de doenças que comprometam o estado imunológico (doenças degenerativas ou neoplásicas) (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).

A candidemia é observada particularmente entre pacientes hospitalizados submetidos a terapias antimicrobianas por longos períodos, terapias imunossupressivas, nutrição parenteral e procedimentos invasivos (SIDRIM & ROCHA, 2004). A fungemia por *Candida* constitui-se um grande problema na maioria dos hospitais, pois geralmente é de difícil diagnóstico, além do alto custo de tratamento e altas taxas de mortalidade. Dentre as manifestações clínicas inclui-se a febre como a mais comum, porém podem tomar diversas formas e localizações (septicemia, pneumonia, endocardites, artrite, osteomielite, miosites, peritonites, meningites, dentre outras) (COLOMBO et al, 2006).

2.3 *Candida glabrata*

Historicamente *Candida glabrata* era considerada fungo leveduriforme não patogênico, saprófita do organismo humano, onde raramente era causadora de infecções graves em humanos. Entretanto, esta espécie tem emergido como importante patógeno fúngico, e em muitos países destaca-se como o segundo agente mais isolado em episódios de candidíase, depois de *C. albicans* (BADER et al, 2004; DAN et al, 2006). Acomete pacientes imunocomprometidos, particularmente aqueles em estados neotrópicos, na prematuridade, prolongada hospitalização, submetidos a utilização prévia de antibióticos e utilização do fluconazol tanto em uso terapêutico quanto profilático (SOBEL, 2000; GUBBINS & ANAÏSSIE, 2002).

Em 1917, *Candida glabrata* foi pela primeira vez classificada no gênero *Cryptococcus* e logo mais, no ano de 1938, no gênero *Torulopsis*, decorrente da sua falta de produção de pseudohifas. A sua maior diferença morfológica com as demais espécies de *Candida*, é a característica de não apresentar dimorfismo. Conseqüentemente, esta levedura não se diferencia do estado comensal do patogênico, pois, em ambos os estados, ela se encontra apenas na forma de pequenos blastoconídios que variam de 1 a 4 μm de tamanho (FIDEL et al, 1999; CSANK & HAYNES, 2000; GUBBINS & ANAÏSSIE, 2002).

No entanto, mais tarde foi observado que esta levedura forma pseudohifas em ágar contendo baixa concentração de amônia (CSANK & HAYNES, 2000; VANDEPUTTE et al, 2007). Mesmo depois de determinada sua capacidade de produzir pseudohifas, este não foi um fator de confiança para distinguir os membros do gênero *Torulopsis*, e então, *Candida glabrata* foi reclassificada no gênero *Candida* (ODDS et al, 1997; ONYEWU et al, 2003).

A relação evolutiva do gênero *Candida* foi comparada por Barns et al (1991) com base na homologia de seqüência 18S rRNA, e concluiu-se que apesar do seu nome, *C. glabrata* é evolutivamente mais relacionada a *Saccharomyces cerevisiae* do que outros fungos patogênicos, como *Candida albicans* (CHEN & CLARK-WALKER, 2000). Contrariamente a outras espécies de *Candida*, *C. glabrata* é uma levedura “petite-positivo”, uma característica também presente em *Saccharomyces cerevisiae*. Entretanto, em contraste com *S. cerevisiae* que podem deslocar seu ciclo de vida entre as formas diplóide e haplóide de células, *C. glabrata* é exclusivamente um organismo haplóide e assexuado (WHELAN et al, 1984; BIALKOVÁ & ŠUBIK, 2006).

Em 2004, foi publicada a seqüência do genoma de *C. glabrata*. Este genoma conta com 13 cromossomos englobando um total de 12,3 Mbp e consiste cerca de 207 genes que codificam RNAt e 5.283 genes que codificam proteínas. Seu conteúdo GC é de 38,8%, que é semelhante ao de *S. cerevisiae* (38,3%). Os genomas de *C. glabrata* e *S. cerevisiae* apresentam um elevado grau de semelhança (DUJON et al, 2004, BIALKOVÁ & ŠUBIK, 2006). No entanto, *C. glabrata* perdeu muitos genes do metabolismo, tais como genes envolvidos na assimilação de galactose, sacarose, fosfato, nitrogênio, enxofre, tiamina, piridoxina, ácido nicotínico. *C. glabrata* assimila somente dois açúcares, glicose e trealose, um limitado número quando comparado com *C. albicans* e *S. cerevisiae* (FIDEL et al, 1999).

Apesar de *C. glabrata* ser filogeneticamente mais próxima de *S. cerevisiae* do que de outras espécies de *Candida*, *C. glabrata* é mais patogênica, pois pode causar infecção em seres humanos, de forma semelhante a *C. albicans*. É provável que as diferenças no genoma entre *S. cerevisiae* e *C. glabrata* e as semelhanças entre a *C. glabrata* e *C. albicans* caracterizem a patogenicidade de *C. glabrata* (FIDEL et al, 1999; KANTARCIOGLU & YUCEL, 2002).

Existem poucas investigações sobre os fatores de virulência da *C. glabrata*. A incapacidade na formação de hifas e pseudohifas evidenciam antígenos também presentes em *C. albicans*, e a pouca aderência a células endoteliais levam a considerá-la menos virulenta (FIDEL et al, 1999). As fosfolipases podem ser consideradas potenciais fatores de virulência porque facilitam a infiltração do fungo através da barreira fosfolipídica das células epiteliais; no caso de adesão a trombócitos, estes favorecem a disseminação da levedura no sangue (GHANNOUM, 2000; ROBERT et al, 2000). A presença de proteínas hidrofóbicas na superfície de *C. glabrata* pode auxiliar na aderência desta espécie às células hospedeiras através de receptores específicos como as adesinas e proteínas formadoras de biofilmes (WEIG et al, 2004).

A identificação de *C. glabrata* pode ser realizada através de métodos microbiológicos e bioquímicos; todavia, é cada dia mais frequente a utilização de métodos imunológicos e moleculares. O cultivo em meios especiais contendo um substrato cromogênico, como o CHROMagar *Candida* tem sido utilizado como indicador de *C. glabrata* e de outras espécies de leveduras como *C. albicans* e *C. tropicalis* em culturas mistas (BAUMGARTNER et al, 1996; BOUCHARA et al, 1996; WILLINGER & MANAFI, 1999). A identificação bioquímica é baseada na capacidade de *C. glabrata*

assimilar apenas trealose e glicose, o que a diferencia de outras espécies (PIENS et al 2003). A filamentação em soro ou prova do tubo germinativo é uma prova clássica que tem sido utilizada como complementar quando se utiliza microtestes comerciais como API *Candida* (bioMérieux), API20C Aux (bioMérieux), Auxacolor (BioRad), Fungichrom I (International Microbio), twin Fungifast I (International Microbio), Yeast cartão Vitek Bioquímica (bioMérieux), Vitek 2 ID-YST (bioMérieux), ID 32 C (bioMérieux), Yeast Plus Rápida (Diagnósticos Inovadores), Mycotube (Roche), Rosco comprimido de diagnóstico (EuroBio), *Glabrata* RTT (FUMOUZE Diagnostics) (BIALKOVÁ & ŠUBIK, 2006).

Entre os métodos moleculares baseados na amplificação do DNA, a reação da cadeia da polimerase (polymerase chain reaction (PCR)) seguida de hibridização multiplex tem sido também frequentemente utilizada. Este método permite a identificação das diferentes espécies de leveduras patogênicas diretamente em amostras teciduais. O método é baseado na amplificação de regiões específicas do DNA cromossômico (ITS1 e ITS2 – região espaçadora transcrita interna, entre 5.8S-18S e 18S-28S rRNA, respectivamente; gene 18S; gene TOPII topoisomerase-II) e hibridização dos amplicons com sondas de DNA conhecidos derivados de patógenos mais frequentes (WAHYUNINGSIH et al, 2000; MASSONET et al, 2004; KAMIYA et al, 2005; LIGORI et al, 2007). Os produtos de PCR podem ser detectados por eletroforese em gel de agarose (PCR-AGE) ou com o primer de cor marcada seguido pelo ensaio imunoenzimático colorimétrico (PCR-EIA) (COIGNARD et al, 2003). Outras técnicas de identificação moleculares incluem: eletroforese em gel de campo pulsátil (*pulsed-field gel electrophoresis* - PFGE), a amplificação aleatória de DNA polimórfico (*radom amplification of polymorphic*- RAPD), análise de restrição enzimática (*restriction enzyme analysis* - REA) (ARIF et al, 1996; FIDEL et al, 1999; ELIE et al, 1999).

Juntamente com a identificação de *Candida glabrata*, a determinação da suscetibilidade do isolado também é útil para a prescrição de um tratamento adequado. Técnicas como microdiluição em caldo, E-test e métodos de difusão em ágar podem ser utilizadas para testar a suscetibilidade aos antifúngicos disponíveis (REX et al, 2001; CLSI, 2008a,b). A recente padronização dos testes de suscetibilidade para fungos leveduriformes originou investimentos da indústria diagnóstica no lançamento de testes comerciais que permitem de forma rápida e segura a determinação das concentrações inibitórias mínimas, mesmo em laboratórios clínicos hospitalares, onde a rotina micológica é restrita; estes testes incluem: Candifast, ATB Fungus, Teste Diff, Mycostandard, Mycototal (BIALKOVÁ & ŠUBIK, 2006).

Nas candidemias, o quadro clínico determinado por *C. glabrata* é praticamente indistinguível das infecções causadas por *C. albicans*. *C. glabrata* pode causar fungemia evidenciando quadro clínico com febre, tremores, ou choque séptico (GUMBO et al, 1999). Outras formas menos frequentes de infecção incluem raros casos de endocardite causados por *C. glabrata*, infecções de feridas pós-operatórias, peritonites e infecções pélvicas, urinárias e biliares (FIDEL et al, 1999).

Contrastando com as demais espécies de *Candida*, as infecções por *C. glabrata* são difíceis de tratar e muitas vezes são resistentes a muitos agentes antifúngicos azólicos, em especial ao fluconazol. Por conseguinte, infecções por *C. glabrata* evidenciam elevadas taxas de mortalidade em pacientes hospitalizados em situações de riscos (SOBEL et al, 2000; COLOMBO et al, 2006; TUMBARELLO et al, 2008).

Alguns autores relataram maiores taxas de mortalidade nas candidemias associadas a *C. glabrata* do que naquelas causadas por *C. albicans* (KOMSHIAN et al, 1989; FIDEL et al, 1999; ALONSO-VALE et al, 2003). Gumbo et al (1999) relataram elevas taxas de mortalidade por *C. glabrata*, atingindo 44% dos óbitos. Dentre os fatores associados à mortalidade estão: internação em UTI, cirurgia abdominal, insuficiência renal, tratamento prévio com fluconazol, e baixas doses de anfotericina B .

Uma característica das infecções por *C. glabrata*, tanto nas invasivas quanto nas de mucosas, é a apresentação de infecção polimicrobiana, simultânea ou sequencialmente, com bacteremia ou bacteriúria (KAUFFMAN et al, 2000) ou infecção mista envolvendo *C. glabrata* e *C. albicans* concomitantemente (KAMIYA et al, 2005; LIGORI et al, 2007).

C. albicans é, ainda, a mais recorrente das espécies de *Candida* em episódios de candidemias, porém segundo Trick et al (2002), desde 1993, a incidência de *Candida glabrata* tem aumentado neste tipo de infecção, embora o mesmo tenha sido geograficamente determinado. De modo geral, na América do Norte e Europa, *C. glabrata* se impõe como a 2º espécie mais envolvida em candidíases, muitas delas com risco de morte (WILSON et al, 2005; WARNOCK, 2007).

A resistência aos antifúngicos tem representado um grande desafio para a clínica, frente às dificuldades observadas no tratamento das candidíases. As infecções por *C. glabrata* são especialmente importantes porque esta espécie apresenta uma resistência inata a agentes antifúngicos como os azóis (DENNING et al, 1997; SANGUINETTI et al, 2005). Comparando com outras espécies de *Candida*, os isolados de *C. glabrata* tendem a apresentar as maiores Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) quando testados frente aos

azóis, sendo naturalmente menos sensíveis a todos os agentes antifúngicos, incluindo anfotericina B. As CIMs de fluconazol para *C. glabrata* são, aproximadamente, 16 vezes maiores do que as requeridas por *C. albicans*; este fato vem representar uma seleção de espécies durante o uso profilático de fluconazol (ZEPELIN et al, 2007; GARNACHO-MONTERO et al, 2010).

Quando se aborda o termo resistência entre espécies de *Candida*, cabe também diferenciar resistência primária ou intrínseca da resistência secundária ou adquirida. A resistência intrínseca é a resistência natural ou inata de uma espécie frente a terapia antimicrobiana, mesmo que o microrganismo nunca tenha tido contato com o agente antifúngico (LEWIS, 2009). Em contraste, a resistência adquirida se desenvolve em organismos os quais eram, anteriormente, sensíveis e, após a exposição a um agente antimicrobiano, tornam-se resistentes. Assim, a utilização prévia de antifúngicos pode selecionar espécies menos sensíveis como *C. glabrata*. As bases moleculares para o desenvolvimento de resistência intrínseca de *C. glabrata* a antifúngicos tem sido estudadas (BENNETT et al, 2004; SANGLARD et al, 1999; VERMITSKY et al, 2004).

Em *C. glabrata*, a expressão de bombas de efluxo de fármacos e a super expressão do gene que codifica a lanosterol demetilase, são os dois mecanismos mais conhecidos de resistência ao fluconazol (SANGLARD et al, 2001). Segundo Pinjon et al. (2005) os quatro principais mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da resistência aos azólicos em *Candida* são: (1) efluxo de fármacos, (2) alterações na expressão gênica da enzima lanosterol demetilase, (3) mudanças de aminoácidos na lanosterol demetilase, (4) alterações na biossíntese de esteróis. A resistência dos fungos a azólicos está muito associada a regulação de bombas de membrana associadas a proteínas, conseqüentemente, o efluxo de uma ampla gama de moléculas, incluindo azóis. Estas proteínas de transporte são compostas por membros do família ABC (ATP-binding cassette) ou *major facilitator superfamily* (MFS). Os transportadores ABC são encontrados normalmente na membrana plasmática e membranas das organelas de todos os organismos (SANGLARD et al, 2001; GAUR et al, 2005).

Sob condições *in vitro* a elevada freqüência da resistência de *C. glabrata* aos azólicos tem sido descrita em vários estudos. Um destes estudos observou o fenótipo de *C. glabrata* para resistência, onde ficou evidenciado que o tratamento desta levedura com subdoses de azólicos, está associado com a superexpressão de genes para transportadores ABC (responsáveis pelo efluxo) (SANGLARD et al, 1999, 2001). Sanglard et al (1999)

observaram que quando um isolado de *C. glabrata* é exposto ao fluconazol em concentração de 50 µg / mL, determina resistência para este antifúngico e a outros azóis, com uma frequência alta. Ainda, a supressão do gene *CgCDR1* mutante pode desenvolver uma resistência de *C. glabrata* quando esta for exposta a um meio contendo fluconazol em uma concentração inferior a 5 µg / mL. A resistência, neste caso, deve-se a um gene do transportador ABC semelhante a *CgCDR1*, chamado *CgCDR2* (sinônimo PDH1) (MIYAZAKI et al, 1998).

Vários transportadores são envolvidos no surgimento de resistência em diversos fungos, porém apenas quatro tipos de transportadores têm sido implicados na resistência de *C. glabrata* ao fluconazol: são os transportadores ABC *CgCDR1p*, *CgPDH1p*, *CgSNQ2p* e *CgAUS1p*. Análises do RNA de *C. glabrata* resistentes ao fluconazol de isolados clínicos sugerem que a base predominante de resistência aos azólicos é a hiper-sensibilização de *CgCDR1* e, em menor grau a de *CgPDH1* (MIYAZAKI et al, 1998; SANGULARD et al, 2001; BENNETT et al, 2004; SANGUINETTI et al, 2005).

Outro mecanismo determinante da resistência aos azólicos está fortemente associado a um estado funcional da mitocôndria de *C. glabrata*. Foi demonstrado que a perda de DNA mitocondrial, gera um aumento na expressão de alguns genes envolvidos na resistência a antifúngicos, por *C. glabrata* se tratar de um fungo “petite positivo” (DEFONTAINE et al, 1999).

Contribuindo, ainda, para o desenvolvimento de resistência a azóis está o gene *ERG11* que codifica a enzima lanosterol 14 α -demetilase que também está diretamente ligada à resistência ao fluconazol (MARICHAL et al, 1997; HENRY et al, 2000). O mecanismo deste tipo de resistência refere-se a mutações no gene *ERG11* e a super expressão do mesmo gene. Supõe-se também que as mitocôndrias funcionais possam ser responsáveis pela conversão dos precursores do ergosterol em esteróis tóxicos, por isso a perda da função mitocondrial é o resultado da pressão de seleção causada pelo uso excessivo dos azóis (KONTOYANNIS, 2000).

C. glabrata também é capaz de utilizar o colesterol ou outros precursores do ergosterol do hospedeiro quando a biossíntese de ergosterol é bloqueada após a supressão do gene *ERG11* (codifica a lanosterol 14 α -demetilase) e do gene *ERG9* (codifica a esqualeno sintase) (NAKAYAMA et al, 2001). Experimentos *in vivo* revelaram que *C. glabrata* acumula precursores anormais de ergosterol que são diferentes dos acumulados em *S. cerevisiae* e *C. albicans* após tratamento com fluconazol (KELLY et al, 1995).

2.4 Agentes antifúngicos

Apesar do crescente aumento do arsenal antifúngico nos últimos anos, o tratamento das infecções fúngicas ainda é limitado. Os agentes antifúngicos utilizados no tratamento de infecções fúngicas sérias causadas por *Candida* spp. incluem os polienos, os derivados azólicos e as equinocandinas, todos eles agindo de acordo com um mecanismo farmacológico que é específico à fisiologia do fungo.

Além disso, a abordagem para o tratamento antifúngico deve ser individualizada, considerando não somente a suscetibilidade do provável organismo causador, mas também os fatores específicos para cada paciente, tais como o foco infeccioso, comorbidades e medicações concomitantes (BEN-AMI et al, 2008).

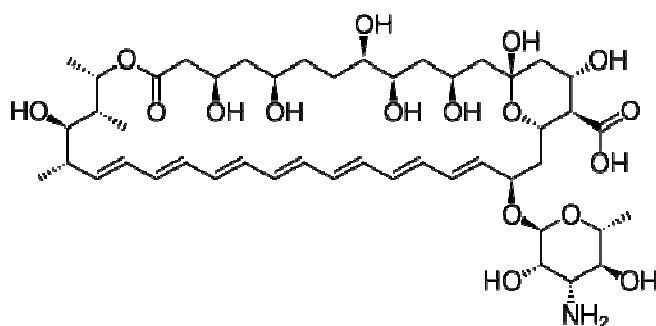
As semelhanças entre as células fúngicas e as células mamíferas dificultam o desenvolvimento da antifungoterapia, pois ambas são células eucarióticas com organelas semelhantes, incluindo-se também a replicação do DNA e síntese protéica. Por outro lado, as diferenças entre as paredes celulares dos mamíferos e dos fungos permitem que os processos de síntese dos componentes da parede celular dos fungos tornem-se alvo para antifúngicos, sem comprometer as células mamíferas. Por isto, inibidores da biossíntese da parede celular bacteriana, como as penicilinas, foram utilizados há anos devido à baixa toxicidade associada. Outros alvos de antifúngicos incluem agentes inibidores da biossíntese de DNA, a perturbação dos fusos mitóticos e interferência no metabolismo intermediário. A diferença mais amplamente explorada entre as células de mamíferos e a dos fungos é o fato da membrana celular fúngica conter ergosterol e outros esteróis em oposição ao colesterol presente nas células dos mamíferos (BRANCH, 1988; PAPPAS et al, 2009).

2.4.1 Poliênicos

Até a década de 1940, relativamente poucos agentes estavam disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. Neste contexto, o desenvolvimento dos antifúngicos poliênicos, especialmente a anfotericina B em 1956, representou um grande avanço na micologia médica, uma vez que foi o agente mais utilizado no tratamento das infecções fúngicas sistêmicas até o início da década de 1990 (MAERTENS, 2004).

Os dois poliênicos comercialmente disponíveis são nistatina e anfotericina B. Seu mecanismo de ação é baseado na formação de poros aquosos formados por anéis de oito moléculas de poliênicos ligadas hidrofobicamente aos esteróis da membrana citoplasmática do fungo, acarretando a morte celular através da desestabilização desta membrana seguida de alteração de permeabilidade e extravasamento de componentes citoplasmáticos vitais ao fungo (CATTALÁN & MONTEJO, 2006; BEN-AMI et al, 2008).

Devido à toxicidade de nistatina, este poliênico só é utilizado como antifúngico tópico. A anfotericina B (Figura 1) não é absorvida por via oral ou intramuscular, requerendo, portanto, administração intravenosa, intratecal ou através da rota inalatória. A anfotericina B é um antifúngico de amplo espectro, ativo sobre varias micoses como candidíases, aspergilose, blastomicose, coccidioidomicose, criptococose, histoplasmose, paracoccidioidomicose, esporotricose e zigomicose (GUBBINS & ANAISSIE, 2002).



de 80% dos pacientes que recebem o fármaco, e mesmo após o término da utilização do antifúngico alguns pacientes permanecem com comprometimento da filtração glomerular (BRANCH, 1988).

Devido ao excelente espectro de ação antifúngico e aos severos efeitos adversos, a indústria farmacêutica desenvolveu novas formas de apresentação da anfotericina B como: anfotericina B complexo lipídico (ABCL), anfotericina B em dispersão coloidal (ABCD) e ainda a forma lipossomal (L-Amb). Embora todas mantenham o mesmo espectro de atividade do desoxicolato de anfotericina B, as formulações lipídicas parecem ser mais potentes, menos nefrotóxicas e diferem entre si em relação a propriedades bioquímicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas (REX et al, 2001; DUPONT, 2002).

Poucos isolados clínicos de *Candida* têm sido caracterizados como resistentes a anfotericina B, pois os documentos M27-A3 e M38-A2 do CLSI (2008) que padronizam as técnicas para testes de suscetibilidade, respectivamente de fungos leveduriformes e filamentosos, não apresentam pontos de corte para a classificação dos isolados em sensíveis ou resistentes. Por outro lado, vários autores propõem que concentrações inibitórias mínimas (CIMs) ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ seriam compatíveis com a resistência (ELIE et al, 1999). Todavia, esta CIM é com frequência determinada para uma variedade de fungos filamentosos como *Paecilomyces lilacinus*, *Scedosporium*, *Aspergillus* spp, *Alternaria* spp, *Fusarium* spp, *Penicillium* spp, *Sporothrix schenckii* (ESPINEL-INGROFF et al, 2007).

Os casos de resistência a anfotericina B têm sido pouco descritos em *C. glabrata*, porém, de um modo geral, as CIMs de anfotericina B para *C. glabrata* são superiores às observados para *C. albicans* (OLSON et al, 2005). Estudos de suscetibilidade de *C. glabrata* têm mostrado que 61,9% dos isolados são sensíveis ao fluconazol e 75,2% são sensíveis a anfotericina B. Tais percentuais são ilusórios, pois, embora inicialmente sensíveis, os tratamentos rapidamente revertem o perfil de sensível para resistente (PFALLER et al, 2004b).

A redução ou falta de conteúdo de ergosterol na membrana plasmática da célula fúngica, tem sido associada à resistência, devido ao fato da afinidade de anfotericina B pelo ergosterol ser elevada e reduzida aos outros ergosteróis da membrana fúngica (fecosterol e episterol). Os mecanismos de alterações quantitativas do ergosterol são: (1) redução de ergosterol devido a inibição da sua síntese; (2) substituição de ergosterol por episterol e fecosterol ou outros esteróis; (3) alterações na relação de esteróis e fosfolípidos (PEYRON et al, 2002). Poucos estudos tem focado os aspectos moleculares dos isolados resistentes a

anfotericina B. Entretanto relaciona-se mutações nos genes *ERG2* e *ERG3* como responsáveis por alterações na biosíntese do ergosterol (HAYNES et al, 2001). Em *Candida* spp e em *Cryptococcus spp*, resistentes a poliênicos, o teor de ergosterol foi menor do que em isolados sensíveis a poliênicos (KAHN et al, 2006). Ainda as alterações na síntese de glucanas bem como a formação de biofilmes são fenômenos que favorecem a emergência da resistência de *C. glabrata* à anfotericina B (LO et al, 2005).

2.4.2 Azólicos

Os antifúngicos azólicos constituem-se num grupo de fármacos sintéticos fungistáticos, caracterizados por apresentarem um anel imidazol ligados por ligação carbono-nitrogênio com outros anéis aromáticos. A função desses anéis aromáticos é de modificar as propriedades físico-químicas, aumentar a eficácia terapêutica e reduzir a toxicidade. Dependendo do número de átomos de nitrogênio presentes no anel imidazol, estes agentes antifúngicos classificam-se em imidazólicos (miconazol, cetoconazol) quando houver apenas um átomo de nitrogênio, e triazólicos (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, ravuconazol) quando a molécula apresentar 3 átomos de nitrogênio no anel azólico (CATTALÁN & MONTEJO, 2006)

A atividade antifúngica dos azólicos ocorre através de diversos mecanismos; o mais importante é a inibição da biossíntese do ergosterol, determinando alteração da permeabilidade de membrana, pois os azóis se ligam às enzimas do citocromo P450 do fungo e inibem a desmetilação do lanosterol, um precursor do ergosterol (SPINOSA et al, 2002). Os triazólicos, sub-classe dos azólicos, representam novos antifúngicos com grande eficiência e baixa toxicidade. Diferentemente dos imidazóis, os triazóis tem alta afinidade pelo citocromo P450 fúngico não apresentando afinidade pelo citocromo P450 dos mamíferos. Em geral, os triazólicos demonstraram um espectro de atividade muito mais amplo e reduzida toxicidade quando comparados aos imidazólicos (SPINOSA et al, 2002).

A aprovação dos triazólicos, especialmente o fluconazol (Figura 2), no final dos anos 80 e início dos anos 90 implicou em grandes avanços no tratamento seguro e eficaz de infecções fúngicas locais e sistêmicas. O fluconazol cobre muitas deficiências dos imidazólicos. Diferente do cetoconazol, é altamente solúvel em água e pode ser

administrado intravenosamente a pacientes seriamente doentes, não é alterado por mudanças na acidez gástrica e possui menor risco de hepatotoxicidade. Além disso, apresenta boa penetração no fluído cerebrospinal, alcançando níveis de quase 80% no sangue. Entretanto, muitas das mesmas interações medicamentosas apresentadas pelo cetoconazol são também possíveis para o fluconazol (PATTON et al, 2001; MAERTENS, 2004).

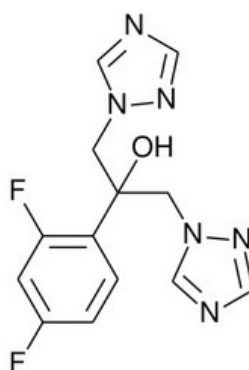


Figura 2 – Estrutura química do fluconazol

Contudo, o entusiasmo inicial pelo fluconazol foi desafiado por dois eventos: o envolvimento de um maior espectro de patógenos nas infecções fúngicas e a emergência da resistência aos azólicos. Isso porque, embora *C. albicans* permaneça a levedura mais comumente encontrada, este antifúngico apresenta restrições para infecções causadas por *C. krusei*, *C. glabrata* e *Aspergillus* spp. (HAJJEH et al, 2004; COLOMBO et al, 2007).

A espécie *C. glabrata* além de ser menos susceptível ao fluconazol demonstra uma capacidade de tornar-se rapidamente resistente ao mesmo e, cruzadamente, aos demais azólicos. A exposição de *C. glabrata* a subdoses de fluconazol pode resultar em uma resistência adquirida. Estudos clínicos têm mostrado que a frequência de colonização e infecção de pacientes com *C. glabrata* pode ser aumentada em populações submetidas à profilaxia com fluconazol. (BENNETI et al, 2004). Ainda, Pfaller et al (2004c) observaram que o fluconazol pode servir como um marcador para prever a suscetibilidade de *Candida* spp. a antifúngicos do tipo azólicos em presença de resistência cruzada de fluconazol e novos triazólicos.

Aprovado em 2002, o voriconazol (Figura 3), estruturalmente relacionado ao fluconazol, possui boa disponibilidade oral e parenteral; e diferentemente do itraconazol, sua

absorção não é afetada pelo pH gástrico (JEU et al, 2003). É um triazólico de segunda geração derivado de fluconazol, mas com uma potência e espectro de atividade muito maior. Este antifúngico difere do fluconazol pela substituição de um anel triazol e um n-fluoropirimidina. Estas alterações moleculares conferem ao voriconazol uma potente ação fungicida contra fungos filamentosos como *Aspergillus* e *Fusarium*. A sua ação contra leveduras é principalmente fungistática embora tenha sido relatado que alguns isolados de *Candida* são refratários ao voriconazol (QUINDÓS et al, 2007). Apesar da eficácia, segurança e amplo espectro, o voriconazol ainda não é o azólico ideal porque ainda apresenta interações medicamentosas e efeitos colaterais clássicos dos azólicos (GUPTA et al, 2005).

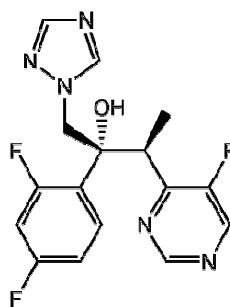


Figura 3 – Estrutura química do voriconazol

Frente aos novos triazólicos como o voriconazol, ravuconazol e posaconazol, *C. glabrata* tem sido significativamente mais sensível do que ao fluconazol. Deste modo, o voriconazol foi sugerido como alternativa terapêutica frente a *C. glabrata* resistentes ao fluconazol. Por outro lado, quando se comparam as concentrações inibitórias mínimas (CIMs), há evidentes correlações entre as CIMs encontradas para o voriconazol e para o fluconazol, comprovando a resistência cruzada (BENNETT et al, 2004). Em estudo realizado por Quindós et al (2007), 5 a 10% dos isolados de *C. glabrata* eram resistentes *in vitro* ao voriconazol (CIM \geq 2,0 $\mu\text{g/mL}$), e este percentual sobiu para 60% quando se tratava de isolados resistentes ao fluconazol.

2.4.3 Equinocandinas

A mais nova classe de antifúngicos é representada pelas equinocandinas, composta por três agentes: caspofungina, anidulafungina e micafungina. Equinocandinas são lipopeptídeos semi-sintéticos com estrutura química de hexapeptídeos cíclicos ligados a uma cadeia lateral de ácido graxo. Diferentemente da anfotericina B e dos azólicos, as equinocandinas têm como alvo a parede celular do fungo, inibindo a enzima β -1,3-glucana sintase, ligada à síntese de β -1,3-D glucana (DERESINSKI & STEVENS, 2003). Glucana sintase é um complexo enzimático com pelo menos duas subunidades, *Fksp* e *Rho1p*. Este último é um elemento regulador envolvido em numerosos processos celulares (KONDOH et al, 1997). A subunidade *Fksp*, codificada por três genes relacionados - *FKS1*, *FKS2* e *FKS3* - catalisa a transferência de moléculas de açúcar a partir de moléculas doadoras ativadas para moléculas receptoras específicas formando ligações glicosídicas (KONDOH et al, 1997; SAWISTOWSKA-SCHRODER et al, 1984; TANG & PARR, 1991). A glucana na forma de microfibrilas é um dos principais componentes da parede celular fúngica. O bloqueio de sua síntese resulta em desequilíbrio osmótico, prejudicando a viabilidade do microorganismo (BOWMAN et al, 2002; KARTSONIS et al, 2003).

As equinocandinas são produzidas sinteticamente a partir do caldo de fermentação de vários fungos. A caspofungina é derivada da *Glarea lozoyensis*; micafungina da *Coleophoma empedri* através da clivagem de um hexapeptídeo natural e a adição de uma cadeia lateral terfenil; a anidulafungina deriva do *Aspergillus nidulans*, e tem um núcleo cíclico hexapeptídico com uma cadeia lateral N-acil. (WAGNER et al, 2006; CAPPELLETY & EISELSTEIN, 2007; ESTES et al, 2009). Um anel íntegro e um grupo acila ligados covalentemente são necessários para a atividade biológica plena destas moléculas. O grupo terfenil determina a lipofilicidade e tamanho necessários para otimizar o efeito antifúngico e aumentar o espectro de atividade para incluir espécies de *Candida* e *Aspergillus* (DEBONO et al, 1995).

Equinocandinas agem *in vitro* sobre diversas leveduras e fungos filamentosos, porém em infecções experimentais é relevante somente a sua atividade sobre espécies de *Candida* e de *Aspergillus*. Para este último agente, ela é apenas fungistática (DIEKEMA et al, 2003; ESPINEL-INGROFF, 1998). Possuem atividade contra a maioria das espécies de *Candida*, no entanto, frente à *Candida parapsilosis* e *Candida guilliermondii* sua atividade é

diminuída (PFALLER et al, 2008a,b; KRAUSE et al, 2004). Outra importante capacidade das equinocandinas é sua atividade *in vitro* frente a biofilmes de *Candida* spp. *Candida* spp. têm sido frequentemente associadas com a formação de biofilmes em superfícies biológicas e inertes, como cateteres intravasculares, sendo essas infecções de difícil cura sem a remoção do dispositivo (MORACE et al, 2009).

Os efeitos adversos são menos freqüentes do que com a anfotericina B, por agirem em estruturas estritamente fúngicas, e a interação com outros medicamentos é menor comparando-se com os agentes azólicos. As equinocandinas são também recomendadas como uma alternativa ao fluconazol no tratamento primário para a maioria dos adultos não-neutropênicos com candidemias ou suspeita de doenças invasivas. Para o tratamento de candidemias em pacientes neutropênicos, as equinocandinas constituem-se nos fármacos de escolha (PAPPAS et al, 2009).

No que se refere a resistêncnia às equinocandinas, podemos observar que são raros os casos, contudo, passíveis de ocorrer durante a terapia antifúngica (WIEDERHOLD, 2007). Estudos recentes descrevem o desenvolvimento de resistência à caspofungina e micafungina durante o tratamento de endocardite (MOUDGAL et al, 2005) e à caspofungina durante o tratamento de esofagite (HERNANDEZ et al, 2004) evidenciando a emergência de espécies de *Candida* resistentes as equinocandinas. Esta resistência esta associada a substituições de aminoácidos na região Fksp1 (PERLIN, 2007). Da mesma foram é compreendido que substituições de aminoácidos em *Fks1p* e *Fks2p* são responsáveis por resistência clínica às equinocandinas em *C. glabrata* (CLEARY et al, 2008; GARCIA-EFFRON et al, 2009a; GARCIA-EFFRON et al, 2010; KATIYAR et al, 2006; THOMPSON et al, 2008).

Múltiplos estudos *in vitro* confirmam o efeito paradoxal das equinocandinas. Nesta circunstancia, acima de uma determinada concentração do agente observa-se uma diminuição da atividade antifúngica. O mecanismo exato responsável por este fenômeno ainda não foi totalmente elucidado e a significância clínica permanece incerta (THOMPSON et al, 2008).

Por possuírem baixa absorção oral as equinocandinas atuais estão disponíveis apenas em formulações endovenosas. Caspofungina e micafungina ligam-se fortemente as proteínas plasmáticas (caspofungina 97% e micafungina 99%) e anidulafungina moderadamente (84%) e possuem meia vida de 30, 15 e 26 horas, respectivamente.

No Brasil, a caspofungina (Figura 4) emergiu como a primeira equinocandina a ser comercializada no ano de 2000. Possui ação fungicida sobre diferentes espécies de *Candida*,

influenciar na evolução clínica de pacientes com infecções invasivas causadas por estas espécies (PFALLER et al, 2008a,b). A anidulafungina também possui atividade *in vitro* contra *Aspergillus* spp. e outros gêneros de fungos dermatóicos; entretanto, é inativa contra *Cryptococcus neoformans* e zigomicetos (COHEN-WOLKOWIEZ et al, 2006). Uma característica especial deste agente é sua via de eliminação, a qual é representada por lenta deterioração química no sangue sem metabolismo hepático e depuração renal (DOWELL et al, 2004); esta é uma diferença fundamental das outras moléculas da mesma classe. Ela possui uma meia-vida longa, o que permite uma única administração diária, e também possui perfil farmacocinético linear proporcional a dose. Não necessita de ajuste de dosagem para pacientes com funcionalidade renal e hepática reduzida (DOWELL et al, 2005). Atinge níveis de estado de equilíbrio rapidamente, no primeiro dia de administração (que deve ser igual ao dobro da dose de manutenção) (DOWELL et al, 2007). Não produz interação farmacológica com outros medicamentos que possam ser administrados concomitantemente a pacientes com patologias complexas e que são suscetíveis de estar recebendo vários tratamentos (ex.: ciclosporina, tacrolimus, rifampicina e outros indutores ou inibidores do sistema P450) (VASQUEZ, 2006).

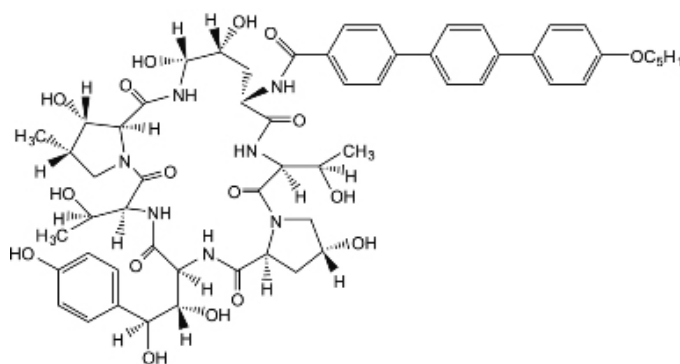


Figura 5 - Estrutura química da Anidulafungina

Recentemente, em 2010, a micafungina (Figura 6) foi aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para uso no Brasil, sendo indicada para tratamento de candidíase invasiva, profilaxia em indivíduos submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas, tratamento de infecções por *Aspergillus* e terapia empírica de febre neutropênica, para adultos e crianças (BORMANN & MORRISON, 2009). Micafungina apresenta atividade fungicida contra a maioria das espécies de *Candida*

(NISHIYAMA et al, 2002) e inibe significativamente o crescimento de hifas de *Aspergillus* (CHIOU et al, 2001). Ela mostra uma moderada atividade contra *Cladosporium trichoides*, *Exophiala dermatitidis*, *Exophiala spinifera* e *Fonsecaea pedrosoi*. Apresenta potente atividade somente contra as formas miceliais de *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* e *Coccidioides immitis*. Não possui atividade contra *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium solani*, *Zygomycetes*, *Fusarium*, *Pseudallescheria boydii* (*Scedosporium*), *Alternaria* e *Trichosporon* (NAKAI et al, 2002). A micafungina é metabolizada no fígado via citocromo P450 e excretada como metabólito inativo pela bile e urina (<1%). O percentual da forma não metabolizada eliminado nas fezes e urina é de 43,8 e 7,4% respectivamente. Nos idosos não há alteração na farmacocinética da micafungina. Em pacientes com insuficiência hepática não há alteração na concentração plasmática máxima (C_{max}) tão pouco na sua depuração; no entanto, existem diferenças na área sob a curva concentração-tempo. Insuficiência renal grave não afeta a farmacocinética da micafungina, por isso não é necessário ajuste de dose. A combinação de equinocandinas com outros agentes antifúngicos é uma opção que está ganhando importância como terapia alternativa para micoses causadas por fungos não suscetíveis à monoterapia antifúngica padrão ou em determinadas infecções associadas a biofilmes (CATEAU et al, 2008; KUHN et al, 2002; SEIDLER et al, 2006; YUSTES & GUARRO, 2005). Diversos estudos *in vitro* têm mostrado atividade sinérgica onde micafungina é combinada com anfotericina B, fluconazol, itraconazol, ou voriconazol contra isolados de diferentes espécies de *Aspergillus*, *Candida*, *Scedosporium*, *Fusarium* ou *zygomycetos*. A maioria destas atividades *in vitro* foi comprovada em modelos experimentais com diferentes espécies animais (PASTOR & GUARRO, 2009) e há estudos com descrições específicas de sucesso no tratamento de pacientes com micoses humanas invasivas (KONTOYIANNIS et al, 2009).

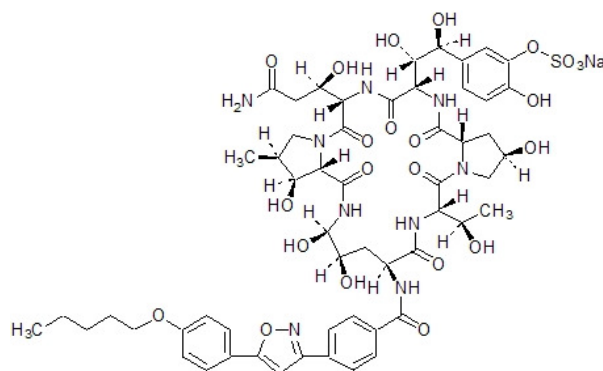


Figura 6 – Estrutura química da micafungina

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Comparar a atividade antifúngica *in vitro* das equinocandinas – caspofungina, anidulafungina e micafungina – com voriconazol e anfotericina B frente a isolados de *Candida glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol.

3.2 Objetivos Específicos

- 3.2.1 Induzir a resistência ao fluconazol em isolados de *C. glabrata*;
- 3.2.2 Avaliar, com base nas Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs), a suscetibilidade de *C. glabrata* – sensíveis e resistentes ao fluconazol – frente a anidulafungina, caspofungina, micafungina, voriconazol e anfotericina B.
- 3.2.3 Comparar a atividade antifúngica entre as três equinocandinas: caspofungina, anidulafungina e micafungina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

Foram utilizados trinta e seis isolados de *C. glabrata*, todos sensíveis ao fluconazol, provenientes de pacientes com candidemia sistêmica internados no Complexo Hospitalar Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (RS) e Hospital Universitário de Santa Maria (RS). Incluiu-se também trinta e seis isolados de *C. glabrata* resistentes ao fluconazol, os quais foram obtidos pela técnica de indução de resistência *in vitro* proposta por Fekete-Forgács et al (2000).

4.2 Agentes Antifúngicos

Os antifúngicos, na forma de sais, foram obtidos de seus respectivos fabricantes - anidulafungina e voriconazol (Pfizer), anfotericina B e fluconazol (Sigma), caspofungina (Merck) e micafungina (Astellas) – e preparados de acordo com o protocolo M27-A3 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008a,b).

As diluições intermediárias foram realizadas em Caldo RPMI 1640 tamponado com MOPS de acordo com a técnica empregada.

4.3 Indução de resistência ao fluconazol *in vitro*

Seguindo a técnica proposta por Fekete-Forgács et al (2000), as culturas de *C. glabrata* sensíveis ao fluconazol foram semeadas em tubos contendo Caldo Sabouraud e incubadas a 30°C “overnight”. As concentrações das culturas foram, a seguir, padronizadas em novos cultivos com Caldo Sabouraud com base na turvação medida em espectrofotômetro para absorbância 0,1 a 640 nm. Os cultivos padronizados foram incubados a 30°C e, após 10 horas, foi acrescentado fluconazol resultando em uma concentração final de 8 µg/mL. Decorridas 14 horas de incubação, as células das culturas

contendo fluconazol foram novamente transferidas para tubos contendo Caldo Sabouraud e fluconazol 8 µg/mL e, incubadas a 30°C sob agitação de 120 rpm, durante 24 horas. Este procedimento foi realizado por 3 vezes consecutivas.

Após a terceira incubação, as células eram transferidas para novos tubos contendo Caldo Sabouraud e fluconazol na concentração final de 8 µg/mL a fim de que se obtivesse, em espectrofotômetro, uma absorbância final de 0,1 a 640 nm. Depois de 10 horas de incubação, era adicionado fluconazol suficiente para obtenção de 16 µg/mL de fluconazol. Os cultivos eram incubados a 30°C por 24 horas sob agitação. Os ensaios eram repetidos duplicando-se a concentração de fluconazol até que se atingisse 64 µg/mL. As células do cultivo final eram semeadas em Ágar Sabouraud.

4.4 Testes de suscetibilidade aos antifúngicos

Foram realizados testes de suscetibilidade ao fluconazol e aos demais antifúngicos para confirmar a sensibilidade ou resistência para todos os isolados através da técnica de microdiluição em caldo, de acordo com as normas de padronização publicadas no documento M27-A3 do CLSI (2008a).

4.4.1 Preparação do inóculo

Para preparação do inóculo foram realizados subcultivos das amostras de *C. glabrata* (sesíveis e resistentes ao fluconazol), em tubos estéreis com ágar Sabouraud dextrose, incubados a 35°C por 24 horas. A seguir, as colônias foram suspensas em solução de salina 0,85% estéril. A suspensão resultante era colocada em agitador vórtex durante 15 segundos e a densidade celular ajustada em espectrofotômetro a fim de se obter transmitância equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland (1×10^6 a 5×10^6 células por mL), em comprimento de onda de 530nm. A suspensão de trabalho era preparada fazendo-se uma diluição 1:50 seguida de uma diluição 1:20 da suspensão-padrão com o meio líquido RPMI 1640, resultando em concentração de $1,5 \pm 1,0 \times 10^3$ células por mL.

4.4.2 Preparação das microplacas

O teste de microdiluição foi realizado em placas estéreis de poliestireno de fundo chato, descartáveis, com 96 poços, em duplicata. As concentrações duas vezes concentradas dos antifúngicos foram dispensadas nos poços das fileiras 1 a 10 das placas de microdiluição, em volumes de 100 µL. As fileiras 11 e 12 representaram respectivamente os controles negativo e positivo, respectivamente. As concentrações finais dos antifúngicos foram: 0,007 a 4 µg/mL para anfotericina B e caspofungina, 0,0035 a 2 µg/mL para anidulafungina e micafungina e de 0,125 a 64 µg/mL para voriconazol e fluconazol. Cada poço da placa de microdiluição já contendo os respectivos antifúngicos, foi inoculado com 100 µL de inóculo padronizado.

4.4.3 Incubação e leitura dos resultados

As placas foram incubadas a 35°C, e as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) determinadas após 48h de incubação. Após a incubação, as CIMs para as equinocandinas e os azólicos foram consideradas as menores concentrações que evidenciaram 80% de inibição em relação à turvação dos controles positivos; enquanto que para anfotericina B as menores concentrações que evidenciaram 100% de inibição (CLSI, 2008a,b). As CIMs utilizadas na definição de resistência de voriconazol ($\geq 8,0$ µg/mL), anfotericina B ($> 1,0$ µg/mL), caspofungina, anidulafungina e micafungina ($> 2,0$ µg/mL) foram estabelecidas de acordo com estudos anteriores (KURIYAMA et al, 2005; COLLIN et al, 1999; KROGH-MADSEN et al, 2006; PFALLER et al, 2004a,b).

4.4.4 Análise Estatística

O teste estatístico de Mann-Whitney foi utilizado para comparar duas amostras independentes a fim de avaliar os diferentes grupos (isolados sensíveis e isolados resistentes ao fluconazol) com nível de significância $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Indução de resistência ao fluconazol *in vitro*

Todos os isolados de *Candida glabrata* subcultivados em crescentes exposições ao fluconazol, de acordo com o método de Fekete-Forgács (2000), adquiriram resistência ao azólico após quinze dias; exibiram concentrações inibitórias mínimas iguais ou superiores a 64 µg/ml (Tabela 1). As CIMs de fluconazol no grupo resistente variaram de 64 µg/mL a 256 µg/mL e a diferença entre as CIMs para ambos os grupos foi significativa ($p < 0,0001$).

Tabela 1: Suscetibilidade (µg/mL) *in vitro* dos isolados de *Candida glabrata* frente ao fluconazol antes e após os 15 dias de crescente exposição ao fluconazol.

Grupos de isolados	Intervalo	Média Geométrica	CIM ₅₀	CIM ₉₀
FS (n=36)	1 – 32	4,404	4	32
FR (n=36)	64 – 256	140,9	128	256

CIM₅₀ = Concentração inibitória mínima capaz de inibir 50% dos isolados do grupo testado

CIM₉₀ = Concentração inibitória mínima capaz de inibir 90% dos isolados do grupo testado

FS= Fluconazol-sensível

FR= Fluconazol-resistente

5.2 Testes de suscetibilidade aos antifúngicos

As concentrações inibitórias mínimas dos isolados de *Candida glabrata* frente aos agentes antifúngicos foram determinadas antes e depois dos 15 dias de exposição crescente ao fluconazol. A Tabela 2 apresenta os resultados dos testes de suscetibilidade antifúngica que permitem comparações mais detalhadas entre os grupos.

Tabela 2: CIM ($\mu\text{g/mL}$) *in vitro* dos isolados de *Candida glabrata* aos agentes antifúngicos antes e após os 15 dias de crescente exposição ao fluconazol.

Antifúngicos	Grupos de isolados	Média geométrica	Intervalo	CIM ₅₀	CIM ₉₀
Anfotericina B	FS	0,093	0,062 – 0,250	0,125	0,125
	FR	0,824	0,125 – 2	1	2
Voriconazol	FS	0,389	0,060 – 2	0,5	1
	FR	6,229	1 – 128	8	16
Anidulafungina	FS	0,017	0,004 – 0,031	0,004	0,031
	FR	0,031	0,008 – 0,062	0,008	0,062
Caspofungina	FS	0,106	0,015 – 0,250	0,125	0,25
	FR	0,194	0,062 – 0,50	0,250	0,5
Micafungina	FS	0,007	0,002 – 0,015	0,008	0,008
	FR	0,011	0,004 – 0,015	0,015	0,015

CIM₅₀ = Concentração inibitória mínima capaz de inibir 50% dos isolados do grupo testado;

CIM₉₀ = Concentração inibitória mínima capaz de inibir 90% dos isolados do grupo testado.

FS= Fluconazol-sensível

FR= Fluconazol-resistente

Com base nos parâmetros de suscetibilidade (intervalos de CIM, CIM₅₀, CIM₉₀ e média geométrica), o grupo de isolados de *C. glabrata* sensíveis ao fluconazol (FS) se mostrou sensível a anfotericina B, com CIM₉₀ = 0,125 $\mu\text{g/mL}$ e média geométrica = 0,093 $\mu\text{g/mL}$. O grupo de *C. glabrata* resistente ao fluconazol (FR) requereu concentrações mais altas de anfotericina B para ser inibido, com CIM₉₀ = 2 $\mu\text{g/mL}$ e média geométrica = 0,824 $\mu\text{g/mL}$. Neste grupo, o intervalo de CIM incluiu 9 isolados com CIM = 2 $\mu\text{g/mL}$. O teste estatístico de Mann-Whitney mostrou diferença significativa entre a suscetibilidade à anfotericina B do grupo sensível e do grupo resistente ao fluconazol ($p < 0.0001$). *C. glabrata* exibe facilidade natural para tornar-se resistente se comparado com outras espécies de *Candida* (Pfaller & Diekema, 2004) o que foi confirmado pelo presente estudo.

Os testes de suscetibilidade do grupo FS ao voriconazol mostraram parâmetros tais como CIM₉₀ = 1 $\mu\text{g/mL}$ e média geométrica = 0,389 $\mu\text{g/mL}$. Por outro lado, o grupo FR mostrou evidente parâmetro de resistência ao triazólico: CIM₉₀ = 16 $\mu\text{g/mL}$ e média geométrica = 6,229 $\mu\text{g/mL}$; a suscetibilidade entre os dois grupos foi significativamente diferente ($p < 0.0001$).

As equinocandinas notadamente mostraram a melhor atividade frente ao grupo resistente (FR), e os valores mais baixos de CIM foram exibidos pela micafungina. Os perfis de suscetibilidade do grupo sensível (FS) com base na CIM₉₀ foram: micafungina

(0,008 μ g/mL), anidulafungina (0,031 μ g/mL) e caspofungina (0,25 μ g/mL). A CIM₉₀ requerida pelo grupo FR foi similar ao grupo FS. Com base nesses parâmetros, os isolados de *C. glabrata* de ambos os grupos foram suscetíveis as equinocandinas. Por outro lado, o teste estatístico, comparando as CIMs dos grupos FS e FR, indicou diferença significativa para caspofungina ($p = 0,0023$), anidulafungina ($p < 0,0001$) e micafungina ($p < 0,0001$).

6 DISCUSSÃO

Como resultado do aumento da incidência de doenças que resultam em comprometimento imunológico, um substancial acometimento de infecções fúngicas oportunistas, tanto superficiais quanto sistêmicas, ocorreu durante as décadas de 1980 e 1990. O aumento do uso de agentes imunossupressivos, quimioterapias e pacientes infectados com HIV são fatores ligados diretamente a este avanço oportunista (KAO et al, 1999; TRICK et al, 2002). O gênero *Candida* atualmente ocupa a quarta posição dentre as causas de infecções sanguíneas nos EUA, acomete 8% a 10% dos pacientes com infecções sanguíneas em ambientes hospitalares. A alta taxa de mortalidade, de até 49%, é o desfecho mais preocupante em relação às candidíases invasivas (WEY et al, 1988; ZAOUTIS et al, 2005).

Candida glabrata encontra-se em segundo lugar de isolamento em candidemias nos EUA, vindo atrás somente de *C. albicans*; acomete 20 a 24% dos pacientes com infecções sanguíneas causadas por *Candida* spp. naquele país (LYON et al, 2010). Trick et al (2002) demonstrou que dentre as espécies de *Candida*, *C. glabrata* tem se tornado frequente em infecções sanguíneas em UTIs desde 1993. Em escala global, a frequência de candidemias por *C. glabrata* varia de 22% na América do Norte para 4 a 6% na América Latina (PFALLER et al, 2004b,c), 8,8% a 10,58% na Europa e 7,2% a 12,1% na região da Ásia (PFALLER et al, 2003; PFALLER et al, 2005). Alguns estudos revelam taxas ainda maiores. Ruan et al (2008) demonstrou que *C. glabrata* foi responsável por 30% dos episódios de candidemias no período de 2000 a 2005. No mesmo estudo, a incidência de fungemia por *C. glabrata* foi de 1,3 para cada 1000 pacientes internados em UTIs.

No Brasil a incidência desta espécie é menor, se comparada com outros países. Colombo et al (2006) relatam que *C. glabrata* ocupa o 5º lugar (4,9%) entre os agentes causadores de candidemias. Acredita-se que a prevalência desta espécie se dê em decorrência de diferentes fatores, incluindo características geográficas (PFALLER et al, 2004a,d; PFALLER et al, 2005) idade dos pacientes (DIEKEMA et al, 2002; MALANI et al, 2005) características da população dos pacientes estudadas (ABI-SAID et al, 1997) e o frequente uso de fluconazol como tratamento ou profilaxia (MARR et al, 2000; ANTONIADOU et al, 2003).

A *Infectious Diseases Society of America* recentemente atualizou as orientações para o tratamento de candidemias e infecções invasivas por *Candida* spp. (PAPPAS et al, 2009). As normas para o tratamento de infecções invasivas por *Candida* spp. dependem de fatores como: estado do paciente, espécie de *Candida* isolada, padrões de suscetibilidade do isolado, exposição primária do paciente a antifúngicos, e o órgão envolvido pela infecção (MORRELL et al, 2005; GAREY et al, 2006). Fluconazol permanece a terapia de seleção para pacientes sem histórico de exposição a azólicos, que estejam no curso da doença de leve a moderada, e que não possuam risco de infecção por *C. glabrata* (pacientes idosos, neoplásicos ou diabéticos) (REX et al, 1994; PAPPAS et al, 2009; KULLBERG et al, 2005). No entanto, o fluconazol não é administrado como terapia primária em pacientes neutropênicos, com doenças severas, e em casos de miocardites, endocardites e meningites. O voriconazol possui boa atividade contra a maioria das espécies de *Candida*, sendo uma alternativa oral e intravenosa à anfotericina B e às equinocandinas, entretanto, não é indicado como terapia primária em infecções disseminadas por *C. glabrata* e *C. krusei* e isolados resistentes ao fluconazol (PFALLER et al, 2002). As equinocandinas têm se tornado a classe de escolha para terapia primária em casos de candidíase invasiva. A facilidade de administração, baixa toxicidade, poucas interações farmacológicas e ampla atividade contra a maioria das espécies de *Candida* spp., reforçam sua utilização. Além do mais, as equinocandinas são indicadas como primeira linha no tratamento de pacientes que possuem histórico de exposição aos azólicos, neutropenia, alterações hemodinâmicas, alergias aos componentes dos azólicos ou anfotericina B, ou infecções por *C. krusei* ou *C. glabrata* (KUSE et al, 2007). Apesar da sua conhecida toxicidade, a anfotericina B ainda é largamente utilizada no tratamento de candidemias. Entretanto, são recomendadas as formulações lipídicas no tratamento de infecções invasivas, em circunstâncias de intolerância às equinocandinas ou azólicos, infecções resistentes ou refratárias a outros antifúngicos, ou suspeitas de infecções por fungos não-*Candida* como *Cryptococcus neoformans* (MORA-DUARTE et al, 2002; REX et al, 2003; KUSE et al, 2007).

A profilaxia com antifúngicos azólicos em pacientes severamente doentes, transplantados ou que realizaram quimioterapia reduziu drasticamente a taxa de mortalidade por infecções fúngicas (WINSTON et al, 1999). Porém, esta prática não previne infecções por espécies como *C. krusei* e *C. glabrata*. Estudos clínicos têm mostrado que a frequência de colonização e infecção de pacientes com *C. glabrata* pode ser aumentada em populações submetidas à profilaxia com fluconazol (BENNETT et al, 2004; MANN et al, 2009).

As infecções disseminadas por espécies de *Candida* também podem ser tratadas com alternativas terapêuticas, dentre elas estão as associações de antifúngicos. Entretanto, o tratamento combinado com dois ou mais antifúngicos ou fármacos de outras classes (antibacterianos, estatinas ou anti-inflamatórios), requerem estudos específicos, pois há possibilidade de ocorrer interações indesejadas entre os fármacos envolvidas (MUKHERJEE et al, 2005). A imunoterapia também tem sido utilizada como adjuvante no tratamento antifúngico, incluindo o uso de imunomoduladores como G-CSF, GM-CSF e α -interferon. A utilização de anticorpos monoclonais demonstram prevenir candidíases disseminadas em estudos utilizando ratos, e vem sendo foco de estudos para a produção de vacinas contra candidíases (POYNTON et al, 1998).

As principais falhas da terapêutica antifúngica podem ser o resultado de: a) doses inadequadas; b) absorção, distribuição ou metabolismo deficiente; c) interações medicamentosas; d) neutropenia grave; e) emergência do fenômeno da resistência aos antifúngicos (BOFF et al, 2008). Outras causas de falha no tratamento são os fatores locais que interferem na ação do antifúngico, por exemplo: sítio purulento onde encontra-se a infecção, e formação de biofilme pelo microrganismo. A depressão severa do sistema imunológico do paciente, pode ser responsável pelo fracasso terapêutico, pois, para a erradicação da infecção também é necessário o bom funcionamento dos leucócitos, polimorfonucleares e células mediadoras de imunidade (REX et al, 2001).

A suscetibilidade *in vitro* é um dos fatores que influencia o resultado da terapia de infecções fúngicas (REX et al, 2001). É determinado pela concentração inibitória mínima (CIM), que representa a mínima concentração do fármaco capaz de inibir 80%, no caso das equinocandinas e azólicos, ou 50% no caso da anfotericina B, do crescimento fúngico comparando-se a um controle negativo (ausência do fármaco). A técnica mais utilizada para determinação da CIM é o método de microdiluição em caldo. Em relação a fungos leveduriformes, como *Candida*, o protocolo utilizado para determinação da CIM é o M27-A3, atualizado pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) em 2008. A *Infection Society of America* recomenda que todos os primeiros isolamentos de infecções de corrente sanguíneas sejam identificados em nível de espécie e, a seguir, realizados testes de suscetibilidade (KAO et al, 1999; TRICK et al, 2002). A resistência aos antifúngicos tem representado um grande desafio para a clínica, frente às dificuldades observadas no tratamento de candidíases. As infecções por *C. glabrata* são especialmente importantes, pois esta espécie apresenta resistência inata a agentes antifúngicos do grupo azóis e baixa

suscetibilidade a anfotericina B (DENNING et al, 1997; SANGUINETTI et al, 2005). Em infecções sanguíneas por *C. glabrata*, a resistência ao fluconazol é presente em aproximadamente 10% a 15% dos casos (PFALLER et al, 2002). No entanto, há relatos sugerindo que a pressão seletiva do fármaco não seja o único fator responsável pela atual prevalência de *C. glabrata* em candidemias; a exposição desta espécie a subdoses de fluconazol pode resultar também em resistência adquirida. (PFALLER & DIEKEMA, 2004a).

No presente estudo tal relação foi investigada comparando-se a suscetibilidade de isolados de *C. glabrata* fluconazol sensíveis e fluconazol resistentes frente ao fluconazol, voriconazol, anfotericina B e equinocandinas.

A anfotericina B é geralmente recomendada como terapia primária em infecções severas causadas por *C. glabrata*. Entretanto, vem se tornando evidente que este agente não é universalmente efetivo contra todas as espécies de *Candida*, e altas doses de anfotericina B podem ser requeridas para um tratamento eficiente (KREMERY & BARNES, 2002). No presente estudo houve um aumento marcante das CIMs de anfotericina B no grupo resistente ao fluconazol (FR) em relação ao grupo sensível (FS). Esta elevação correspondeu a aumento de quase 9 vezes na média geométrica e de 16 vezes na CIM₉₀. A interpretação confiável e convincente de pontos de corte ainda não estão disponíveis para anfotericina B (PARK et al, 2005). A metodologia dada pelo protocolo M27-A3 do CLSI (2008a,b) não identifica com segurança isolados resistentes à anfotericina B (REX et al, 1995). Variações desta metodologia usando diferentes meios de cultura (REX et al, 1995) e determinação de concentrações fungicidas mínimas (CFMs) (NGUYEM et al, 1998) parecem melhorar a detecção de isolados resistentes. Embora estes métodos ainda não estejam suficientemente padronizados para permitir o uso em rotina, muitas destas variações estão se tornando evidentes. A resistência à anfotericina B parece incomum ente isolados de *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Isolados de *C. lusitaniae* na maioria das vezes demonstram resistência a anfotericina B facilmente detectável e clinicamente aparente. Nem todos os isolados demonstram resistência (NGUYEM et al, 1998; VIUDES et al, 2002), mas falhas terapêuticas com anfotericina B são bastante documentadas (MINARI et al, 2001). Relatos recentes sugerem que uma proporção crescente de *C. glabrata* e *C. krusei* pode evidenciar resistência à anfotericina B (DIEKEMA et al, 2002; NGUYEM et al, 1998).

A resistência cruzada entre fluconazol e voriconazol foi notável resultando em CIM₅₀ = 8 µg/mL, CIM₉₀ = 16 µg/mL e média geométrica = 6,229 µg/mL para o voriconazol nos

isolados resistentes ao fluconazol (FR). A resistência cruzada entre os agentes azólicos é um fenômeno bem estabelecido; devido a isto, o fluconazol foi proposto como marcador substituto para a suscetibilidade do voriconazol, dada a maior potência do voriconazol em comparação ao fluconazol (PFALLER et al, 2007). Assim, o voriconazol, bem como ravuconazol e posaconazol, tem demonstrado boa atividade frente à maioria dos isolados de *Candida* spp resistentes ao fluconazol. Frente à *C. glabrata*, estes triazóis têm sido significativamente mais efetivos que o fluconazol. Desta forma, o voriconazol tem sido sugerido como terapia alternativa frente a infecções causadas por *C. glabrata* resistente ao fluconazol (JOHNSON & KAUFFMAN, 2003). Contudo, quando se compara as CIMs, há evidente correlação de resistência cruzada entre voriconazol e fluconazol (Tabela 2) (BENNETT et al, 2004). Assim, no presente estudo confirmamos teses anteriores mostrando que os azóis são menos ativos contra *C. glabrata* (PFALLER & DIEKEMA, 2004). Isolados sensíveis dose-dependente (32-64 µg/mL) estiveram presentes em 23,53 % dos isolados do grupo FS frente ao voriconazol e apenas um isolado (2,94%) apresentou resistência ao voriconazol. Lyon et al (2010) e Drago et al (2004) demonstraram percentuais de resistência ao voriconazol em *C. glabrata* de 2,1% e 5,5% respectivamente; tais resultados podem ser comparados com o estudo em questão. Considerando os mecanismos de resistência, é esperado encontrar resistência cruzada quando são realizados testes de suscetibilidade aos antifúngicos em isolados resistentes ao fluconazol (QUINDÓS et al, 2000; ALVES et al, 2006). Em estudo realizado por Berilla et al (2009) com 38 amostras clínicas de *C. glabrata*, 28,9% dos isolados se mostraram resistentes ao fluconazol e 42,1% ao voriconazol. Ainda, os autores citam que todos os isolados resistentes ao fluconazol foram também resistentes ao voriconazol. Posteraro et al (2006) relataram, em um estudo de caso, a aquisição de resistência cruzada aos antifúngicos azólicos durante o tratamento de candidemia. Um paciente que apresentava quadro de candidemia por *C. glabrata*, foi medicado com fluconazol, pois se tratava de uma amostra sensível aos azólicos (fluconazol, cetoconazol, itraconazol e voriconazol). No entanto, após seis meses o quadro se agravou para candidemia grave, com o seguinte perfil de suscetibilidade: CIM = 256 µg/mL para fluconazol; CIM > 16 µg/mL para cetoconazol; CIM = 4 µg/mL para itraconazol; e CIM = 8 µg/mL para voriconazol.

No presente estudo demonstrou-se que as equinocandinas exibem potente atividade contra os dois grupos de isolados de *C. glabrata*. A micafungina mostrou a melhor atividade antifúngica; este fármaco é também eficaz contra biofilmes de *Candida* spp. e determina

redução na aderência de isolados sensíveis e resistentes aos azóis, em células epiteliais (BORG-VON ZEPPELIN et al, 2002). No presente estudo, foi também possível detectar uma pequena disparidade nos valores de CIM entre as equinocandinas. Anidulafungina e micafungina demonstraram atividade similar, porém a caspofungina requereu doses mais altas (CIM \pm 4 diluições) para inibir o crescimento dos isolados (Tabela 2). Ostrosky-Zeichner et al (2003) evidenciaram que a micafungina era, em média, 4 vezes mais potente que a caspofungina, exceto quando testada contra *C. parapsilosis*, o que é consistente com os resultados aqui demonstrados. Contudo, Perlin (2007) supôs que, entre cepas de *Candida* spp. com mutação *FKSI* que expressa resistência a caspofungina, resistência cruzada a micafungina e anidulafungina era também evidenciada. Pfeiffer et al (2010) recentemente relataram um caso de fungemia por *C. glabrata* durante o tratamento com micafungina com valores de CIM entre 4 e 8 μ g/ml e mutação *FKS*. Esses episódios enfatizam a importância do monitoramento de infecções por *C. glabrata* em relação à resistência contra azóis e equinocandinas.

As equinocandinas constituem uma classe de agentes antifúngicos com diferente mecanismo de ação (MESSERY et al, 2009). Entretanto, estudos anteriores sobre *Candida* spp. multi-resistente (MOUDGAL et al, 2005) envolvendo azólicos e anfotericina B ou azólicos e equinocandinas sugerem algum nível de conexão entre esses dois fenômenos. Posteraro et al (2006) relataram um caso de candidemia por *C. glabrata* o qual demonstrava resistência cruzada entre vários antifúngicos. Nossos resultados mostram que as equinocandinas tiveram um pequeno aumento nas CIMs do grupo sensível para o grupo resistente ao fluconazol. A aquisição de resistência ou redução da suscetibilidade às equinocandinas tem sido raramente relatada, estando a maioria dos casos associados com mutações nos genes *FKS I* (PARK et al, 2005).

O CLSI desenvolveu e padronizou métodos de diluição em caldo e também de disco difusão para teste de suscetibilidade *in vitro* de *Candida* spp. frente às equinocandinas (CLSI, 2008a). Esses métodos têm sido aplicados no mundo todo com o propósito de um entendimento detalhado do perfil de suscetibilidade *in vitro* de *Candida* spp. frente a anidulafungina, caspofungina e micafungina (ARENDRUP et al, 2009; BAIXENCH et al, 2007; ESPINEL-INGROFF, 2003; MESSER et al, 2006; OSTROSKY-ZEICHNER et al, 2003; PERLIN, 2009; PFALLER et al, 2005, 2006, 2008a, 2010a,b; PFALLER & DIEKEMA, 2007). Em 2007, o Subcomitê para testes antifúngicos do CLSI baseado em dados microbiológicos e clínicos acumulados, propôs pontos de corte clínicos interpretativos

para os testes de CIM das equinocandinas frente à *Candida* spp. (PFALLER et al, 2008b). Os pontos de corte, os quais foram subsequentemente incorporados aos documentos M27-A3 (CLSI, 2008a) e M27- S3 (CLSI, 2008b), foram os seguintes: suscetível para CIM ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ para as três equinocandinas e todas as espécies de *Candida*. Devido às escassas informações caracterizando a resistência às equinocandinas nos isolados de *Candida*, até o momento o Subcomitê decidiu não definir ponto de corte para resistência e recomendou que isolados para os quais a CIM excedesse a 2 $\mu\text{g/ml}$ seriam chamados “não-suscetíveis” e deveriam ser encaminhados a laboratórios de referência para confirmação da espécie e do teste de suscetibilidade (PFALLER et al, 2008b).

Entretanto, recentemente tornou-se evidente que, clinicamente, infecções por *Candida* resistente envolvendo cepas com mutações *FKS1* e/ou *FKS2* não possuem necessariamente CIM acima do ponto de corte (ARENDRUP et al, 2009; BAIXENCH et al, 2007; GARCIA-EFFRON et al, 2008a,b; GARCIA-EFFRON et al, 2009a,b; PFALLER et al, 2010a,b; THOMPSON et al, 2008). Além disso, estudos cinéticos do complexo enzimático glucana sintase sugerem que um menor ponto de corte (0.25 ou 0.5 $\mu\text{g/ml}$) parece ser mais sensível na detecção daqueles isolados que possuem mutações *FKS 1/FKS 2* (GARCIA-EFFRON et al, 2009a,b; WIEDERHOLD et al, 2008). Estas observações colocam em questão a habilidade dos atuais pontos de corte em identificar com segurança isolados que possuem mecanismo de resistência, associado a falhas terapêuticas (GARCIA-EFFRON et al, 2009a,b). Além disso, o CLSI agrupou todas as espécies de *Candida* e atribuiu um ponto de corte único para todas as espécies. Porém, Pfaller et al (2011), em um estudo de critérios para interpretação de pontos de corte espécie-específico, mostraram evidências claras de que as CIMs para equinocandinas foram significativamente menores para algumas espécies do que para outras. Através deste estudo os autores propuseram pontos de corte específicos para cada espécie de *Candida* para anidulafungina, caspofungina e micafungina, classificando sensibilidade como segue: anidulafungina, caspofungina e micafungina de ≤ 0.25 $\mu\text{g/mL}$ para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*; de ≤ 0.06 $\mu\text{g/mL}$ (micafungina) ou ≤ 0.12 $\mu\text{g/mL}$ (anidulafungina, caspofungina) para *C. glabrata*; e de ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$ para *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*. Além disso, Pfaller et al (2011) salientam que aqueles isolados que evidenciarem CIM de 0,12 $\mu\text{g/mL}$ para micafungina e 0,25 $\mu\text{g/mL}$ para anidulafungina e caspofungina, ou seja, CIM duas vezes maior que aquela considerada como indicadoras de resistência, podem ou não conter mutação *FKS*. Estas cepas podem responder clinicamente à terapia com equinocandinas e devem ser melhor categorizadas

como intermediárias. O uso de uma categoria intermediária fornece uma zona de segurança para os testes de suscetibilidade antimicrobiana, o que é necessário para evitar erros muito grandes que podem ocorrer devido à variabilidade inerente nos testes de microdiluição em caldo. Além disso tal categoria também pode ser usada para designar cepas com elevadas CIMs que podem responder clinicamente a uma dose maior que o padrão de antifúngico ou em situações onde a penetração da droga é maximizada (PFALLER et al, 2011).

Devemos ressaltar que, com base nos parâmetros de suscetibilidade (CIM50, CIM90 e faixa de CIM) e nos pontos de corte estabelecidos pelo CLSI (2008a,b), o grupo de *C. glabrata* resistente ao fluconazol (FR) foi suscetível as três equinocandinas. Por outro lado, quando o teste estatístico foi aplicado a fim de comparar a suscetibilidade ente os dois grupos (FS versus FR) o grupo FR foi menos suscetível que o grupo FS, sendo este um achado que merece atenção. Somado a isto, estudos de classificação de pontos de corte espécie-específicos têm sido propostos para as equinocandinas. Tomando-se estes estudos como base para os dados aqui apresentados, algumas classificações de sensibilidade e resistência sofreriam alterações. Em especial frente à caspofungina, alguns isolados seriam classificados como resistentes e outros como intermediários. Desta forma, o monitoramento dos testes de suscetibilidade para os antifúngicos novos e convencionais é fundamental para detectar a emergência da resistência em *C. glabrata*, importante agente de micoses oportunistas, ainda pouco estudado no Brasil.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram concluir que:

- Foi possível induzir resistência ao fluconazol nos 36 isolados de *C. glabrata* inicialmente sensíveis a este azólico, requerendo CIM ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ após a indução;
- O fenômeno de resistência cruzada ficou evidenciado entre os azóis, fluconazol e voriconazol, mas não estendido às equinocandinas;
- Os perfis de suscetibilidade demonstraram que as equinocandinas são os agentes antifúngicos de maior potência frente a *C. glabrata* sensíveis e resistentes ao fluconazol;
- Entre as equinocandinas, a micafungina foi o antifúngico mais ativo.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A detecção de fungos resistentes, notadamente isolados do gênero *Candida*, é um evento que tem requerido a atenção da comunidade médico-científica em todo mundo. O fenômeno está sob investigação, mas os percentuais de resistência apontados por estudos multicêntricos são preocupantes. Neste contexto, dois pontos são importantes: a detecção e caracterização das espécies resistentes, e a escolha de opções terapêuticas mais efetivas.

Este estudo demonstrou claramente o excelente espectro e atividade das equinocandinas como agentes antifúngicos frente a uma coleção de *C. glabrata* com diferentes perfis de suscetibilidade. A micafungina, em particular, demonstrou excelente efetividade frente aos dois grupos de isolados de *C. glabrata*. A micafungina foi a segunda das equinocandinas a ser aprovada nos Estados Unidos e é eficiente frente a *Candida* e *Aspergillus* spp. No geral, micafungina provou ser segura, bem tolerada e ter poucas interações medicamentosas. Direções futuras devem incluir estudos adicionais de seu uso como monoterapia e também associado a outros medicamentos no tratamento de infecções fúngicas refratárias e invasivas.

Finalmente, é pertinente lembrar que se a resistência de *C. glabrata* ao fluconazol é um fenômeno hoje facilmente detectado e dispendioso das equinocandinas como terapêutica segura, outros fenômenos emergem. Dentre eles chama à atenção a menor sensibilidade de *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* frente às equinocandinas. Considerando-se que na América Latina e, sobretudo no Brasil, *C. parapsilosis* é muito prevalente, são requeridas medidas de alerta e freqüente monitoramento do perfil de suscetibilidade desta espécie frente às equinocandinas.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABI-SAID, D.; ANAISSIE, E.; UZUN, O.; RAAD, I.; PINZCOWSKI, H.; VARTIVARIAN, S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. **Clin. Infect. Dis.**, 24: 1122-1128, 1997.

ABRAHAMSEN, T. G.; WIDING, E.; GLOMSTEIN, A.; GAUSTAD, P. Disseminated fungal disease resistant to fluconazole treatment in child with leukemia. **Scand. J. Infect. Dis.**, 24: 391-393, 1992.

ALVES, S. H.; DA MATTA, D. A.; AZEVEDO, A. C.; LORETO, E. S.; BOFF, E.; SANTURIO, J. M.; GUARRO, J. *In vitro* activities of new and conventional antimycotics against fluconazole-susceptible and non-susceptible Brazilian *Candida* spp. isolates. **Mycoses**, 49: 220-225, 2006.

ALONSO-VALLE, H.; ACHA, O.; GARCIA-PALOMO, J. D.; FARINAS-ALVAREZ, C.; FERNANDEZ-MAZARRASA, C.; FARINAS, M. C.. Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology and factors influencing mortality. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 22: 254-257, 2003.

ANTONIADOU, A.; TORRES, H. A.; LEWIS, R. E.; THORNB, Y. J.; BODEY, G. P.; TARRAND, J. P.; HAN, X. Y.; ROLSTON, K. V.; SAFDAR, A.; RAAD, I. I.; KONTOYIANNIS, D. P. Candidemia in a tertiary care cancer center: *in vitro* susceptibility and its association with outcome of initial antifungal therapy. **Medicine**, 82: 309-321, 2003.

ARENDRUP, M. C.; GARCIA-EFFRON, G.; BUZINA, W.; MORTENSEN, K. L.; REITER, N.; LUNDIN, C.; JENSEN, H. E.; LASS-FLORL, C.; PERLIN, D. S.; BRUUN, B. Breakthrough *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* double infection during caspofungin treatment: laboratory characteristics and implications for susceptibility testing. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 53: 1185-1193, 2009.

ARIF, S.; BARKHAM, T.; POWER, E. G.; HOWELL, S. H. Techniques for investigation of an apparent outbreak of infection with *Candida glabrata*. **J. Clin. Microbiol.**, 34: 2205-2209, 1996.

BADER, M. S.; LAI, S. M.; KUMAR, V.; HINTHORN, D. Candidemia in patients with diabetes mellitus: epidemiology and predictors of mortality. **Scand. J. Infect. Dis.**, 36: 860-864, 2004.

BARNS, S. M.; LANE, D. J.; SOGIN, M. L.; BIBEAU, C.; WEISBURG, W. G. Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. **J. Bacteriol.**, 173: 2250- 2255, 1991.

BAIXENCH, M. T.; AOUN, N.; DESNOS-OLLIVIER, M.; GARCIA-HERMOSS, D.; BRETAGNE, S.; RAMIRES, S.; PIKETTY, C.; DANNAOUI, E. Acquired resistance to echinocandins in *Candida albicans*: case report and review. **J. Antimicrob. Chemother.**, 59: 1076–1083, 2007.

BALKIS, M. M.; LEIDICH, S. D.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. Mechanisms of fungal resistance: an overview. **Drugs**, 62: 1025-1040, 2002.

BATES, D.W.; SU, L.; YU, D.T.; CHERTOW, G.M.; SEGER, D.L.; GOMES, D.R.; DASBACH, E.J.; PLATT, R. Mortality and costs of acute renal failure associated with amphotericin B therapy. **Clin. Infect. Dis.**, 32: 686-693, 2001.

BAUMGARTNER, C.; FREYDIERE, A. M.; GILLE, Y. Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using Albicans ID and CHROMagar *Candida* plates. **J. Clin. Microbiol.**, 34: 454-456, 1996.

BEN-AMI, R.; LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS, D. P. Immunocompromised hosts: immunopharmacology of modern antifungals. **Clin. Infect. Dis.**, 47: 226-235, 2008.

BENNETT, J. E.; IZUMIKAWA, K.; MARR, K. A. Mechanism of increased fluconazole resistance in *Candida glabrata* during prophylaxis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 48: 1773-1777, 2004.

BERILA, N.; BORECKA, S.; DZUGASOVA, V.; BOJNANSKY, J.; SUBIK, J. Mutations in the CgPDR1 and CgERG11 genes in azole-resistant *Candida glabrata* clinical isolates from Slovakia. **Int. J. Antimicrob. Agents**, 33: 574-578, 2009.

BIALKOVÁ, A; ŠUBIK, J. Biology of the Pathogenic Yeast *Candida glabrata*. **Folia Microbiol.**, 51: 3–20, 2006.

BODEY, G. P.; MARDANI, M.; HANNA, H. A.; BOKTOUR, M.; ABBAS, J.; GIRGAWY, E.; HACHEM, R. Y.; KONTOYIANNIS, D. P.; RAAD, I. The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* fungemia in immunocompromised patients with cancer. **Am. J. Med.**, 112: 380-385, 2002.

BOFF, E.; LOPES, P. G.; SPADER, T.; SCHEID, L. A.; LORETO, E.; FRASSON, N.; DAL FORNO, 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. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 41: 36-40, 2008.

BORG-VON ZEPELIN, M.; ZASCHKE, K.; GROSS, U.; MONOD, M.; MÜLLER, F. M. Effect of micafungin (FK463) on *Candida albicans* adherence to epithelial cells. **Chemotherapy**, 48: 148–153, 2002.

BORMANN, A. M.; MORRISON, V. A. Review of the pharmacology and clinical studies of micafungin. **Drug. Des. Devel. Ther.**, 3: 295–302, 2009.

BOUCHARA, R. A.; DECLERCK, P.; CIMON, B.; PLANCHENAUT, C.; DE GENTILE, L.; CHABASSE, D. Routine use of CHROMagar *Candida* medium for presumptive identification of *Candida* yeast species and detection of mixed fungal populations. **Clin. Microbiol. Infectol.**, 2: 202-208, 1996.

BOWMAN, J. C.; HICKS, P. S.; KURTZ, M. B.; ROSEN, H.; SCHMATZ, D. M.; LIBERATOR, P. A.; DOUGLAS, C. M. The antifungal echinocandin caspofungin acetate kills growing cells of *Aspergillus fumigatus* *in vitro*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 46: 3001-3012, 2002.

BRANCH, R. A. Prevention of amphotericin B-induced renal impairment: A review on the use of sodium supplementation. **Arch. Intern. Med.**, 148: 2389-2394, 1988.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Discrimination between *Candida albicans* and other pathogenic species of the genus *Candida* by their differential sensitivities to toxins of a panel of killer yeasts. **J. Clin. Microbiol.**, 39: 3362-3364, 2001.

CAPPELLETY, D.; EISELSTEIN-McKITRICK, K. The echinocandins. **Pharmacotherapy**, 27: 369-388, 2007.

CARDONA-CASTRO, N.; REVANKAR, G.; ORTIZ, P.; CUERVO, C.; KIRKPATRIK, W. R.; MCATEE, R. K.; PATTERSON, T. F. Proteinase detection, DNA typing and antimycotic susceptibility of *Candida* isolates from colombian women with vulvovaginal candidiasis. **Rev. Iberoam. Micol.**, 19: 89-94, 2002.

CATALÁN, M.; MONTEJO, J. C. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. **Rev. Iberoam. Micol.**, 23: 39-49, 2006.

CATEAU, E.; RODIER, M. H.; IMBERT, C. *In vitro* efficacies of caspofungin or micafungin catheter lock solutions on *Candida albicans* biofilm growth. **J. Antimicrob. Chemother.**, 62: 153-155, 2008.

CHAVES, G.M.; CAVALVANTI, M. A. Q.; PORTO, A. L. F. Pathogenicity characteristics of stocked and fresh yeast strains. **Braz. J. Microbiol.**, 34: 197-202, 2003.

CHEN, X. J.; CLARK-WALKER, G.D. The petite mutation in yeasts: 50 years on. **Internat. Rev. Cytol.** 194: 197–238, 2000.

CHIOU, C. C.; MAVROGIORGOS, N.; TILLEM, E.; HECTOR, R.; WALSH, T. J. Synergy, pharmacodynamics, and time-sequenced ultrastructural changes of the interaction between nikkomycin Z and the echinocandin FK463 against *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 45: 3310-3321, 2001.

CLEARY, J. D.; GARCIA-EFFRON, G.; CHAPMAN, S. W.; PERLIN, D. S. Reduced *Candida glabrata* susceptibility secondary to a FKS1 mutation developed during candidemia treatment. **Antmicrob. Agents Chemother.**, 52: 2263-2265, 2008.

CLINICAL LABORATORY AND STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing yeasts 3rd ed. Approved standard M27-A3. Wayne, PA, 2008a.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing yeasts 3rd ed. Approved standard M27-S3. Clinical Laboratory and Standards Institute. Wayne, PA, 2008b.

COHEN-WOLKWIEZ, M.; BENJAMIN, D. K. JR.; STEINBACK, W.J.; SMITH, P. B. Anidulafungin: a new echinocandin for the treatment of fungal infections. **Drugs Today**, 42: 533-544, 2006.

COIGNARD, C.; HURST, S. F.; BENJAMIN, L. E.; BRANDT, M. E.; WARNOCK, D. W.; MORRISON, C. J. Resolution of discrepant results for *Candida* species identification by using DNA probes. **J. Clin. Microbiol.**, 42: 858-861, 2003.

COLLIN, B.; CLANCY, C. J.; NGUYEN, M. H. Antifungal resistance in non-*albicans* *Candida* species. **Drug Resist. Updat.**, 2: 9-14, 1999.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**; 36: 599-607, 2003.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, A. S.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **J. Clin. Microbiol.**, 44: 2816-2823, 2006.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L. R.; DE ALMEIDA MONFARDINI, L. P.; CUNHA, A. K.; RADY, P.; ALVES, T.; ROSAS, R. C. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infect. Contr. Hosp. Epidem.**, 28: 570-576, 2007.

CSANK, C.; HAYNES, K. *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. **FEMS. Microbiol. Lett.** 189: 115-120, 2000.

DAN, M.; SEGAL, R.; MARDER, V.; LEIBOVITZ, A. *Candida* colonization of the vagina in elderly residents of a long-term-care hospital. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 25: 394-396, 2006.

DEBONO, M.; TURNER, W.W.; LaGRANDEUR, L.; BURKHARDT, F. J.; NISSEN, J. S.; NICHOLS, K. K.; RODRIGUEZ, M. J.; ZWEIFEL, M. J.; ZECKNER, D. J.; GORDEE, R. S.; et al. Semisynthetic chemical modification of the antifungal lipopeptide echinocandin B (ECB): structure-activity studies of the lipophilic and geometric parameters of polyarylated acyl analogs of ECB. **J. Med.Chem.** 38: 3271-3281, 1995.

DEFONTAINE, A.; BOUCHARA, J. P.; DECLERC, P.; PLANCHENAULT, C.; CHABASSE, D.; HALLET, J. N. In-vitro resistance to azoles associated with mitochondrial deficiency in *Candida glabrata*. **J. Med. Microbiol.** 48: 663-670, 1999.

DENNING, D. W.; BAILY, G. G.; HOOD, S. V. Azole resistance in *Candida*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 16: 261-280, 1997.

DENNING, D. W. Echinocandin antifungal drugs. **Lancet.**, 362: 1142-1151, 2003.

DERESINSKI, S.C.; STEVENS, D.A. Caspofungin. **Clin. Infect. Dis.**, 36: 1445-1457, 2003.

DIEKEMA DJ, MESSER SA, BRUEGGEMANN AB, COFFMAN SL, DOERN GV, HERWALDT LA, PFALLER MA. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. **J. Clin. Microbiol.**, 40: 1298–1302, 2002.

DIEKEMA, D.J.; MESSER, A.S.; HOLLIS, R.J.; JONES, R.N.; PFALLER, M.A. Activities of caspofungin, itraconazole, posaconazole, ravuconazole, voriconazole, and amphotericin B against 448 recent clinical isolates of filamentous fungi. **J. Clin. Microbiol.**, 41: 3623-3626, 2003.

DRAGO, M.; SCALTRITO, M. M.; MORACE, G. In vitro activity of voriconazole and other antifungal agents against clinical isolates of *Candida glabrata* and *Candida krusei*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 23: 619-624, 2004.

DODDS ASHLEY, E.S.; LEWIS, R.; LEWIS, J.S.; MARTIN, C.; ANDES, D. Pharmacology of systemic antifungal agents. **Clin. Infect. Dis.**, 43: 28-39, 2006.

DOWELL, J.A.; KNEBEL, W.; LUDDEN, T.; STOGNIEW, M.; KRAUSE, D.; HENKEL, T. Population pharmacokinetic analysis of anidulafungin, an echinocandin antifungal. **J. Clin. Pharmacol.**, 44: 590-598, 2004.

DOWELL, J. A.; STOGNIEW, M.; KRAUSE, D.; HENKEL, T.; WESTON, I.E. Assessment of the safety and pharmacokinetics of anidulafungin when administered with eyelosporine. **J. Clin. Pharmacol.**, 45: 227-233, 2005.

DOWELL, J. A.; STOGNIEW, M.; KRAUSE, D.; DAMLE, B. Anidulafungin does not require dosage adjustment in subjects with varying degrees of hepatic or renal impairment. **J. Clin. Pharmacol.**, 47: 461-470, 2007.

DUJON, B. et al. Genome evolution in yeasts. **Nature**, 430: 35-44, 2004.

DUPONT, B. Overview of the lipid formulation of amphotericin B. **J. Antimicrob. Chemother.**, 49: 31-36, 2002.

ELIE, C. M.; LOTT, T. J.; REISS, E.; MORRISON, C. J. Rapid identification of *Candida* species with species-specific DNA probes. **J. Clin. Microb.**, 36: 3260-3265, 1999.

ESPINEL-INGROFF, A. Comparison of *in vitro* activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK- 0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. **J. Clin. Microbiol.**, 36: 2950-2956, 1998.

ESPINEL-INGROFF, A. *In vitro* antifungal activities of anidulafungin, micafungin, licensed agents and the investigative triazole posaconazole as determined by NCCLS methods for 12,052 fungal isolates: review of the literature. **Rev. Iberoam. Micol.**, 20: 121-136, 2003.

ESPINEL-INGROFF, A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; IQBAL, N.; ELLIS, D.; PFALLER, M. A.; MESSER, S.; RINALDI, M.; FOTHERGILL, A.; GIBBS, D. L.; WANG, A. Muticenter evaluation of a new disk agar diffusion method for susceptibility testing of filamentous fungi with voriconazole, posaconazole, itraconazole, amphotericin B and caspofungin. **J. Clin. Microbiol.**, 45: 1811-1820, 2007.

ESTES, K. E.; PENZAK, S. R.; CALIS, K. A.; WALSH, T. J. Pharmacology and antifungal properties of anidulafungin, a new echinocandin. **Pharmacotherapy.**, 29: 17-30, 2009.

FEKETE-FORGÁCS, K.; GYURC, L.; LENKEY, B. Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. **Mycoses**, 43: 273-279, 2000.

FERRAZA, M. H. S. H.; MALUF, M. L. F.; CONSOLARO, M. E. L.; SHINOBU, C. S.; SVIDZINSKI, T. I. E.; BATISTA, M. R. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. **Rev. Brasil. Gineco. Obst.**, 27: 58-63, 2005.

FIDEL, P.L. JR; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL J. D. *Candida glabrata*: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans*. **Clinical Microbiol. Rev.**, 12: 80-96, 1999.

GARCIA-EFFRON, G.; KATIYAR, S. K.; PARK, S.; EDLIND, T. D.; PERLIN, D. S. Anaturally occurring Fks1p proline to alanine aminoacid change in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 52: 2305-2312, 2008a.

GARCIA-EFFRON, G.; KONTOYIANNIS, D.; LEWIS, R. E.; PERLIN, D. S. Caspofungin resistant *Candida tropicalis* strains causing breakthrough fungemia in patients at high risk for hematologic malignancies. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 52: 4181-4183, 2008b.

GARCIA-EFFRON, G.; LEE, S.; PARK, S.; CLEARY, J. D.; PERLIN, D. S. Effect of *Candida glabrata* FKS1 and FKS2 mutations on echinocandin sensitivity and kinetics of 1,3- β -D-glucan synthase: implication for the existingsusceptibility breakpoint. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 53: 3690–3699, 2009a.

GARCIA-EFFRON, G.; PARK, S.; PERLIN, D. S. Correlating echinocandin MIC and kinetic inhibition of fks1 mutant glucan synthase for *Candida albicans*: implications for interpretive breakpoints. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 53: 112–122, 2009b.

GARCIA-EFFRON, G.; CHUA, D. J.; TOMADA, J. R.; DIPERSIO, J.; PERLIN, D. A.; GHANNOUM, M.; BONILLA, H. Novel FKS mutations associated with echinocandin resistance in *Candida* species. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 54: 2225–2227, 2010.

GAREY, K. W.; REGE, M.; PAI, M. P.; MINGO, D. E.; SUDA, K. J.; TURPIN, R. S.; BEARDEN, D. T. Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. **Clin. Infect. Dis.**, 43: 25-31, 2006.

GARNACHO-MONTERO, J.; DÍAZ-MARTÍN, A.; GARCÍA-CABRERA, E.; PIPAON, M. R.; HERNÁNDEZ-CABALLERO, C.; AZNAR-MARTÍN, J.; CISNEROS, J. M.; ORTIZ-LEYBA, C. Risk factors for fluconazole-resistant candidemia. **J. Antimicrob. Chemother.**, 54: 3149–3154, 2010.

GAUR, M.; CHOUDHURY, D.; PRASAD, R. Complete inventory of ABC proteins in human pathogenic yeast *Candida albicans*. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, 9: 3-15. 2005

GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clin. Microbiol. Rev.**, 13: 122–143, 2000.

GROLL, A. H. Clinical pharmacology of systemic antifungal agents: a comprehensive review of agents inclinal use, current investigation compounds, and putative targets for antifungal drug development. **Adv. Pharm.**, 44: 343-500, 1998.

GUBBINS, P.O.; ANAISSIE, E. Overview of antifungal agents. **Infect. Dis. Spec. Edit.**, 5: 65–70, 2002.

GUMBO, T.; ISADA, C. M.; HALL, G. *Candida glabrata* fungemia: Clinical features of 139 patients. **Medicine**, 78: 220–227, 1999.

GUPTA, A. K.; KOHU, Y.; BATRA, R. *In vitro* activities of posaconazole, ravuconazole, terbinafine, itraconazole and fluconazole against dermatophyte, yeast and non-dermatophyte species. **Med. Mycology**, 43: 179–185, 2005.

HAIJEH, R. A.; SOFAIR, A. N.; HARRISON, L. H.; LYON, G. M.; ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; MIRZA, S. A.; PHELAN, M.; MORGAN, J.; LEE-YANG, W.; CIBLAK, M. A.; BRANDT, M. E.; WARNOCK, D. W. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and *in vitro* susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. **J. Clin. Microbiol.**, 42: 1519-1527, 2004.

HAYNES, K. Virulence in *Candida* species. **Trends Microbiol.**, 9: 591-596, 2001.

HAZEN, K. C. New and emergent yeast pathogens. **Clin. Microbiol. Rev.**, 8: 462-478, 1995.

HENRY, K.W.; NICKELS, J. T.; EDLIND, T. D. Upregulation of ERG genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. **Antimicrob. Agents Chemother.** 44: 2693–2700, 2000.

HERNANDEZ, S.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; NAJVAR, L.K.; MCCARTHY, D. I.; BOCANEGRA, R.; GRAYBILL, J. R. Caspofungin resistance in *Candida albicans*: correlating clinical outcome with laboratory susceptibility testing of three isogenic isolates serially obtained from a patient with progressive *Candida* esophagitis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 48: 1382-1383, 2004.

JEU, L.; PIACENTI, F. J.; LYAKHOVETSKIY, A. G.; FUNG, H. B. Voriconazole. **Clin. Ther.**, 25: 1321-1381, 2003.

JOKLIK, W.K.; WILLETT, H.P.; AMOS, D.B.; WILFERT, C.M. **Zinsser Microbiologia**. 20^aed. Buenos Aires: Editora Panamericana, 1995.

JOHNSON, L. B.; KAUFFMAN, C. A. Voriconazole: a new triazole antifungal agent. **Clin. Infect. Dis.**, 36: 630–637, 2003.

KAHN, J. N.; HSU, M. J.; RACINE, F.; GIACOBBE, R.; MOTYL, M. Caspofungin susceptibility in *Aspergillus* and non-*Aspergillus* molds: inhibition of glucan synthase and reduction of beta-d-1,3 glucan levels in culture. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 50: 2214-2216, 2006.

KAMIYA, A.; KIKUCHI, A.; TOMITA, Y.; KANBE, T. Epidemiological study of *Candida* species in cutaneous candidiasis based on PCR using primer mix specific for the DNA topoisomerase II gene. **J. Dermatol. Sci.**, 37: 21-28, 2005.

KANTARCIOGLU, A. S.; YUCEL, A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. **Mycoses**, 45: 160-165, 2002.

KAO, A. S.; BRANDT, M. E.; PRUITT, W. R.; CONN, L. A.; PERKINS, B. A. STEPHENS, D. S.; BAUGHMAN, W. S.; REINGOLD, A. L.; ROTHROCK, G. A.; PFALLER, M. A.; PINNER, R. W.; HAJJEH, R. A. The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. **Clin. Infect. Dis.**, 29: 1164-1170, 1999.

KARTSONIS, N. A.; NIELSON, J.; DOUGLAS, C. M. Caspofungin: the first in a new class of antifungal agents. **Drug. Resist. Update.**, 6: 197-218, 2003.

KATIYAR, S.; PFALLER, M.; EDLIND, T. *Candida albicans* and *Candida glabrata* clinical isolates exhibiting echinocandin susceptibility. **Antimicrob. Agentes Chemother.**, 50: 2892-2894, 2006.

KAUFFMAN, C. A.; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D. Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. **Clin. Infect. Dis.**, 20: 14-18, 2000.

KELLY, S. L.; LAMB, D. C.; CORRAN, A. J.; BALDWIN, B. C.; KELLY, D. E. Mode of action and resistance to azole antifungals associated with formation of 14 α -methylergosta-8,24(28)-dien-3 α ,6 α -diol. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 207: 910-915, 1995.

KOMSHIAN, S. V.; UWAYDAH, A. K.; SOBEL, J. D. Fungemia caused by *Candida* species and *Torulopsis glabrata* in the hospitalized patient: frequency, characteristics, and evaluation of factors influencing outcome. **Rev. Infect. Dis.**, 11: 379-390, 1989.

KONDOH, O.; TACHIBANA, Y.; OHYA, Y.; ARISAWA, M.; WATANABE, T. Cloning of the RHO1 gene from *Candida albicans* and its regulation of 1,3- β -D-glucan synthase. **J. Bacteriol.**, 179: 7734-7741, 1997.

KONTOYANNIS, D. P. Modulation of fluconazole sensitivity by the interaction of mitochondria and Erg3p in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Antimicrob. Chemother.**, 46: 191-197, 2000.

KONTOYIANNIS, D. P.; RATANATHARATHORN, V.; YOUNG, J. A.; RAYMOND, J.; LAVERDIÈRE, M.; DENNING, D. W.; PATTERSON, T. F.; FACKLAM, D.; KOVANDA, L.; ARNOLD, L.; LAU, W.; BUELL, D.; MARR, K. A. Micafungin alone or in combination with other systemic antifungal therapies in hematopoietic stem cell transplant recipients with invasive aspergillosis. **Transpl. Infect. Dis.**, 11: 89-93, 2009.

KRAUSE, D. S.; SIMJEE, A. E.; VAN RENSBURG, C.; VILJOEN, J.; WALSH, T. J.; GOLDSTEIN, B. P.; WIBLE, M.; HENKEL, T. A randomized, double-blind trial of anidulafungin versus fluconazole for the treatment of esophageal candidiasis. **Clin. Infect. Dis.**, 39: 770-775, 2004.

KROGH-MADSEN, M.; ARENDRUP, M. C.; HESLET, L.; KNUDSEN, J. D. Amphotericin B and caspofungin resistance in *Candida glabrata* isolates recovered from a critically ill patient. **Clin. Infect. Dis.**, 42: 938-944, 2006.

KREMERY, V.; BARNES, A. J. Non-*albicans* *Candida* spp. Causing fungemia: pathogenicity and antifungal resistance. **J. Hosp. Infect.**, 50: 243-260, 2002.

KUHN, D. M.; GEORGE, T.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 46: 1773-1780, 2002.

KULLBERG, B. J.; SOBEL, J. D.; RUHNKE, M.; PAPPAS, P. G.; VISCOLI, C.; REX, J. H.; CLEARY, J. D.; RUBINSTEIN, E.; CHURCH, L. W.; BROWN, J. M.; SCHLAMM, H. T.; OBORSKA, I. T.; HILTON, F.; HODGES, M. R. Voriconazole versus a regimen of amphotericin B followed by fluconazole for Candidaemia in non-neutropenic patients: a randomised non-inferiority trial. **Lancet.**, 366: 1435-1442, 2005.

KURIYAMA, T.; WILLIAMS, D. W.; BUGG, J.; COULTER, W. A.; READY, D.; LEWIS, M. A. O. *In vitro* susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal agents. **Oral Microbiol. Immunol.**, 20: 349-353, 2005.

KUSE, E. R.; CHETCHOTISAKD, P.; DA CUNHA, C. A.; RUHNKE, M.; BARRIOS, C.; RAGHUNADHARAO, D.; SEKHON, J. S.; FREIRE, A.; RAMASUBRAMANIAN, V.; DEMEYER, I.; NUCCI, M.; LEELARASAMEE, A.; JACOBS, F.; DECRUYENAERE, J.; PITTET, D.; ULLMANN, A. J.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; LORTHOLARY, O.; KOBLINGER, S.; DIEKMANN-BERNDT, H.; CORNELLY, O. A. Micafungin versus liposomal amphotericin B for Candidaemia and invasive candidosis: a phase III randomised double-blind trial. **Lancet.**, 369: 1519-1527, 2007.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINZ_VACCARI, E. M.; MELO, N. T. Tratado de micologia médica. São Paulo, 9ªed., p.123-169, 252-340, 616-635. Sarvier, 2002.

LEWIS, R. E. Overview of the changing epidemiology of candidemia. **Curr. Med. Res. Opin.**, 25: 1732-1740, 2009.

LIGORI, G.; LUCARIELLO, A.; COLELLA, G.; LUCA, A.; MARINELI, P. Rapid identification of *Candida* species in oral solution by PCR. **J. Clin. Pathol.**, 60: 1035-1039, 2007.

LO, H. J.; WANG, J. S.; LIN, C. Y.; CHEN, C. G.; HSIAO, T. Y.; HSU, C. T.; SU, C. L.; FANN, M. J.; CHING, Y. T.; YANG, Y. L. Efg1 involved in drug resistance by regulating the expression of ERG3 in *Candida albicans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 49: 1213-1215, 2005.

LUPETTI, A.; GUZZI, G.; PALADINE, A.; SWART, K.; CAMPA, M.; SENESI, S. Molecular typing of *Candida albicans* in oral candidiasis: karyotype epidemiology with human immunodeficiency virus-seropositive patients in comparison with that with healthy carries. **J. Clin. Microbiol.**, 33: 1238-1242, 1995.

LYON, G. M.; KARATELA, S.; SUNAY, S.; ADIRI, Y. Antifungal susceptibility testing of *Candida* isolates from the *Candida* surveillance study. **J. Clin. Microbiol.**, 48: 1270-1275, 2010.

MAERTENS, J.A. History of the development of azole derivatives. **Clin. Microbiol. Infect.**, 10: 1-10, 2004.

MALANI A, HMOUD J, CHIU L, CARVER PL, BIELACZYK A, KAUFFMAN CA. *Candida glabrata* fungemia: experience in a tertiary care center. **Clin. Infect. Dis.**, 41: 975-81, 2005.

MANN, P. A.; MCNICHOLAS, P. M.; CHAU, A. S.; PATEL, R.; MENDRICK, C.; ULLMANN, A. J.; CORNELLY, O. A.; PATINO, H.; BLACK, T. A. Impact of antifungal prophylaxis on colonization and azole susceptibility of *Candida* species. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 53: 5026-5034, 2009.

MARR, K. A.; SEIDEL, K.; WHITE, T. C.; BOWDEN, R. A. Candidemia in allogeneic blood and marrow transplant recipients: evolution of risk factors after the adoption of prophylactic fluconazole. **J. Infect. Dis.**, 181: 309-316, 2000.

MARICHAL, P.; VAN DEN BOSSCHE, H.; ODDS, F. C.; NOBELS, G.; WARNOCK, D. W.; TIMMERMAN, V.; VAN BROECKHOVEN, C.; FAY, S.; MOSE-LARSEN, P. Molecular biological characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 41: 2229–2237, 1997.

MASSONET, C.; VAN ELDERE, J.; VANEECHOUTTE, M.; DE BAERE, T.; VERHAEGEN, J.; LAGROU, K. Comparison of Vitek 2 with ITS2-fragment length polymorphism analysis for identification of yeast species. **J. Clin. Microbiol.**, 42: 2209–2211, 2004.

MESSER, S. A.; DIEKEMA, D. J.; BOYKEN, L.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R. J.; PFALLER, M. A. Activities of micafungin against 315 invasive clinical isolates of fluconazole resistant *Candida* spp.. **J. Clin. Microbiol.**, 44: 324–326, 2006.

MESSERY, S. A.; MOET, G. J.; KIRB, J. T.; JONES, R. N. Activity of contemporary antifungal agents, including the novel echinocandin anidulafungin, tested against *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and *Aspergillus* spp.: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006 to 2007). **J. Clin. Microbiol.**, 47: 1942–1946, 2009.

MINARI A, HACHEM R, RAAD I. *Candida lusitanae*: a cause of breakthrough fungemia in cancer patients. **Clin. Infect. Dis.**, 32: 186–190, 2001.

MIYAZAKI, H.; MIYAZAKI, Y.; GEBER, A.; PARKINSON, T.; HITCHCOCK, C. H.; FALKONER, D. J.; WARD, D. J.; MARDSEN, K.; BENNET, J. E. Fluconazole resistance associated with drug efflux and increased transcription of a drug transporter gene, PDH1, in *Candida glabrata*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 42: 1695–1701, 1998.

MORA-DUARTE, J.; BETTS, R.; ROTSTEIN, C.; COLOMBO, A. L.; THOMPSON-MOYA, L.; SMIETANA, J.; LUPINACCI, R.; SABLE, C.; KARTSONIS, N.; PERFECT, J. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. **N. Engl. J. Med.**, 347: 2020-2029, 2002.

MORACE, G.; BORGHI, E.; IATTA, R.; MONTAGNA, M. T. Anidulafungin, a New Echinocandin. **Drugs** 69: 91-94, 2009.

MORRELL, M.; FRASER, J.; KOLLEF, M. H. Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 49: 3640-3645, 2005.

MOUDGAL, V.; LITTLE, T.; BOIKOV, D.; VAZQUEZ, J. A. Multiechinocandin- and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 49: 767-769, 2005.

MUKHERJEE, P. K.; SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; GHANNOUM, M. A. Combination Treatment of Invasive Fungal Infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, 18: 163-194, 2005.

NAKAYAMA, H.; NAKAYAMA, N.; ARISAWA, M.; AOKI, Y. *In vitro* and *in vivo* effects of 1 α -demethylase (ERG11) depletion in *Candida glabrata*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 45: 3037-3045, 2001.

NAKAI, T.; UNO, J.; OTOMO, K.; IKEDA, F.; TAWARA, S.; GOTO, T.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. *In vitro* activity of FK463, a novel lipopeptide antifungal agent, against a variety of clinically important molds. **Chemotherapy.**, 48: 78-81, 2002.

NGUYEN MH, CLANCY CJ, YU VL, YU YC, MORRIS AJ, SNYDMAN DR, SUTTON DA, RINALDI MG. Do *in vitro* susceptibility data predict the microbiologic response to amphotericin B? Results of a prospective study of patients with *Candida* fungemia. **J. Infect. Dis.**, 177: 425-430, 1998.

NISHIYAMA, Y.; UCHIDA, K.; YAMAGUCHI, H. Morphological changes of *Candida albicans* induced by micafungin (FK463), a water-soluble echinocandin-like lipopeptide. **J. Electron. Microsc.** (Tokyo), 51: 247-255, 2002.

ODABASI, Z.; PAETZNICK, V. L.; RODRIGUEZ, J. R.; CHEN, E.; OSTROSKY-ZEICHNER, L. *In vitro* activity of anidulafungin against selected clinically important mold isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 48: 1912-1915, 2004.

ODDS, F. C.; RINALDI, M. G.; COOPER, J. R.; FOTHERGILL, A.; PASARELL, L.; CGINNIS, M. R. *Candida* and *Torulopsis*: a blinded evaluation of use of pseudohypha formation as basis for identification of medically important yeasts. **J. Clin. Microbiol.**, 35: 313-316, 1997.

OLSON, J. A.; ADLER-MOORE, J. P.; SMITH, P. J.; PROFFITT, R. T. Treatment of *Candida glabrata* infection in immunosuppressed mice by using a combination of liposomal amphotericin B with caspofungin or micafungin. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 49: 4895-4902, 2005.

ONYEWU, C.; BLANKENSHIP, J. R.; DEL POETA, M.; HEITMAN, J. Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida krusei*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 47: 956-964, 2003.

OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REX, J. H.; PAPPAS, P. G.; HAMILL, R. J.; LARSON, R. A.; HOROWITZ, H. W.; POWDERLY, W. G.; HYSLOP, N.; KAUFFMAN, C. A.; CLEARY, J.; MARGINO, J. E.; LEE, J. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 47: 3149–3154, 2003.

PAPPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D.; BENJAMIN JR, D. K.; CALANDRA, T. F.; EDWARDS JR., J. E.; FILLER, S. G.; FISHER, J. F.; KULLBERG, B. J.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI, A. C.; REX, J. H.; WALSH, T. J.; SOBEL, J. D. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Dis.**, 48: 503-535, 2009.

PARK, S.; KELLY, R.; KAHN, J. N.; ROBLES, J.; HSU, M. J.; REGISTER, E.; LI, W.; VYAS, V.; FAN, H.; ABRUZZO, G.; FLATTERY, A.; GILL, C.; CHREBET, G.; PARENT, S. A.; KURTZ, M.; TEPLER, H.; DOUGLAS, C. M.; PERLIN, D. S. Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* spp. isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 49: 3264–3273, 2005.

PASTOR, F. J.; GUARRO, J. Micafungina en el tratamiento de la infección fúngica en modelos animales. **Rev. Iberoam. Micol.**, 26: 42-48, 2009.

PATTON, L. L.; BONITO, A. J.; SHUGARS, D. A. A systematic review of the effectiveness of antifungal drugs for the prevention and treatment of oropharyngeal candidiasis in HIV-positive patients. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, 92: 170-179, 2001.

PERLIN, D. S. Resistance to echinocandin class antifungal drugs. **Drug Resist. Updates.**, 10: 121-130, 2007.

PERLIN, D. S. Antifungal drug resistance: do molecular methods provide a way forward? **Curr. Opin. Infect. Dis.**, 22: 568–573, 2009.

PEYRON, F.; FAVEL, A.; CALAF, R.; MICHEL-NGUYEN, A.; BONALY, R.; COULON, J. Sterol and fatty acid composition of *Candida lusitanae* clinical isolates. **J. Antimicrob. Chemother.**, 46: 531–533, 2002.

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

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; BOYKEN, L.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R. J.; DIEKEMA, D. J. Variation in susceptibility of bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole according to patient age and geographic location. **J. Clin. Microbiol.**, 41: 2176-2179, 2003.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. **Clin. Microbiol. Infect.**, 10: 11-23, 2004a.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; BOYKEN, L.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R. J.; DIEKEMA, D. J. Geographic variation in the susceptibilities of invasive isolates of *Candida glabrata* to seven systemically active antifungal agents: a global assessment from the ARTEMIS Antifungal Surveillance Program conducted in 2001 and 2002. **J. Clin. Microbiol.**, 42: 3142-3146, 2004b.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; BOYKEN, L.; RICE, C.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R. J.; DIEKEMA, D. J. Cross-Resistance between fluconazole and ravuconazole and the use of fluconazole as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to ravuconazole among 12,796 clinical isolates of *Candida* spp. **J. Clin. Microbiol.**, 42: 3137-3141, 2004c.

PFALLER, M. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D. J. Clinical evaluation of a dried commercially prepared microdilution panel for antifungal susceptibility testing of five antifungal agents against *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, 50: 113-117, 2004d.

PFALLER, M. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D. J. In vitro activities of anidulafungin against more than 2,500 clinical isolates of *Candida* spp. Including 315 isolates resistant to fluconazole. **J. Clin. Microbiol.**, 43: 5425-5427, 2005.

PFALLER, M. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D. J. Global surveillance of in vitro activity of micafungin against *Candida*: a comparison with caspofungin by CLSI recommended methods. **J. Clin. Microbiol.**, 44: 3533-3538, 2006.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. A. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin. Microbiol. Rev.**, 20: 133-163, 2007.

PFALLER, M. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; KROEGER, J.; MESSER, S. A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D. J. *In vitro* susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. **J. Clin. Microbiol.**, 46: 150–156, 2008a.

PFALLER, M.A. ; DIEKEMA, D.J. ; OSTROSKY- ZEICHNER, L. ; et al. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against caspofungin, anidulafungin, and micafungin: analysis and proposal for interpretive MIC breakpoints. **J. Clin. Microbiol.**, 46: 2620-2629, 2008b.

PFALLER, M. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; KROEGER, J.; MESSER, S. A.; TENDOLKAR, S.; JONES, R. N.; TURNIDGE, J.; DIEKEMA, D. J. Wild type MIC distributions and epidemiological cutoff values for the echinocandins and *Candida* spp.. **J. Clin. Microbiol.**, 48: 52–56, 2010a.

PFALLER, M. A.; CASTANHEIRA, M.; DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; MOET, G. J.; JONES, R. N. Comparison of EUCAST and Etest methods with the CLSI broth microdilution method for echinocandin susceptibility testing of *Candida* species. **J. Clin. Microbiol.**, 48: 1592–1599, 2010b.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D. J.; ANDES, D.; ARENDRUP, M.C.; DRWND, S. D.; LOCKHARTE, S. R.; MOTYL, M.; PERLIN, D. S.; THE CLSI SUBCOMMITTEE FOR ANTIFUNGAL TESTING. Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: Integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. **Drug Resist. Updat.**, 14: 164- 176, 2011.

PFEIFFER, C. D.; GARCIA-EFFRON, G.; ZAAS, A. K.; PERFECT, J. R.; PERLIN, S. D.; ALEXANDER, B. D. Breakthrough invasive candidiasis on micafungin. **J. Clin. Microbiol.**, 48: 2373-2380, 2010.

PIENS, M. A.; PERRY, J.D.; RABERIN, H.; PARANT, F.; FREYDIERE, A. M. Routine system of a one-minute trehalase and maltase test for the identification of *Candida glabrata* in four laboratories. **J. Clin. Pathol.**, 56: 687–689, 2003.

PINJON, E.; MORAN, G. P.; COLEMAN, D. C.; SULLIVAN, D. J. Azole susceptibility and resistance in *Candida dubliniensis*. **Biochem. Soc. Transact.**, 33: 1210-1214, 2005.

POSTERARO, B.; SANGUINETTI, M.; FIORI, B.; LA SORDA, M.; SPANU, T.; SANGLARD, D.; FADDA, G. Caspofungin activity against clinical isolates of azole cross-resistant *Candida glabrata* overexpressing efflux pump genes. **J. Antimicrob. Chemother.**, 58: 458-461, 2006.

POYNTON, C. H.; BARNES, R. A.; REES, J. Interferon gamma and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for the treatment of hepatosplenic candidosis in patients with acute leukemia. **Clin. Infect. Dis.**, 26: 239-240, 1998.

QUINDÓS, G.; CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; ARÉVALO, M. P.; SALGADO, J.; ALONSO-VARGAS, R.; RODRIGO, J. M.; RUESGA, M. T.; VALVERDE, A.; PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; MARTÍN-MAZUELOS, E.; PONTÓN, J. In vitro susceptibility of *Candida dubliniensis* to current and new antifungal agents. **Chemotherapy**, 46: 395-401, 2000.

QUINDÓS, G.; CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; ERASO, E.; CANTÓN, E.; PEMÁN, J. Actividad antifúngica in vitro de voriconazol: Nuevos datos después de los primeros años de experiencia clínica. **Rev. Iberoam. Micol.**, 24: 198-209, 2007.

REX, J. H.; BENNETT, J. E.; SUGAR, A. M.; PAPPAS, P. G.; VAN DER HORST, C. M.; EDWARDS, J. E.; WASHBURN, R. G.; SCHELD, W. M.; KARCHMER, A. W.; DINE, A. P. A randomized trial comparing fluconazole with amphotericin B for the treatment of candidemia in patients without neutropenia. **N. Engl. J. Med.**, 331: 1325-1330, 1994.

REX, J. H.; COOPER, C. R. JR.; MERZ, W. G.; GALGANI, J. N.; ANAISSIE, E. J. Detection of amphotericin B-resistant *Candida* isolates in a broth-based system. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 39: 906-909, 1995.

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. **Clin. Microbiol. Rev.**, 14: 643-658, 2001.

REX, J. H. et al. A randomized and blinded multicenter trial of high-dose fluconazole plus placebo versus fluconazole plus amphotericin B as therapy for candidemia and its consequences in nonneutropenic subjects. **Clin. Infect. Dis.**, 36: 1221-1228, 2003.

ROBERT, R.; NAIL, S.; MARLOT-LEBLOND, A.; COTTIN, J.; MIEGEVILLE M., QUENOILLERE, S.; MAHAZA, C.; SENET, J. M. Adherence of platelets to *Candida* species *in vivo*. **Infect. Immun.**, 68: 570-576, 2000.

RUAN, S. Y.; LEE, L. N.; JERNG, J. S.; YU, C. J.; HSUEH, P. R. *Candida glabrata* fungaemia in intensive care units. **Clin. Microbiol. Infect.**, 14: 136-140, 2008.

SÁNCHEZ-VARGAS, L. O.; PÉREZ-RIOS, P.; ROMO-GARCÍA, J.; CORONA-IZQUIERDO, F. P.; HIDALGO-LOPERENA, H.; FRANCO-MARTÍNEZ, F. Determinación de pH salival y cultivo en pacientes con candidosis bucal VIH positivos y VIH negativos. **Rev. Iberoam. Micol.**, 19: 155-160, 2002.

SANGLARD, D.; ISCHER, F.; CALABRESE, D.; MAJCHERCZYK, P. A.; BILLE, J. The ATP binding cassette transporter gene CgCDR1 from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 43: 2753-2765, 1999.

SANGLARD, D.; ISCHER, F.; BILLE J. Role of ATP-binding-cassette transporter genes in high-frequency acquisition of resistance to azole antifungals in *Candida glabrata*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 45: 1174–1183, 2001.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; FIORI, B.; RANNO, S.; TORELLI, R.; FADDA, G. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 49: 668–679, 2005.

SAWISTOWSKA-SCHRODER, E. T.; KERRIDGE, D.; PERRY, H. Echinocandin inhibition of 1,2- β -D-glucan synthase from *Candida albicans*. **FEBS Lett.**, 173: 134-138, 1984.

SCHUMAN, P.; SOBEL, J. D.; OHMIT, S. E.; MAYER, K. H.; CARPENTER, C. C.; ROMPALO, A.; DUERR, A.; SMITH, D. K.; WARREN, D.; KLEIN, R. S. Mucosal *Candidal* colonization and candidiasis in women with or at risk for human immunodeficiency virus infection. HIV Epidemiology Research Study (HERS) Group. **Clin. Infect. Dis.**, 27: 1161-1167, 1998.

SEIDLER, M.; SALVENMOSER, S.; MULLER, F. M. *In vitro* effects of micafungin against *Candida* biofilms on polystyrene and central venous catheter sections. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, 28: 568-573, 2006.

SIDRIM, J.C.; ROCHA, F. **Micologia médica a luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara, p.265-274, 2004.

SOBEL, J. D. Management of Infections Caused by *Candida glabrata*. **Curr. Infect. Dis. Report.**, 2: 424–428, 2000.

SPINOSA, H.S.; GÓRNIAK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacol. Aplic. Méd. Vet.** 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 752p.

TAMURA, N. K.; NEGRI M. F. N.; BONASSOLI, L. A.; VIDZINSKI, T. I. E. Fatores de virulência de *Candida* spp isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.**, v..40, n.1, 2007.

TANG, J.; PARR JR., T. R. W-1 solubilization and kinetics of inhibition by cilofungin of *Candida albicans* (1,3)- β -D-glucana synthase. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 35: 99-103, 1991.

THOMPSON, G. R.; WIEDERHOLD, N. P.; VALLOR, A. C.; VILLAREAL, N. C.; LEWIS, J. S.; PATTERSON, T. F. Development of caspofungin resistance following prolonged therapy for invasive candidiasis secondary to *Candida glabrata* infections. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, 52: 3783-3785, 2008.

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. **Clin. Infect. Dis.**, 35: 627-630, 2002.

TUMBARELLO, M.; SANGUINETTI, M.; TRECARICHI, E. M.; LA SORDA, M.; ROSSI, M.; DE CAROLIS, E.; DE GAETANO DONATI, K.; FADDA, G.; CAUDA, R.; POSTERARO, B. Fungaemia caused by *Candida glabrata* with reduced susceptibility to fluconazole due to altered gene expression: risk factors, antifungal treatment and outcome. **J. Antimicrob. Chemother.**, 62: 1379-1385, 2008.

URIZAR, J. M. A. Candidiasis orales. **Rev. Iberoam. Micol.**, 19: 17-21, 2002.

VANDEPUTTE, P.; TRONCHIN, G.; BERGES, T.; HENNEQUIN, C.; CHABASSE, D.; BOUCHARA, J. P. Reduced susceptibility to polyenes associated with a missense mutation in the ERG6 gene in a clinical isolate of *Candida glabrata* with pseudohyphal growth. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 51: 982-990, 2007.

VASQUEZ, J.A. The safety of anidulafungin. **Expert. Opin. Drug. Safety.**, 5: 751-758, 2006.

VERMITSKY, J. P.; EDLIND, T. D. Azole resistance in *Candida glabrata*: coordinate upregulation of multidrug transporters and evidence for a Pdr1-like transcription factor. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 48: 3773-3781, 2004.

VIUDES A, PEMAN J, CANTON E, SALAVERT M, UBEDA P, LÓPEZ-RIBOT JL, GOBERNADO M. Two cases of fungemia due to *Candida lusitaniae* and a literature review. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 21: 294–299, 2002.

YUSTES, C.; GUARRO, J. *In vitro* synergistic interaction between amphotericin B and micafungin against *Scedosporium* spp. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 49: 3498-3500, 2005.

WAGNER, C.; GRANINGER, W.; PRESTERL, E.; JOUKHADAR, C. The echinocandins: comparison of their pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical applications. **Pharmacology**, 78: 161-177, 2006.

WAHYUNINGSIH, R.; FREISLEBEN, H.; SONNTAG, H.; SCHNTZLER, P. Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. **J. Clin. Microbiol.**, 38: 3016-3021, 2000.

WARNOCK, D. W. Trends in the epidemiology of invasive fungals infections. **Jpn. J. Med. Mycol.**, 48: 1-12, 2007.

WEIG, M.; JANSCH, L.; GROSS, U.; DE KOSTER, C. G.; KLIS, F. M.; DE GROOT, P. W. Systematic identification in silico of covalently bound cell wall proteins and analysis of protein–polysaccharide linkages of the human pathogen *Candida glabrata*. **Microbiology**, 150: 3129–3144, 2004.

WEY, S. B.; MORI, M.; PFALLER, M. A.; WOOLSON, R. F.; WENZEL, R. P. Hospital-acquired candidemia. The attributable mortality and excess length of stay. **Arch. Intern. Med.**, 148: 2642-2645, 1988.

WHELAN, W. L.; SIMON, S.; BENEKE, E. S.; ROGERS, A. L. Auxotrophic variants of *Torulopsis glabrata*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 24:1–4, 1984.

WIEDERHOLD, N. P. Attenuation of echinocandin activity at elevated concentrations: a review of paradoxical effect. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, 20: 574-578, 2007.

WIEDERHOLD, N. P.; GRABINSKI, J. L.; GARCIA-EFFRON, G.; PERLIN, D. S.; LEE, S. A. Pyrosequencing to detect mutations in FKS1 that conferred reduced echinocandin susceptibility in *Candida albicans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 52: 4145–4148, 2008.

WILLINGER, B.; MANAFI, M. Evaluation of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for *Candida* species. **Mycoses**, 42: 61-65, 1999.

WILSON, G. A.; MICEK, S. T.; RITCHIE, D. J. A retrospective evaluation of fluconazole for the treatment of *Candida glabrata* fungemia. **Clin. Therap.**, 28: 1228 – 1237, 2005.

WINSTON, D. J.; PAKRASI, A.; BUSUTTIL, R. W. Prophylactic fluconazole in liver transplant recipients. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Ann. Intern. Med.**, 131: 729-737, 1999.

ZAOUTIS, T. E.; ARGON, J.; CHU, J.; BERLIN, J. A.; WALSH, T. J.; FEUDTNER, C. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. **Clin. Infect. Dis.**, 41: 1232-1239, 2005.

ZEPELIN, M. B.; KUNZ, L.; CHEL, R.R.; REICHARD, U.; WEIG, M.; GROB, U. Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. to six antifungal agents: results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August 2005. **J. Antimicrob. Chemother.**, 60: 424–428, 2007.

10 APÊNDICES

APÊNDICE A – Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) dos isolados de *Candida glabrata* sensíveis ao fluconazol (FLC) frente a voriconazol (VRC), anfotericina B (AMB), caspofungina (CSP), anidulafungina (AND) e micafungina (MCF).

Isolados	FLC	VRC	AMB	CSP	AND	MCF
Cg 01 S	2	0,5	0,125	0,125	0,031	0,015
Cg 02 S	2	0,125	0,125	0,125	0,015	0,015
Cg 03 S	4	1	0,125	0,125	0,008	0,015
Cg 04 S	4	0,5	0,125	0,125	0,031	0,008
Cg 05 S	2	0,5	0,125	0,062	0,015	0,030
Cd 06 S	2	0,125	0,25	0,125	0,015	0,015
Cg 07 S	2	0,5	0,25	0,125	0,015	0,015
Cg 08 S	2	1	0,062	0,062	0,008	0,008
Cg 09 S	8	0,062	0,062	0,062	0,031	0,008
Cg 10 S	2	0,125	0,125	0,062	0,031	0,008
Cg 11 S	4	1	0,015	0,03	0,015	0,015
Cg 12 S	4	0,5	0,062	0,125	0,031	0,008
Cg 13 S	2	0,125	0,062	0,125	0,031	0,008
Cg 14 S	8	1	0,062	0,25	0,015	0,015
Cg 15 S	4	0,5	0,062	0,25	0,015	0,015
Cg 16 S	4	2	0,125	0,25	0,015	0,015
Cg 17 S	16	1	0,125	0,125	0,031	0,015
Cg 18 S	8	2	0,125	0,062	0,031	0,015
Cg 19 S	16	0,5	0,125	0,125	0,031	0,015
Cg 20 S	4	1	0,062	0,062	0,015	0,015
Cg 21 S	32	0,125	0,062	0,25	0,031	0,015
Cg 22 S	32	4	0,062	0,25	0,031	0,015
Cg 23 S	4	0,5	0,125	0,125	0,031	0,015
Cg 24 S	32	0,125	0,125	0,125	0,031	0,008
Cg 25 S	16	0,5	0,015	0,25	0,031	0,008
Cg 26 S	32	2	0,125	0,25	0,008	0,008
Cg 27 S	16	0,125	0,062	0,125	0,008	0,008
Cg 28 S	2	0,125	0,125	0,125	0,004	0,015
Cg 29 S	4	0,125	0,125	0,25	0,015	0,008
Cg 30 S	1	0,5	0,062	0,25	0,004	0,008
Cg 31 S	2	0,062	0,125	0,25	0,008	0,008
Cg 32 S	2	0,125	0,125	0,125	0,015	0,008
Cg 33 S	1	0,5	0,125	0,015	0,015	0,015
Cg 34 S	2	0,5	0,125	0,062	0,031	0,031
Cg 35 S	2	0,5	0,125	0,015	0,031	0,015

Cg 36 S	2	0,125	0,125	0,015	0,015	0,015
---------	---	-------	-------	-------	-------	-------

Cg = *Candida glabrata*
S = isolados sensíveis ao fluconazol

APÊNDICE B – Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) dos isolados de *Candida glabrata* resistentes ao fluconazol (FLC) frente a voriconazol (VRC), anfotericina B (AMB), caspofungina (CSP), anidulafungina (AND) e micafungina (MCF).

Isolados	FLC	VRC	AMB	CSP	AND	MCF
Cg 01 R	256	8	2	0,25	0,062	0,015
Cg 02 R	128	2	2	0,25	0,031	0,008
Cg 03 R	256	128	1	0,25	0,015	0,008
Cg 04 R	64	16	1	0,5	0,062	0,008
Cg 05 R	128	8	0,5	0,125	0,062	0,008
Cd 06 R	256	4	1	0,5	0,031	0,008
Cg 07 R	128	1	0,5	0,25	0,031	0,008
Cg 08 R	128	1	1	0,25	0,015	0,002
Cg 09 R	128	2	0,25	0,5	0,015	0,008
Cg 10 R	128	2	1	0,25	0,031	0,008
Cg 11 R	128	2	0,25	0,062	0,015	0,008
Cg 12 R	64	8	1	0,5	0,062	0,015
Cg 13 R	256	8	0,25	0,5	0,031	0,008
Cg 14 R	128	16	0,5	0,25	0,031	0,008
Cg 15 R	256	4	0,25	0,125	0,015	0,008
Cg 16 R	256	16	1	0,5	0,062	0,008
Cg 17 R	128	8	2	0,062	0,031	0,008
Cg 18 R	128	16	0,125	0,25	0,031	0,008
Cg 19 R	64	2	1	0,125	0,062	0,004
Cg 20 R	128	16	2	0,062	0,031	0,004
Cg 21 R	128	2	1	0,125	0,031	0,008
Cg 22 R	256	4	0,5	0,125	0,062	0,008
Cg 23 R	128	8	1	0,125	0,031	0,008
Cg 24 R	128	2	2	0,25	0,031	0,008
Cg 25 R	256	16	0,5	0,25	0,031	0,008
Cg 26 R	256	16	2	0,5	0,031	0,004
Cg 27 R	256	64	0,5	0,25	0,062	0,008
Cg 28 R	64	8	0,5	0,125	0,062	0,015
Cg 29 R	64	4	1	0,125	0,015	0,008
Cg 30 R	256	4	0,25	0,062	0,008	0,004
Cg 31 R	256	4	1	0,125	0,031	0,008
Cg 32 R	128	4	1	0,25	0,031	0,004
Cg 33 R	256	16	1	0,25	0,031	0,015
Cg 34 R	64	4	2	0,125	0,031	0,008
Cg 35 R	64	8	2	0,125	0,031	0,015
Cg 36 R	64	8	2	0,125	0,031	0,008

Cg = *Candida glabrata*

R = isolados resistentes ao fluconazol

11 ANEXOS

11.1 Preparação dos meios de cultura

Ágar Sabouraud	
Peptona	10,00 g
Dextrose	20,00 g
Ágar bacteriológico	15,00 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Adicionar o ágar à água destilada e aquecer até solubilização completa. Adicionar os outros componentes à mistura e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Caldo Sabouraud	
Peptona	10,00 g
Dextrose	20,00 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Adicionar os componentes na água destilada e agitar com bastão de vidro até solubilização completa. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Meio RPMI 1640	
RPMI 1640 em pó (com glutamina e vermelho de fenol, sem bicarbonato)	10,40 g
MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico)	34,53 g
Dextrose	20,00 g

Dissolver o meio em pó em 900 mL de água destilada. Acrescentar o MOPS (concentração final de 0,165 mol/L) e a dextrose, agitando até dissolver. Ajustar o pH para 7,0. a 25°C, utilizando hidróxido de sódio 1 mol/L. Acrescentar água destilada adicional para completar o volume de 1000 mL. Esterilizar por filtração e armazenar a 4°C.