

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

**SUSCETIBILIDADE DE ISOLADOS DE *Candida
dubliniensis* SENSÍVEIS E RESISTENTES AO
FLUCONAZOL FRENTE A AZÓLICOS E
EQUINOCANDINAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Laíssa Arévalo Bandeira

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**SUSCETIBILIDADE DE ISOLADOS DE *Candida dubliniensis*
SENSÍVEIS E RESISTENTES AO FLUCONAZOL FRENTE A
AZÓLICOS E EQUINOCANDINAS**

Laíssa Arévalo Bandeira

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle de 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

2014

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

Bandeira, Laíssa Arévalo
Suscetibilidade de *Candida dubliniensis* sensíveis e resistentes ao Fluconazol frente a Azólicos e Equinocandinas / Laíssa Arévalo Bandeira.-2014.
86 p.; 30cm

Orientador: Sydney Hartz Alves
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2014

1. *Candida dubliniensis* 2. Resistência antifúngica 3. Fluconazol 4. Agentes antifúngicos I. Alves, Sydney Hartz II. Título.

© 2014

Todos os direitos reservados a Laíssa Arévalo Bandeira. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito da autora.

Endereço eletrônico: laissabandeira@gmail.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

**SUSCETIBILIDADE DE ISOLADOS DE *Candida dubliniensis*
SENSÍVEIS E RESISTENTES AO FLUCONAZOL FRENTE A
AZÓLICOS E EQUINOCANDINAS**

Elaborada por
Laíssa Arévalo Bandeira

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Roberto Christ Vianna Santos, Dr. (UNIFRA)

Érico Silva de Loreto, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 10 junho de 2014.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais
Carlos Orlando e Karina Bandeira
Pelo apoio, dedicação, amor e
compreensão compartilho com vocês esta conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Carlos Orlando e Karina, vocês foram sempre meu porto seguro, obrigada por terem feito tudo pelos meus sonhos e por estarem ao meu lado em todas as minhas decisões, mesmo enfrentando dificuldades. Agradeço pelo exemplo de vida, amor, carinho e ensinamentos.

A meus irmãos, Mikaela e Orlando, agradeço pelo amor, amizade, apoio, incentivo, e principalmente por estarem sempre presentes em todos os momentos de minha vida.

Ao meu namorado, por todo seu amor e principalmente apoio, por não deixar que eu desanimasse nos momentos difíceis. Por estar sempre ao meu lado e por ter feito parte de tudo isso.

Agradeço a minha família (tios, tias, primos, primas, Felipe e Carol), pelo carinho, apoio e por me proporcionarem muitos momentos de felicidade, vocês foram essenciais em todo o caminho percorrido até aqui. Em especial a minha tia, Fátima, que foi sempre muito importante em minha vida.

Ao meu orientador, Prof^o Sydney Hartz Alves, pela oportunidade e acolhida desde a iniciação científica em 2009, pela orientação, ensinamentos, por toda amizade, carinho e apoio demonstrados, que proporcionaram a realização deste trabalho.

A todos os colegas e amigos do LAPEMI, que me proporcionaram bons momentos de amizade, divertimento, companheirismo e troca de informações. Em especial agradeço a minhas eternas amigas Laura e Débora, por tudo que vivemos nesses anos e por toda a ajuda que me proporcionaram para que realizasse esse trabalho. A Larissa que ficou pouco tempo no LAPEMI, mas que tornou-se uma amiga para a vida, a qual tive a oportunidade de conviver diariamente e tornar-se uma irmã.

Agradeço a Sandra, funcionária do LAPEMI, pelo seu empenho em manter todos os materiais necessários para o funcionamento do laboratório, pela amizade e pela preocupação conosco.

A todos os meus amigos e amigas que estiveram ao meu lado durante a realização deste trabalho. Em especial a Caroline Caurio e Vinícius, com o apoio e amizade de vocês tudo tornou-se mais fácil.

Ao prof^o Janio M. Santurio, pela acolhida, ensinamentos, apoio, amizade e compreensão.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria, pela disponibilidade e informações oferecidas.

A CAPES pela bolsa de estudos, proporcionando o apoio financeiro para a realização deste trabalho.

“Tudo que o homem não conhece não existe para ele.

Por isso o mundo tem, para cada um,
o tamanho que abrange o seu conhecimento.”

(Carlos Bernardo González Pecotche)

RESUMO

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

SUSCETIBILIDADE DE ISOLADOS DE *Candida dubliniensis* SENSÍVEIS E RESISTENTES AO FLUCONAZOL FRENTE A AZÓLICOS E EQUINOCANDINAS

Autora: Laíssa Arévalo Bandeira

Orientador: Sydney Hartz Alves

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 10 de junho de 2014.

Candida spp. é o agente etiológico mais frequentemente causador de infecções fúngicas oportunistas e a espécie *Candida albicans* ainda permanece como a espécie mais frequentemente isolada nas candidíases. No entanto, a taxa de isolamentos de espécies de *Candida* não-*albicans* tem aumentado nas unidades hospitalares, onde o uso de antifúngicos azólicos de forma profilática ou terapêutica é frequente. O uso prolongado e indiscriminado dos antifúngicos tem favorecido o desenvolvimento de leveduras resistentes. Neste contexto, outras espécies emergiram como patógenos de importância clínica. *Candida dubliniensis* é uma das espécies que tornou-se relevante, por causa da facilidade com que adquire resistência ao fluconazol, podendo tornar-se um agente patogênico relativamente mais resistente e, conseqüentemente, mais difícil de tratar. Este quadro impõe que medidas de vigilância da suscetibilidade ou de investigações sobre a magnitude da resistência sejam tomadas. Este estudo objetivou avaliar e interpretar os resultados da suscetibilidade *in vitro* de *Candida dubliniensis* sensível e resistente ao fluconazol e *Candida albicans* às equinocandinas, voriconazol, itraconazol e posaconazol à luz dos documentos oficiais e também pelas propostas utilizando pontos de corte epidemiológicos. Foram avaliados três grupos de isolados: um grupo de isolados de *C. albicans* sensíveis ao fluconazol (Grupo I), os outros dois de isolados de *C. dubliniensis*, um composto por isolados sensíveis ao fluconazol (Grupo II) e outro derivado do primeiro resistente ao fluconazol (Grupo III). Os grupos I e II nos testes com o fluconazol foram evidenciados como sensíveis a este antifúngico e o grupo III após exposições a concentrações crescentes de fluconazol foi classificado como resistente, com base no documento M27-S3 (2008) e nos *cutoffs* epidemiológicos. O grupo I foi considerado 100% sensível aos antifúngicos com base nos documentos M27-S4 (2012) e M27-S3 (2008). O grupo II foi considerado 100% sensível às equinocandinas, voriconazol, itraconazol, com base no M27-S3 e 100% sensível ao posaconazol com base no *cutoff* epidemiológico. No entanto, ao interpretar as CIMs pelos *cutoffs* epidemiológicos, foi evidenciada 9,09% de isolados não sensíveis a micafungina. E, por fim, o grupo III que foi 100% sensível às equinocandinas, voriconazol, 100% resistente ao itraconazol com base no M27-S3. Com base nos *cutoffs* epidemiológicos, 4,54% foram considerados resistentes a anidulafungina, 31,8% resistente a micafungina, 22,7% resistente ou não sensíveis ao voriconazol e 100% sensível ao posaconazol. A avaliação da suscetibilidade aos antifúngicos é um tema complexo e, no momento em que redefinições das CIMs definidoras de sensibilidade ou resistência estão sofrendo intensas revisões, nota-se dificuldades nas interpretações de tais testes.

Palavras-Chaves: *Candida dubliniensis*. Resistência antifúngica. Fluconazol. Agentes antifúngicos.

ABSTRACT

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

SUSCEPTIBILITY OF *Candida dubliniensis* SENSITIVE AND RESISTANT TO FLUCONAZOL AGAINST AZOLES AND ECHINOCANDINS

Autora: Laíssa Arévalo Bandeira

Orientador: Sydney Hartz Alves

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 10 de junho de 2014.

Candida spp. is the most common etiologic agent of opportunistic fungal infections and *Candida albicans* species still remains the most frequently isolated species in candidiasis. However, the rate of *Candida non-albicans* isolates has increased in hospitals, where the use of azole antifungals for prophylaxis or therapy is frequent. The prolonged and indiscriminate use of antifungals has favored the development of resistant yeasts. In this context, other species have emerged as clinically important pathogens. *Candida dubliniensis* species is one that has become important because the easy way that acquires resistance to fluconazole, and may become a relatively more resistant pathogen and therefore more difficult to treat. This framework requires that measures of surveillance the susceptibility or investigations about the magnitude of the resistance are taken. This study aimed to evaluate and interpret the results of *in vitro* susceptibility of *Candida dubliniensis* sensitive and resistant to fluconazol and *Candida albicans* to echinocandins, voriconazole, itraconazole and posaconazole in the light of official documents and also by using proposed points of epidemiological cuts. Where evaluated three groups of isolates: a group of isolates of *C. albicans* against fluconazole sensitive (Group I), the other two isolates of *C. dubliniensis*, a compound of isolates sensitive to fluconazole (Group II) and other derived from the first fluconazole resistant (Group III). Groups I and II tests with fluconazole were shown to be susceptible to this antifungal and group III after exposure to increasing concentrations of fluconazole was classified as resistant based on document M27-S3 (2008) and in epidemiological cutoffs. The group I was considered 100% sensitive to antifungal agents based on documents M27-S4 (2012) and M27-S3 (2008). Group II was regarded as 100% sensitive to echinocandins, voriconazole, itraconazole, based on M27-S3 and 100% sensitive to posaconazole based on epidemiological cutoff. However, when interpreting the epidemiological cutoffs MICs, was observed 9.09% for non-sensitive isolates to micafungin. Finally, the group III was 100% sensitive to echinocandins, voriconazole, 100% itraconazole resistant to based on the M27-S3. Based on the epidemiological cutoffs, 4.54% were resistant to anidulafungin, 31.8% resistant to micafungin, 22.7% resistant or susceptible to voriconazole and 100% posaconazole sensitive. Evaluation of antifungal susceptibility is a complex issue and, at the time re-definitions of MICs defining susceptibility or resistance are under intense review, note difficulties in the interpretation of such tests.

Keywords: *Candida dubliniensis*. Antifungal resistance. Fluconazol. Antifungal agentes.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Suscetibilidade ($\mu\text{g/mL}$) *in vitro* de *C. dubliniensis* sensíveis e resistentes ao fluconazol frente às equinocandinas e triazólicos43
- Tabela 2 - Suscetibilidade ($\mu\text{g/mL}$) *in vitro* de *C. albicans* sensíveis ao fluconazol frente as equinocandinas e triazólicos.....44

LISTA DE ANEXOS

- Tabela I: Suscetibilidade ($\mu\text{g/mL}$) de isolados de *Candida dubliniensis* sensíveis ao fluconazol frente à anidulafungina (ANF), caspofungina (CPF), micafungina (MCF), voriconazol (VRC), posaconazol (POSA), itraconazol (ITZ), fluconazol (FLU) 84
- Tabela II: Suscetibilidade ($\mu\text{g/mL}$) de isolados de *Candida dubliniensis* resistentes ao fluconazol frente à anidulafungina (ANF), caspofungina (CPF), micafungina (MCF), voriconazol (VRC), posaconazol (POSA), itraconazol (ITZ), fluconazol (FLU) 85
- Tabela III: Suscetibilidade ($\mu\text{g/mL}$) de isolados de *Candida albicans* sensíveis ao fluconazol frente à anidulafungina (ANF), caspofungina (CPF), micafungina (MCF), voriconazol (VRC), posaconazol (POSA), itraconazol (ITZ), fluconazol (FLU) 86

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 O gênero <i>Candida</i>	16
3.2 Candidíases	17
3.3 <i>Candida albicans</i>	19
3.4 <i>Candida dubliniensis</i>	21
3.5 Resistência no gênero <i>Candida</i>	25
3.6 Agentes antifúngicos	30
3.6.1 Azólicos	31
3.6.2 Equinocandinas.....	33
4 ARTIGO – TÍTULO	37
4.1 Resumo	37
4.2 Introdução.....	38
4.3 Materiais e Métodos	39
4.4 Resultados.....	40
4.5 Tabelas.....	43
4.6 Discussão	44
4.7 Referências Bibliográficas.....	47
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
8 LISTA DE ANEXOS	84

1 INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Candida* estão entre os patógenos fúngicos mais comuns causadores de infecções em seres humanos. Este gênero é referido como patógeno oportunista, pela sua maior ocorrência em indivíduos imunocomprometidos (PFALLER & DIEKEMA, 2004). Causa uma variedade de doenças desde infecções superficiais como onicomicoses até sistêmicas como as candidemias sendo a espécie *Candida albicans* a mais prevalente nas infecções. No entanto, espécies não-*albicans* estão sendo cada vez mais reconhecidas como importantes patógenos fúngicos humanos (PFALLER & DIEKEMA, 2004).

As infecções fúngicas oportunistas acometem principalmente pacientes imunocomprometidos, como os transplantados de medula óssea, pacientes em terapia contra o câncer e pacientes portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). A candidíase, infecção causada por esse gênero, é uma condição comum em pacientes oncológicos que se submetem a quimioterapia e radioterapia (GROLL et al., 1998; SENA et al., 2009).

Desde o início dos anos 1980, as taxas de incidência de candidemia têm aumentado substancialmente em diferentes regiões do mundo (WISPLINGHOFF et al., 2004). No ano de 2007, no Brasil, foi documentada uma incidência maior de candidemia do que até então descrita na Europa e nos Estados Unidos (COLOMBO et al., 2007). Em decorrência do aumento desta incidência houve um aumento nas taxas de mortalidade, revelando assim, que o número de pacientes de risco é crescente e requer atenção (WARNOCK, 2007).

As espécies *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* estão estreitamente relacionadas com o comensalismo e infecções oportunistas em humanos (SULLIVAN et al., 2005). No estudo realizado por Colombo e colaboradores (2007), em quatro hospitais de São Paulo, a espécie mais frequentemente isolada foi *Candida albicans*. Outro achado relevante deste estudo foi que mais de 62% dos isolados eram de espécies não-*albicans*. Assim, essas outras espécies de *Candida* representam um número significativo de casos. Além disso, causam infecções orais em indivíduos saudáveis (MOSCA et al., 2005) e possuem uma alta taxa de prevalência em pacientes diabéticos (WILLIS et al., 2000).

Candida dubliniensis é um patógeno emergente, constituinte da microbiota oral humana e é isolado principalmente das cavidades orais de pacientes infectados pelo HIV (SULLIVAN et al., 1999). Esta espécie tem sido causa de infecções superficiais e sistêmicas em pacientes imunocomprometidos e saudáveis (COLEMAN et al., 1997). Caracteriza-se por

demonstrar suscetibilidade favorável a classe dos antifúngicos azólicos, equinocandinas (PFALLER et al., 2011a) e também a anfotericina B (PEREA et al., 2002). *C. albicans* apresenta sensibilidade ao mesmo espectro de antifúngicos (MORAN et al., 1997). Pfaller e colaboradores (1999) demonstraram que as equinocandinas são ativas contra cepas de *C. dubliniensis* com sensibilidade reduzida ao fluconazol.

Nos últimos anos, o uso crescente e indiscriminado de agentes antifúngicos, resultou no surgimento de leveduras resistentes, bem como, no aumento da recorrência das infecções. Isto dificulta a obtenção de um tratamento efetivo, tornando necessária, a investigação de protocolos terapêuticos alternativos para a candidíase (O'RIORDAN et al., 2005; TARDIVO et al., 2005; SOUZA et al., 2010).

A resistência clínica tem sido relacionada com a seleção de cepas de *Candida* não-*albicans* que são naturalmente menos sensíveis ao fluconazol (FAN-HAVRAD et al., 1991) e com falhas no tratamento para erradicar candidíase orofaríngea. Isto leva ao surgimento de cepas resistentes, e conseqüentemente ao insucesso da terapia antifúngica (LACASSIN et al., 1996). O mecanismo de resistência mais frequentemente encontrado é a regulação positiva de bombas de efluxo (MORAN et al., 1998; PEREA et al., 2002). Esse mecanismo é semelhante para *C. albicans* e *C. dubliniensis* (MORAN et al., 1998). Apesar disso é importante diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis*, já que a *C. dubliniensis* pode rapidamente tornar-se resistente ao fluconazol e normalmente é isolada de culturas mistas com *C. albicans* e/ou outras leveduras em Ágar Sabouraud Dextrose (SULLIVAN et al., 1995; MORAN et al., 1998).

Entre as novas opções de tratamentos com antimicóticos incluem-se as equinocandinas; esta classe tem seu mecanismo de ação fundamentado na inibição da síntese de β -(1,3)-glucana, o que resulta no rompimento da parede celular fúngica (BRIELMAIER et al., 2008). Anidulafungina, caspofungina e micafungina são as três equinocandinas disponíveis para tratamentos. Entre os novos triazólicos, incluem-se o voriconazol e o posaconazol, este ainda não disponível no Brasil (DENNING, 2003).

Atualmente a interpretação dos testes de suscetibilidade de fungos leveduriformes fundamentados na técnica de microdiluição em caldo proposta pelo CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) repousa sobre 3 documentos : M27-A3 (2008) que define as condições para realização dos ensaios, o documento M27-S3 (2008) que estabelece os *breakpoints* para os principais antifúngicos e o documento M27-S4 (2012) que propõe os novos *breakpoints* espécie-específicos para o fluconazol, voriconazol e as equinocandinas para as 6 espécies do gênero *Candida*; todavia, *C. dubliniensis* não foi incluída no M27-S4

(2012). Neste contexto, no presente estudo, a interpretação das CIMs de *C. albicans* é definida pelo M27-S4 exceto nos testes com itraconazol que utilizou-se o M27-S3, uma vez que este triazólico não foi incluído no M27-S4; *breakpoints* para o posaconazol ainda não foram incluídos em nenhum destes documentos.

Neste contexto, em que o voriconazol e as equinocandinas passaram a ser de uso rotineiro nos hospitais brasileiros, e na expectativa de avaliar a atividade do posaconazol frente a isolados brasileiros, justifica-se o presente estudo de reavaliação da suscetibilidade de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol, frente a estes novos agentes. A recente publicação do documento CLSI M27-S4 (2012) propondo *breakpoints* espécie-específios, não incluiu a espécie *C. dubliniensis* nem os antifúngicos itraconazol e posaconazol; as dificuldades destas interpretações é tema atual e são aqui discutidas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* das equinocandinas, caspofungina, anidulafungina e micafungina, e dos azólicos, voriconazol, itraconazol e posaconazol frente a isolados de *Candida albicans* sensíveis e *Candida dubliniensis* sensíveis e resistentes ao fluconazol.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar, com base nas Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs), a suscetibilidade dos isolados de *C. albicans* sensíveis ao fluconazol, *Candida dubliniensis* sensíveis e resistentes ao fluconazol frente a anidulafungina, caspofungina e micafungina.
- Avaliar, com base nas Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs), a atividade antifúngica de voriconazol, itraconazol e posaconazol frente aos isolados de *C. albicans* sensíveis ao fluconazol e *C. dubliniensis* sensíveis e resistentes, ao fluconazol.
- Comparar a atividade dos triazólicos nos isolados de *C. albicans* sensíveis e de *Candida dubliniensis* sensíveis e resistentes, ao fluconazol
- Comparar a atividade antifúngica das três equinocandinas nos isolados de *C. albicans* sensíveis e de *Candida dubliniensis* sensíveis e resistentes, ao fluconazol.
- Interpretar os resultados dos testes de suscetibilidade à luz dos documentos oficiais bem como pelas propostas utilizando pontos de corte epidemiológicos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Gênero *Candida*

O gênero *Candida* pertence ao filo Ascomycota, classe Hemiaslomyces, ordem Saccharomycetales e família Candidaceae (fase anamórfica de Saccharomycetales) (WEBSTER & WEBER, 2007), composto por mais de 200 espécies, mas poucas acometem seres humanos (PFALLER & DIEKEMA, 2004). Mais de 95% das fungemias pelo gênero *Candida* são causadas pelas espécies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (COLOMBO et al., 2006). As espécies como *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* também acometem seres humanos causando infecções (SANDVEN et al., 2006).

As espécies de *Candida* passam a compor a microbiota dos seres humanos no momento do nascimento, através do contato materno e hospitalar, habitando, a partir de então, de forma comensal, as superfícies mucosas dos tratos respiratório, gastrointestinal e vaginal de cerca de 50% a 60% dos indivíduos saudáveis. No entanto, embora habitem, na maior parte dos indivíduos, de forma inócua, frente a determinadas circunstâncias que predisponham o seu super-crescimento, elas podem se tornar patogênicas ao homem, causando a infecção fúngica, conhecida como candidíase. Por essa razão são consideradas micro-organismos oportunistas (ELLEPOLA & SAMARANAYAKE, 2000; SULLIVAN et al., 2005). Um estudo recente verificou que mais de 40% das amostras de ambientes hospitalares são positivas para *Candida* spp. assim distribuídas: 33,4% isolados dos jalecos de profissionais, 24,5% das maçanetas, 20% de interruptores, 11,1% das mãos dos profissionais envolvidos na assistência ao paciente, 4,4% de lençóis, 4,4% do ar ambiente, e 2,2% a partir de bandejas de medicamentos (FERREIRA et al., 2013).

Os fungos do gênero *Candida* constituem-se em células leveduriformes, gram-positivas, e apresentam-se como células globosas ou ovaladas com diâmetro de 3 a 6 μm , que podem formar brotamentos e pseudohifas. As colônias deste gênero evidenciam crescimento rápido a 35°C. Em ágar Sabouraud dextrose estas se apresentam na cor branco-amarelada e de aspecto cremoso (JOKLIK et al., 1995).

Estas leveduras vertem-se da forma comensal para a forma patogênica quando há alterações na imunidade do hospedeiro decorrentes de mudanças fisiológicas características da infância, envelhecimento, ou mais frequentemente, de doenças degenerativas, neoplásicas, imunodeficiências congênita ou adquirida. O crescente número de pacientes imunocomprometidos tem determinado aumento das taxas de infecções fúngicas por fungos

oportunistas, em especial candidíase oral e sistêmica (TRICK et al., 2002; COLOMBO et al., 2007; PFALLER & DIEKEMA, 2007).

A complexa patogenicidade das espécies do gênero *Candida* está associada à expressão de fatores de virulência como a aderência aos tecidos do hospedeiro, a produção de enzimas líticas, como as proteinases e as fosfolipases, que promovem a destruição de membranas celulares, a produção de tubo germinativo e a formação de biofilmes que dificultam a atuação dos agentes antifúngicos (TEN CATE et al., 2009; SOUZA et al., 2010).

O diagnóstico e a diferenciação das espécies de *Candida* são baseados na micromorfologia, como a presença de blastoconídios no exame direto e em provas bioquímicas: assimilação (auxanograma) e fermentação (zimograma) de fontes de carbono e nitrogênio. Entre os meios de isolamento cromogênicos tem-se o CHROMagar Candida™ que diferencia as espécies de *Candida* e também verifica a ocorrência de espécies múltiplas em meios de isolamentos cromogênicos (ELLEPOLLA & MORRISON, 2005). Entre as técnicas moleculares as mais utilizadas para identificação e diferenciação das espécies estão as que se baseiam na análise do DNA cromossômico (CHEN et al., 2002).

3.2 Candidíases

As candidíases são causadas por fungos leveduriformes do gênero *Candida*. As espécies 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 envolvem as demais espécies (HAYNES, 2001).

As infecções pelas espécies de *Candida* podem se manifestar de formas brandas ou graves. Manifestações mais leves atingem a superfície cutânea ou membranas mucosas, caracterizada por manchas brancas na boca, vulvovaginites com prurido e corrimento, forma ungueal e periungueal (com perda ou espessamento da unha), intertriginosa e paroníquia. As formas sistêmicas são infecções graves como septicemia, meningite, endocardite, pneumonias e lesão ulcerativa do esôfago (LACAZ et al., 2002).

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 et al., 1998; SIDRIM & ROCHA, 2004). Segundo Castro e colaboradores (2010), a prevalência da candidíase pode ser um importante marcador da progressão desta doença, e muitas vezes, um fator preditivo para o aumento da

imunossupressão em pacientes HIV positivos. Visto que, cerca de 90% dos indivíduos infectados pelo vírus HIV, apresentam, em algum estágio da doença, manifestações clínicas relacionadas à candidíase (BASMA et al., 2008).

Com o aumento de pacientes imunocomprometidos constatou-se o crescimento da incidência de candidíase oral que é a porta de entrada para complicações das candidíases do tipo orofaríngeas, esofágicas, laríngeas e sistêmicas (SÁNCHEZ-VARGAS et al., 2002). Nos anos 1990 *C. dubliniensis* era isolada da cavidade oral de até 30% de pacientes HIV positivos e com candidíase oral (COLEMAN et al., 1997). Essa espécie ainda continua sendo bastante isolada de infecções orofaríngeas em pacientes HIV positivos, apesar disso, o isolamento desta levedura de diferentes espécimes clínicos tem sugerido um potencial patogênico dessa espécie mesmo em pacientes HIV negativos (NONAKA et al., 2008). Em um estudo realizado por Khan e colaboradores (2012) em diferentes hospitais do Kuwait, foi observada uma prevalência desta espécie em 67,1% das amostras respiratórias, 11,7% na cavidade oral, 9,2% na urina, 3,8% em hemocultivos, 2,7% em amostras da mucosa vaginal e 6% em outros sítios anatômicos.

Em relação a candidíase vulvovaginal, cerca de 75% das mulheres em idade fértil apresentaram, pelo menos, um episódio deste tipo de candidíase durante a vida, das quais 5% tornou-se recorrente (CARDONA-CASTRO et al., 2002). A candidíase vulvovaginal é considerada recorrente quando quatro episódios específicos ou três episódios não relacionados à antibioticoterapia ocorrem no intervalo de um ano (BIGGS & WILLIAMS, 2006; WORKOWSKI & BERMAN, 2006).

Quando a infecção por *Candida* spp. atinge a corrente sanguínea é chamada de candidemia. Em indivíduos normais e saudáveis, a proteção adequada contra tais infecções é proporcionada pela ação de neutrófilos. Assim, a candidemia pode ser desenvolvida em pacientes que possuem baixo número de neutrófilos, como resultado de certas disfunções hematológicas ou terapia imunossupressora. Além disso, a candidemia pode levar à colonização dos órgãos internos, uma condição conhecida como candidíase disseminada. Diante do exposto, candidemia e candidíase disseminada são condições médicas extremamente graves, sendo que a mortalidade depende da causa exata e dos fatores de risco subjacentes (PFALLER et al., 1998; KIBBLER et al., 2003). A candidemia é observada em pacientes hospitalizados submetidos a terapias antimicrobianas por longo período de tempo, a procedimentos invasivos ou a terapia imunossupressora (SIDRIM & ROCHA, 2004).

Cerca de 80% das infecções fúngicas em hospitais terciários são causadas pelo gênero *Candida* e representam um desafio aos clínicos pela dificuldade de diagnóstico e terapia, além

disso, há um alto custo com o tratamento e altas taxas de mortalidade (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003; COLOMBO et al., 2006).

Numerosos fatores contribuem para as infecções por *Candida* spp., dentre os quais podemos destacar: o rompimento das barreiras cutânea e mucosa, disfunção dos neutrófilos, defeito na imunidade mediada por células, desordens metabólicas, exposição direta aos fungos, extremos de idade (recém-nascidos e idosos), desnutrição aguda, tratamento longo com antimicrobianos, quimioterapia, transplantes, resistência a antifúngicos, dentre outros (PFALLER & DIEKEMA, 2007). O desenvolvimento de candidíase depende de um equilíbrio delicado entre os fungos e o estado imunológico do hospedeiro, que determina a relação comensal ou parasitária (MISHRA et al., 2007).

3.3 *Candida albicans*

A espécie *Candida albicans* reside normalmente de forma comensal na cavidade oral, trato respiratório, trato intestinal e a cavidade vaginal de seres humanos e animais (GOZALBO et al., 2004), sua presença não constitui em indicativo de existência de processo patológico (GIANNINI & SHETTY, 2011).

A patogenicidade de *C. albicans* depende, além do estado imunológico do hospedeiro, de um complexo conjunto de fatores de virulência (NAGLIK et al., 2003). É geralmente aceito que o dimorfismo (a capacidade de crescer tanto como levedura, como na forma filamentosa) seja uma importante característica de virulência e que seja co-regulado com outros fatores de virulência associados com a morfologia celular (BROWN & GOW, 1999; SULLIVAN et al., 2005).

Ao contrário da maior parte das espécies do seu gênero, *Candida albicans* é um microrganismo polimórfico dotado da capacidade de associar as propriedades dispersivas da forma comensal, às propriedades invasivas da forma parasitária micelial, obtendo assim, relativo sucesso na colonização das superfícies do hospedeiro (GIANNINI & SHETTY, 2011). Um dos principais fatores que contribuem para a virulência de *Candida* spp. é a sua flexibilidade em adaptar-se a uma variedade de diferentes ambientes e de fixar-se à superfície e crescer em comunidades microbianas conhecidas como biofilmes (COSTERTON, 1995; TEN CATE et al., 2009). Os biofilmes são definidos como comunidades microbianas incorporados numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares (COSTERTON, 1995). Alguns pesquisadores sugerem vantagens ecológicas na formação de um biofilme, que incluem proteção do meio ambiente, disponibilidade de nutrientes, cooperação metabólica e

aquisição de novos traços genéticos (DOUGLAS, 2003). Além de impedir a ação do sistema imunológico e de ser menos sensíveis aos antifúngicos (JABRA-RIZK et al., 2004).

Diversos estudos relataram que os biofilmes formados por *C. albicans* são resistentes à maioria dos antifúngicos comumente utilizados (LEWIS & KONTOYIANNIS, 2001; LEONHARD et al., 2010; TOBUDIC et al., 2012). Shinde e colaboradores (2012) observaram que o biofilme formado por *C. albicans* demonstrou-se completamente resistente aos antifúngicos azólicos.

Outros fatores de virulência são comumente citados na literatura, tais como as proteínas adesinas, um dos genes que as codificam é o Hwp1, essas proteínas são expressas somente na forma de hifas e atuam como substrato para as enzimas transglutaminases do hospedeiro, resultando assim, em uma forte ligação entre o fungo e a célula do hospedeiro (STAAB et al., 1999). E há também as proteínas da sequência de aglutinina semelhante (Alsp) que mediam a aderência as células do hospedeiro (HOYER, 2001). A resistência a atividade fungicida dos neutrófilos, tem sido demonstrada e se deve aos genes que codificam proteínas da superfície celular que são específicos da forma de hifas, tal como Hyr1 (BALEY et al., 1996). Além disso, tem-se as proteínas de degradação, aspartil proteinases (Saps) e fosfolipases, que são importantes fator de virulência (NAGLIK et al., 2003; NIEWERTH & KORTING, 2001), SAP 5 e 6 são específicas para hifas (MORAN et al., 2004). *C. albicans* produz hemolisinas, as quais estão associadas com a virulência, pois permitem que estas capturem íons ferro a partir da hemoglobina (MANNS et al., 1994). Estudos mostraram que este íon pode estar relacionado com o estabelecimento e disseminação da infecção (BULLEN, 1981; FRANÇA et al., 2011).

A respeito do perfil de suscetibilidade, isolados de *C. albicans* geralmente mostram-se mais sensíveis aos agentes antifúngicos utilizados no tratamento das candidemias, como anfotericina B e fluconazol, em comparação às demais espécies de *Candida* spp. (FERREIRA et al., 2013; FLÓREZ et al., 2009). Muitos estudos demonstram a suscetibilidade de *C. albicans* fluconazol-sensível à classe de agentes antifúngicos triazólicos e equinocandinas (JACOBSEN et al., 2007; AXNER-ELINGS et al., 2011, MOKADDAS et al., 2011; PFALLER et al., 2011a). Ferreira e colaboradores (2013) verificaram que 100% dos isolados de *C. albicans* obtidos de amostras hospitalares eram sensíveis a anfotericina B e ao fluconazol. Em isolados de infecções sanguíneas nos Estados Unidos, Canadá, América Latina e Europa, foi observado que *C. albicans* é altamente suscetível ao fluconazol, voriconazol e ravuconazol (PFALLER et al., 2001). Além disso, posaconazol, ravuconazol e voriconazol são altamente ativos contra todas as espécies de *Candida* (PFALLER et al.,

2002c). No entanto, isolados de amostras a partir de infecções hospitalares possuem CIMs superiores para o fluconazol. Em um estudo realizado por Kuriyama e colaboradores (2005) foi demonstrado que somente 0,3% dos isolados de *C. albicans* foram resistentes ao fluconazol. As equinocandinas possuem potente atividade contra *C. albicans* (PFALLER et al., 2011b; GARCÍA-AGUDO et al., 2012), observou-se, nos isolados obtidos de várias partes do mundo que 99,9% dos isolados de *C. albicans* eram sensíveis a caspofungina (PFALLER et al., 2006a) e que isolados de *C. albicans* fluconazol-resistente são sensíveis a micafungina (SUN et al., 2013) e a anidulafungina (PFALLER et al., 2008b). Além disso, anidulafungina é ativa contra biofilmes de *Candida* (PEMÁN et al., 2008). Mattei (2013) constatou que *C. albicans* é mais sensível a anidulafungina do que ao fluconazol e anfotericina B.

3.4 *Candida dubliniensis*

Em 1995, na Irlanda, Sullivan e colaboradores, identificaram uma nova espécie de *Candida* em casos de candidíase oral em indivíduos infectados pelo vírus HIV nomeando-a como *C. dubliniensis*. Esta espécie possui muitas características morfológicas e fisiológicas semelhantes às de *C. albicans*. No Brasil, o primeiro relato de caso de *Candida dubliniensis* foi feito por Milán e colaboradores (1999) e no Rio Grande do Sul, Alves e colaboradores (2001) relataram os três primeiros casos de *C. dubliniensis*.

A espécie *Candida dubliniensis* é habitante normal da microbiota oral dos indivíduos e passou a ser ressaltada como espécie emergente em pacientes imunocomprometidos, com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e pela consequente pressão seletiva das terapias antifúngicas (ELLEPOLA & SAMARANAYAKE, 2000; SULLIVAN et al., 2005)

Embora *C. dubliniensis* tenha sido inicialmente isolada a partir da cavidade oral, vários estudos reportam o isolamento dessa espécie em outros locais, tais como sangue, sistema nervoso central, vagina, urina, pele, em fezes de pacientes HIV negativos e positivos e no trato respiratório (ODDS et al., 1998; PINJON et al., 1998; FOTEDAR & AL-HEDAITHY, 2003; BOSCO-BORGEAT et al., 2011; MOKADDAS et al., 2011).

Com a grande disponibilidade de testes diagnósticos que podem diferenciar com precisão este patógeno de *Candida albicans*, observou-se o aumento dos relatos de casos de doença sistêmica causadas por *Candida dubliniensis* (SEBTI et al., 2001). Estudos epidemiológicos relatam que a prevalência de *C. dubliniensis* na cavidade oral de pacientes HIV positivos varia de 1,5% a 32% (PONTON et al., 2000; FAGGI et al., 2005; TEKELI et al., 2005). No estudo realizado por Ellepola e colaboradores (2011) *C. dubliniensis* foi a

segunda espécie mais isolada com uma taxa de 14,3%. Além disso, elevadas taxas de prevalência de *C. dubliniensis* foram detectadas em pacientes diabéticos (WILLIS et al., 2000), com fibrose cística (PELTROCHE-LIACSAHUANGA et al., 2002), e com câncer em uma taxa de 4,9% (MOKADDAS et al., 2011). Casos de candidemia e infecções sistêmicas causados por *C. dubliniensis* têm sido relatados na literatura (BRANDT et al., 2000; SEBTI et al., 2001; FOTEDAR & AL- HEDAITHY, 2003; VAN HAL et al., 2008;). Um estudo observou que a prevalência de isolados de *C. dubliniensis* a partir de amostras sanguíneas aumentou 0,4% entre 2002-2004 e 2% entre 2008-2012 (KHAN et al., 2012). Em um estudo da Arábia Saudita, a prevalência geral de *C. dubliniensis* foi de 3,3% entre 823 leveduras isoladas a partir de espécimes clínicos (FOTEDAR & AL- HEDAITHY, 2003).

Em um estudo realizado em Madrid, *C. dubliniensis* foi isolada de quatro amostras respiratórias provenientes de pacientes adultos sem co-infecção pelo vírus HIV entre 129 amostras clínicas (GARCÍA-GONZALÉZ et al., 2011). Entre a população não infectada pelo vírus HIV, essa espécie foi também isolada em estudos realizados com irlandeses (PONTON et al., 2000), sul-africanos (BLIGNAUT et al., 2003), argentinos (JEWUCHOWICZ et al., 2008) e chineses (GE et al., 2011), todos a partir da cavidade bucal. Dessa maneira, ficou demonstrado que *C. dubliniensis* é amplamente distribuída em populações não infectadas pelo vírus HIV em todo o mundo. Em candidemias, em pacientes não infectados pelo HIV, Jabra-Rizk e colaboradores (2005) em Baltimore isolaram *C. dubliniensis* de hemoculturas.

A estreita relação fenotípica e genotípica entre *C. dubliniensis* e *C. albicans* pode ter levado a uma incorreta identificação da maioria dos isolados de *C. dubliniensis*, pois ambas as espécies produzem tubos germinativos, clamidoconídios e possuem padrões bioquímicos similares (SULLIVAN et al., 1995). Por essas razões, é provável que a prevalência da *C. dubliniensis* possa ter sido subestimada em alguns estudos (JABRA-RIZK et al., 2005; SULLIVAN et al., 2005).

Candida dubliniensis é uma levedura dimórfica que consiste de blastoconídeos ovóides ou esféricos, cresce como colônias redondas convexas de cor creme em ágar Sabouraud dextrose, e colônias de cor branca em ágar batata. Além disso, produz pseudohifas em ágar extrato de arroz ou ágar farinha de milho com Tween 80 a 25-27 °C, após 48-72 h de incubação. Assim como *C. albicans*, *C. dubliniensis* emite tubo germinativo em soro humano após 2h de incubação a 37 °C em banho-maria (SULLIVAN et al., 1995).

Candida dubliniensis pode ser facilmente diferenciada de *C. albicans* por sua produção de hifas e pseudohifas e abundante produção de clamidósporos, no ágar suco de tomate (ALVES et al., 2006), ágar extrato de alecrim e ágar extrato de orégano (LORETO et

al., 2008), pela incapacidade ou crescimento limitado em temperaturas de 42-45°C (PINJON et al., 1998; SULLIVAN et al., 1995) e pela incapacidade de crescer em caldo Sabouraud hipertônico (ALVES et al., 2002), fato que pode ser devido a bomba de efluxo de sódio que não responde positivamente a presença de sal em *C. dubliniensis* (MORAN et al., 2012). No ágar Staib, *C. dubliniensis* evidencia abundante crescimento de pseudohifas e hifas, enquanto *C. albicans* apresenta-se quase que exclusivamente com blastoconídios (STAIB & MORSCHHAUSER, 1999). No entanto, os testes mais eficientes para identificar e diferenciar isolados de *C. dubliniensis* ainda são os que se baseiam em métodos moleculares, como a PCR (JABRA-RIZK et al., 2005; MÄHNß et al., 2005). Jewtuchowicz et al. (2008) compararam métodos fenotípicos para identificar presuntivamente *C. dubliniensis* e observaram que a micromorfologia em ágar Staib foi o método mais concordante com os resultados de PCR.

Quanto a virulência, a expressão de enzimas de degradação, como aspartil proteinases (SAPs) e fosfolipases são importantes fatores implicados na patogenicidade de *C. albicans*. Análises do genoma de *C. dubliniensis* demonstram que esta codifica uma gama semelhante de genes SAP como os da *C. albicans* (MORAN et al., 2004). Em contrapartida, alguns autores sugerem que a expressão dessas enzimas é menor em *C. dubliniensis* do que em *C. albicans* (HANNULA et al., 2000; FOTEDAR & AL-HEDAITHY, 2005). Um subconjunto da família SAP (SAP 4, 5 e 6) está associado com formas de crescimento hifal em *C. albicans*, mas apenas uma sequência desses genes (CdSAP4) tem sido encontrado em *C. dubliniensis*. A falta de expressão dos outros genes em *C. dubliniensis* pode justificar sua incapacidade de suas hifas penetrarem nos tecidos do hospedeiro, adquirirem nutrientes, ou ainda se defenderem dos macrófagos, concorrendo para explicar sua menor prevalência na microbiota humana (SULLIVAN et al., 2005). Além disso, vários genes que codificam adesinas em *C. albicans* tem sido identificados em *C. dubliniensis* como Hwp1. Entretanto, esse gene homólogo em *C. dubliniensis* é divergente do gene de *C. albicans* (MORAN et al., 2004).

C. dubliniensis, ao contrário de *C. albicans* é hidrofóbica a 25 e 37 ° C; esta hidrofobicidade desempenha papel importante nas interações hidrofóbicas que fortalecem a aderência das células fúngicas às superfícies diversas (JABRA-RIZK et al., 2001). A inclusão de fluconazol aos meios utilizados resultaram em aumento da aderência de *C. dubliniensis* as células do meio; isto pode explicar as maiores taxas de isolamento desta espécie em pacientes infectados pelo HIV, os quais recebem prolongados tratamento com fluconazol (ZEPELIN et al., 2002).

A capacidade que *C. albicans* possui de crescer nas formas leveduriforme e filamentosa é um importante fator de virulência, pois, as hifas desempenham um papel importante na adesão, invasão e formação de biofilme (FINKEL & MITCHELL, 2011). *C. dubliniensis* possui a capacidade de produzir hifas, mas há evidências de que a dinâmica, as vias de morfogênese e os sinais e vias envolvidos na indução de hifas, podem ser diferente nas duas espécies (SULLIVAN et al., 2005). *C. albicans* é mais eficiente na produção de hifas (GILFILAN et al., 1998), pois exibe aumentada expressão de genes específicos de hifas, tais como Hwp1, Hyr1 e Als3. Todas estas diferenças sugerem que estas duas espécies, estreitamente relacionadas, se diferenciam na virulência pela formação e expressão de hifas (MORAN et al., 2012). Na formação de biofilmes, *C. dubliniensis* evidencia menor capacidade do que *C. albicans* (VILLAR-VIDAL et al., 2011; PANNANUSORN et al., 2013).

Similarmente às pequenas diferenças fenotípicas e genotípicas entre *C. albicans* e *C. dubliniensis* os perfis de suscetibilidade aos antifúngicos assim se apresentam. *C. dubliniensis* também é primariamente sensível a anfotericina B, anidulafungina, micafungina, caspofungina, posaconazol, voriconazol, itraconazol, fluconazol e 5-fluorocitosina (BOSCO-BORGEAT et al., 2011; ELLEPOLA et al., 2011; GARCÍA-GOANZALÉZ et al., 2011; GE et al., 2011). *C. dubliniensis* demonstra-se suscetível as classes de agentes antifúngicos triazólicos e equinocandinas (AXNER-ELINGS et al., 2011; PFALLER et al., 2011b;). No Kuwait foi observado que todos os isolados de *C. dubliniensis* estudados foram suscetíveis ao voriconazol e anfotericina B (KHAN et al., 2012). Estudos evidenciaram a sensibilidade ao fluconazol (MOKADDAS et al., 2011) e ao itraconazol (PFALLER et al., 1999) em 100% dos isolados de *C. dubliniensis*. Voriconazol, ravuconazol e caspofungina demonstraram boa atividade contra essa espécie em 99% dos isolados (PFALLER et al., 1999). No entanto, há estudos que relatam a resistência dessa levedura ao fluconazol e ao voriconazol (JEWTUCHOWICZ et al., 2008; BOSCO-BORGEAT et al., 2011).

Ao descrever pela primeira vez a resistência ao fluconazol em isolados de *C. dubliniensis*, Moran e colaboradores (1997) mostraram que se poderia rapidamente obter cepas resistentes ao fluconazol a partir das cepas sensíveis após exposições *in vitro* aos azólicos. *C. dubliniensis* adquire rapidamente resistência ao fluconazol tanto *in vitro* como *in vivo*, o que leva a necessidade de explorar sua epidemiologia (MORAN et al., 1997; MORAN et al., 1998). Scheid e colaboradores (2012) confirmaram a capacidade de *C. dubliniensis* tornar-se resistente *in vitro* ao fluconazol e demonstraram que há resistência cruzada com cetoconazol, itraconazol, terbinafina e ravuconazol.

Alguns autores sugerem que ocorra um aumento da virulência com a resistência ao fluconazol, pois as cepas resistentes demonstraram maior aderência as células epiteliais e um aumento da secreção de proteases (ZEPELIN et al., 2002). Assim, é possível que a terapia com fluconazol poderia ser um dos fatores que exerceriam pressão seletiva favorecendo o crescimento de *C. dubliniensis* em algumas condições presentes na cavidade oral (MORAN et al., 2004).

Pacientes HIV positivos inicialmente colonizados com *C. albicans* tratados com fluconazol que não desenvolveram resistência a este tiveram uma substituição da colonização por *C. dubliniensis*, e algumas dessas cepas mostraram resistência ao fluconazol (MARTINEZ et al., 2002). Estudos sugerem que *C. dubliniensis* torna-se resistente ao fluconazol durante o curso do tratamento, tornando-se um agente patogênico relativamente mais resistentes e mais difícil de responder aos tratamentos antifúngicos (MORAN et al., 1997; KIRKPATRIC et al., 1998; PEREA et al., 2002). Perea e colaboradores (2002) verificaram uma diminuição da suscetibilidade de isolados de *C. dubliniensis* fluconazol-resistentes para voriconazol, itraconazol, ravuconazol e posaconazol, mas mantiveram-se ativas.

3.5 Resistência no gênero *Candida*

A resistência antifúngica é definida como a falha de um agente antifúngico na obtenção da cura de processos infecciosos (SANGLARD, 1998). Resistência primária ou intrínseca ocorre quando o micro-organismo não é suscetível ao fármaco sem prévia exposição. Enquanto que resistência secundária ou adquirida desenvolve-se durante ou após o tratamento com agentes antifúngicos (SOBEL & AKINS, 2009; PFALLER, 2012). A resistência antifúngica pode depender de fatores relacionados ao medicamento, como a forma de administração e perfil farmacocinético, e/ou ao hospedeiro, mais especificamente, ao estado imunológico que, em situações de comprometimento, torna-se mais suscetível à colonização dos micro-organismos patogênicos (PFALLER, 2012). Nas últimas décadas, pode-se observar um aumento da taxa de resistência aos agentes antifúngicos, principalmente, associado ao uso recorrente de agentes azólicos no tratamento de pacientes imunocomprometidos (SANGLARD, 2003; JABRA-RIZK et al., 2004).

Kanafani & Perfect (2008) descreveram quatro mecanismos de resistência aos azólicos em espécies de *Candida*, e mais de um pode estar associado com um determinado isolado resistente. Esses mecanismos podem ter efeitos aditivos ou causar resistência cruzada entre os antifúngicos desta classe (PFALLER, 2012).

A indução de bombas de efluxo leva a diminuição da concentração de fármaco dentro da célula fúngica e é o primeiro mecanismo associado com sensibilidade diminuída ou resistência de *Candida* spp. a antifúngicos azólicos. A regulação positiva de bombas de efluxo codificadas por genes MDR ou CDR tem sido associada com a resistência aos azólicos em *Candida dubliniensis* (CdMDR1, CdCDR1). A indução das bombas de efluxo codificadas por genes CDR tende a afetar a ação de todos os azólicos. Este mecanismo é, muitas vezes, suficiente para a resistência *per se*, em certas espécies. Já as bombas de efluxo codificadas por genes MDR são normalmente seletivas para o fluconazol (PFALLER, 2012). Em *C. dubliniensis* um grande número de isolados parece ter o gene CdCDR1 defeituoso (SULLIVAN et al., 2004). Outros achados mostram que a resistência de *C. dubliniensis* ao fluconazol está associada a uma alta regulação de CdMDR1 (MORAN et al., 1998; PEREA et al., 2002). A deleção do gene CdMDR 1 em isolados de *C. dubliniensis* resistentes ao fluconazol, tornou esses isolados sensíveis a este fármaco (WIRSCHING et al., 2001). Os antifúngicos azólicos atuam inibindo enzima lanosterol 14- α -esterol-demetilase, que é codificada pelo gene ERG11 (GHANNOUM & RICE, 1999). A superexpressão desse gene é observada em isolados menos sensíveis aos azólicos. Com essa superexpressão do gene ERG11, tem-se o aumento da concentração de enzima, conseqüentemente o aumento de ergosterol na célula fúngica, que está associado à menor sensibilidade aos azólicos (PEREA et al., 2002; PINJON et al., 2003). O último mecanismo descrito de resistência envolve o desenvolvimento de desvios de percurso que anulam os efeitos do antifúngico. Este mecanismo tem sido associado com a mutação do gene ERG3 em certas cepas de *Candida* spp. (PFALLER, 2012). Pinjon e colaboradores. (2003) observaram que cepas de *C. dubliniensis* após exposições ao itraconazol, sofrem mutações com perda funcional do gene ERG3, desta maneira, deixando de acumular o metabólito tóxico 14 α -metil-3,6-diol, o qual é acumulado no tratamento com azólicos.

Na Dinamarca, evidenciou-se aumento significativo na taxa de isolados de *Candida* spp. menos sensíveis ao fluconazol, com 20,3% em 2004, 28,1% em 2005, 35,3% em 2006, 32,1% em 2007, 27,5% em 2008 e 31,1% em 2009 (ARENDRUP et al., 2011). Ao longo de vários anos, milhares de amostras de infecções sanguíneas obtidas aleatoriamente em todo o mundo foram testadas e foi observado que a taxa de *C. albicans* resistente ao fluconazol permaneceu <5% (PFALLER et al., 2002c; HAJJEH et al., 2004; PFALLER & DIEKEMA, 2007; PFALLER et al., 2013). Dados recentes mostram que na Dinamarca (ARENDRUP et al., 2011) e no Rio Grande do Sul a taxa de *C. albicans* resistente ao fluconazol foi de 0,6% (MATTEI, 2013). No entanto, já foi relatado índice de 9% de isolados de *C. albicans*

resistente ao fluconazol nos Estados Unidos (EUA) (ANTONIADOU et al., 2003). Em Santa Maria, Rio Grande do Sul, foram observados 2,2% de isolados de *C.albicans* resistentes ao itraconazol (SANTOS, 2012).

Em *C. dubliniensis* foi observada resistência ao fluconazol em 7% dos isolados na Irlanda, nesse estudo não foi observada resistência cruzada com itraconazol, voriconazol e ravuconazol, (PFALLER et al., 1999); na Dinamarca a taxa de resistência foi de 3,1% (ARENDRUP et al., 2011) e no Kuwait foi de 2,5%, 7 dos quais ocorreu entre 2008-2010 (KHAN et al., 2012). Pfaller e colaboradores (2001), observaram em isolados de *C. albicans*, obtidos dos Estados Unidos, Canadá, América Latina e Europa, resistência cruzada de fluconazol e itraconazol com ravuconazol e voriconazol. No Brasil, foi observada resistência cruzada em isolados de *C. dubliniensis* resistentes ao fluconazol com cetoconazol, itraconazol, terbinafina e ravuconazol (SCHEID et al., 2012). Em um estudo multicêntrico foi observada resistência cruzada entre os triazólicos em 2% dos isolados de *C. dubliniensis* (PFALLER et al., 2013).

Krcmery & Barnes (2002), realizaram uma revisão sobre resistência e patogenicidade no gênero não-*albicans* e observaram que 10-25% dos isolados de *C. lusitaniae* eram resistentes ao fluconazol. Além disso, também observaram resistência a anfotericina B em uma pequena proporção, 5-20 % em *C. lusitaniae* e *C. rugosa* e de 5-10 % de *C. guilliermondii*. Na espécie *C. glabrata*, 17,4% dos isolados demonstraram resistência a anfotericina B, e resistência ao fluconazol foi observada em 5 a 9% dos isolados de pacientes com mais de 16 anos (PFALLER et al., 2002c) e 10-15% dos isolados sanguíneos (PFALLER et al., 2002 c; PFALLER et al., 2004). Em uma revisão sobre a resistência nesta espécie, observou-se que 35% dos isolados de *C. glabrata* eram resistentes ao fluconazol (KCRMERY & BARNES, 2002). Na Espanha, 3,7% dos isolados de *C. glabrata* eram resistentes ao fluconazol e 18,5% resistentes ao itraconazol (FLÓREZ et al., 2009). Enquanto que, no Brasil, foi relatada taxa de 5,2% de isolados fluconazol-resistentes, 26,3% de isolados resistentes ao itraconazol e 10,5% resistentes ao voriconazol (SANTOS, 2012). *C. glabrata* normalmente não é intrinsicamente resistente aos azólicos, mas possui habilidade de rapidamente adquirir resistência, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, durante a exposição a estes antifúngicos (BENNETT et al., 2004; BORST et al., 2005).

C. glabrata possui reduzida sensibilidade ao fluconazol e *C. tropicalis* às equinocandinas, devido à essa diferença nos padrões de suscetibilidade, os tratamentos antifúngicos primários devem ser ajustados à epidemiologia local (ARENDRUP et al., 2011). O fato de *C. glabrata* ser mais comum no hemisfério norte e *C. tropicalis* em partes do

hemisfério sul, é de grande relevância (ARENDRUP, 2010). Na Andalusia, Espanha, foi observado 3,3% de isolados de *C. tropicalis* resistentes ao fluconazol e ao itraconazol (FLÓREZ et al., 2009). Enquanto que na Dinamarca, observou-se 6,7% de isolados resistentes ao fluconazol (ARENDRUP et al., 2011). No entanto, ao ser feita uma revisão sobre o tema, essa taxa de resistência ao fluconazol aumentou para 10-25% (KCRMERY & BARNES, 2002). No Rio Grande do sul a taxa resistência de *C. tropicalis* ao itraconazol foi de 2,3% (SANTOS, 2012). Além disso, em um período de tempo (2005-2009) foi evidenciada redução da sensibilidade dessa espécie a anfotericina B (SANTOS, 2012).

Pfaller e colaboradores (2013), observaram taxa de 2,1% de *C. parapsilosis* resistentes ao fluconazol em um estudo avaliava isolados obtidos de várias partes do mundo. Na Europa a incidência de *C. parapsilosis* resistente ao fluconazol também é baixa. Em estudo realizado em Portugal, 0,6% dos isolados eram resistentes ao fluconazol, um único isolado foi resistente ao voriconazol e ao posaconazol e dois isolados resistentes a anfotericina B (SILVA et al., 2009). No mesmo local, foi realizado outro estudo que mostrou um aumento do nível de resistência de *C. parapsilosis* depois de exposição a azóis, com exceção do posaconazol. (PINTO & SILVA et al., 2009). Além disso, já foi observada redução da sensibilidade a anfotericina B nesta espécie (SANTOS, 2012).

A resistência intrínseca ao fluconazol em *C. krusei* é bem conhecida e deve-se, em parte, pela reduzida habilidade dos azólicos inibir a enzima 14 α -lanosterol demetilase dessa espécie (MARICHAL & VANDEN BOSSCHE, 1995; OROZCO et al., 1998). Krcmery & Barnes (2002), observaram que 75 % dos isolados de *C. krusei* eram inerentemente ou secundariamente resistentes ao fluconazol. Além disso, também observaram resistência a anfotericina B em 10-15% nos isolados de *C. krusei*. No entanto, já se tem relatos de uma maior taxa de resistência a anfotericina B nessa espécie, 27,8% dos isolados (PFALLER et al., 2002c), e ao fluconazol, 100% dos isolados. Além disso, 14,3% dos isolados de *C. krusei* demonstraram resistência ao itraconazol (FLÓREZ et al., 2009). No Rio Grande do Sul a taxa de resistência ao fluconazol foi de 100% e para itraconazol 20% (SANTOS, 2012).

A falha clínica devido a isolados de *Candida* resistentes às equinocandinas é rara, mas há relatos de resistência adquirida após exposição aos antifúngicos desta classe (PARK et al., 2005). Em isolados de *C. albicans* menos suscetíveis a caspofungina, foram identificadas mutações pontuais no gene FKS1, gene que codifica a enzima 1,3- β D-glucana-sintase (PARK et al, 2005; BAIXENCH et al, 2007; PERLIM, 2007). O mesmo foi observado em isolados resistentes à micafungina (PFALLER et al, 2013). Isolados de *Candida* spp. com mutação FKS1 que expressaram resistência a caspofungina, também evidenciaram resistência cruzada

com micafungina e anidulafungina (PERLIN et al., 2007). No entanto, já se tem relato de *C. krusei* resistente às equinocandinas (HAKKI et al., 2006) e *C. parapsilosis* resistente a anidulafungina, sem alteração no gene FKS (PFALLER et al., 2013). Sequenciamento do gene FKS1 de *Aspergillus fumigatus* resistente à caspofungina não revelou mutação no gene, no entanto, mostrou uma maior expressão FKS1 (3,09 vezes em média) do que nos isolados *wild-type* (ARENDRUP et al., 2008).

Até o presente momento, há poucas hipóteses que propõe mecanismos de resistência às equinocandinas que não são mediados por FKS1. Entre essas estão a superexpressão de CDR1 e CDR2 (SCHUETZER-MUEHLBAUER et al., 2003); superexpressão de SBE2, que codifica uma proteína Golgi envolvida no transporte de componentes pela parede celular (OSHEROV et al., 2002); alteração no fluxo do fármaco (PADERU et al., 2004); indução de respostas ao estresse celular mediadas por Hsp90 (SARKAR et al., 2014), esse possui um importante papel na mediação da resistência fúngica, na tolerância as equinocandinas e potencializa a resistência aos azóis em *C. albicans* (SINGH et al., 2009); e mutações no gene ECM33 (afuEcm33), gene que codifica importantes proteínas da parede celular fúngica (ROMANO et al., 2006).

Em estudo realizado por Pfaller e colaboradores (2006a) com 8.197 isolados clínicos de *Candida* spp. obtidos de multicentros no período entre 2001 a 2004, foi observada redução da suscetibilidade à caspofungina em 0,14% de *C. parapsilosis*, 0,07% de *C. guilliermondii*, 0,02% de *C. rugosa*, 0,01% de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* e *C. tropicalis*. Também já se tem relato de um isolado de *C. dubliniensis* resistente à caspofungina (ARENDRUP et al., 2011).

Na avaliação de isolados clínicos obtidos a partir de 98 laboratórios em 34 países foi observado que 0,02% dos isolados de *C. albicans* eram resistentes à anidulafungina e sensível dose dependente à caspofungina e micafungina, 0,2% eram resistentes a caspofungina e 0,1% eram resistentes à micafungina. No mesmo estudo, dois isolado resistentes à caspofungina também eram resistentes à micafungina (PFALLER et al., 2013). Axner-Elings e colaboradores (2011) na Suécia, observaram, através do método Etest, que um em cada dois isolados de *C. guilliermondi* era resistente à anidulafungina. Além disso, estudo realizado na Dinamarca também relatou resistência de *C. guilliermondii* à anidulafungina (ARENDRUP et al., 2011).

Isolado de *C. tropicalis* já foi classificado como sensível dose dependente à micafungina (CIM 0,5 µg / mL) e resistente à anidulafungina e caspofungina (CIM ≥1 µg/mL), com mutação FKS1 (AXNER-ELINGS et al., 2011). Em Portugal, relatou-se que

38% dos isolados de *C. parapsilosis* não eram sensíveis à caspofungina e 29% não sensíveis à anidulafungina (SILVA et al., 2009). Enquanto que na Suécia, 11,1% dos isolados eram resistentes à anidulafungina (AXNER-ELINGS et al., 2011).

Nos Estados Unidos, já se tem relato de isolados sanguíneos de *C. parapsilosis* inicialmente suscetíveis ao fluconazol, voriconazol, caspofungina, anidulafungina, anfotericina B e resistentes à micafungina. E que após tratamento com caspofungina e fluconazol, os isolados passaram a ser resistentes ao fluconazol, voriconazol, caspofungina e micafungina, mas permaneceram sensíveis à anidulafungina e anfotericina B. Uma análise molecular indicou que os isolados eram da mesma cepa, confirmando que resistência cruzada secundária aos azólicos e equinocandinas tem emergido (MOUDGAL et al., 2005). Além disso, foi observado que 38% dos isolados de *C. glabrata* equinocandina-resistentes eram também resistentes ao fluconazol (PFALLER et al., 2013). Da mesma forma, já foi relatado que vários isolados clínicos de *C. albicans* após tratamento com fluconazol adquiriram resistência à caspofungina (SARKAR et al., 2014). No entanto, na avaliação de três isolados clínicos de *C. albicans* com elevados CIMs para fluconazol, cetoconazol e itraconazol, todos com superexpressão CDR1 e CDR2, não foi observada alteração na suscetibilidade à caspofungina (SCHUETZER-MUEHLBAUER et al., 2003), o mesmo foi observado em 99% dos isolados de *Candida* spp. fluconazol-resistentes (PFALLER et al., 2003a).

Neste contexto, onde há um crescente aumento da resistência antifúngica, por ter-se um limitado número de antifúngicos disponíveis e pelo alto custo dos tratamentos por períodos prolongados em pacientes imunocomprometidos, observa-se a real necessidade de alternativas que incrementem a eficácia do tratamento das infecções fúngicas (VALE-SILVA et al., 2010; GARG & SINGH, 2011).

3.6 Agentes Antifúngicos

Os antifúngicos são divididos em várias classes, cada uma atuando em diferentes alvos para inibir o crescimento ou destruir os fungos patogênicos (KANAFANI & PERFECT, 2008). Os atuais agentes antifúngicos para uso sistêmico que estão disponíveis são as alilaminas (terbinafina), antimetabólitos (5-flucitosina), azólicos (cetoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol, ravuconazol e posaconazol), inibidores da síntese de glucana (caspofungina, anidulafungina e a micafungina) e derivados poliênicos (anfotericina B) (JOHNSON et al., 2004; DERESINSKI & STEVENS, 2003).

As semelhanças entre as células fúngicas e as células dos mamíferos dificultam o desenvolvimento da terapia antifúngica devido aos dois organismos serem eucariotas e possuírem organelas semelhantes, incluindo também replicação do DNA e síntese protéica. Porém, a presença de parede celular nos fungos permite que está se torne um alvo para os antifúngicos, sem que comprometa as células mamíferas (PAPPAS et al., 2009).

3.6.1 Azólicos

Os antifúngicos azólicos constituem um grupo de fármacos sintéticos caracterizados por apresentarem um anel imidazólico ligado por uma ligação carbono-nitrogênio com outros anéis aromáticos (SPINOSA et al., 2002). Exercem sua ação antifúngica ligando-se a enzima lanosterol 14- α -esterol-demetilase (14- α -DM) que está envolvida na conversão do lanosterol em ergosterol. Como consequência, tem-se a inibição da produção de ergosterol, ocasionando, uma mudança na estrutura e nas funções da membrana celular fúngica, inibindo o crescimento do fungo (KANAFANI & PERFECT, 2008).

Tais agentes são fungistáticos e tem um amplo espectro de atividade. Esta classe de antifúngicos está representada pelos imidazólicos (cetoconazol, miconazol), e os triazólicos (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, ravuconazol) (SHEEHAN et al., 1999). Os agentes de uso sistêmico são bem tolerados e geralmente não causam toxicidade grave aos hospedeiros (DIDOMENICO, 1999). No grupo dos triazólicos é que se encontram antifúngicos com grande eficiência e baixa toxicidade, caracterizando-se pela elevada afinidade pela citocromo P450 fúngico e sem afinidade pela citocromo P450 dos mamíferos. Em geral, os triazólicos demonstraram um espectro de atividade muito mais amplo e reduzida toxicidade quando comparados aos imidazólicos. No espectro de ação incluem os agentes da paracoccidiodomicose, esporotricose, candidíases, aspergilose, coccidiodomicose, histoplasmose, criptococose, dermatomicoses e, recentemente das zigomicoses (GOLDANI & SUGAR, 1994; SUGAR & LIU, 2000; SPINOSA et al., 2002; KONDORI et al., 2011).

Atualmente o mais utilizado é o fluconazol, o qual foi aprovado para uso clínico no final dos anos 80. Este cobriu muitas deficiências dos imidazólicos por ser altamente solúvel em água, não ser alterado por mudanças na acidez gástrica e possuir menor risco de hepatotoxicidade. Além disso, pode ser administrado tanto por via oral, quanto intravenosa, apresentando boa penetração cérebro-espinhal e alcançando níveis de quase 80% no sangue (COLOMBO et al., 2007). Está aprovado para uso no tratamento de candidíase vaginal, orofaríngea, esofágica, meningite criptocócica e na profilaxia para diminuir a incidência de

candidíase em pacientes submetidos a transplantes de medula óssea (GUBBINS & ANAISSIE, 2006).

No entanto, seu uso tem sido desafiado pela emergência da resistência aos azólicos. Embora *C. albicans* seja a levedura mais comumente isolada, e geralmente é sensível ao fluconazol, este antifúngico apresenta restrições no tratamento de candidíases, sobretudo aquelas causadas por *C. krusei* e *C. glabrata* (COLOMBO et al., 2007).

O voriconazol, aprovado em 2002, possui boa disponibilidade oral e parenteral, sua absorção não é afetada pelo pH gástrico (JEU et al., 2003). É um triazólico de segunda geração, eficaz contra espécies de *Candida*, incluindo *C. glabrata* e *C. krusei* (PFALLER et al., 2002c). Possui potente ação fungicida contra fungos filamentosos como *Aspergillus* e também tem sido recomendado para as hialohifomicoses causadas por fungos do gênero *Fusarium*. A sua atividade contra leveduras é principalmente fungistática embora tenha sido relatado que alguns isolados de *Candida* spp. são refratários ao voriconazol (QUINDÓS et al., 2007). O voriconazol ainda não é o azólico ideal porque ainda apresenta interações medicamentosas e efeitos colaterais clássicos dos azólicos, apesar da eficácia, segurança e amplo espectro (GUPTA et al., 2005). Está associado com transaminases elevadas, distúrbios visuais e fotossensibilidade em crianças de 9 meses a 15 anos (WALSH et al., 2002). Além disso, a penetração desse antifúngico no sistema nervoso central (SNC) em recém-nascidos é desconhecida. Estudos sugerem que a dosagem de voriconazol não se correlaciona com as concentrações séricas da droga. Recomenda-se uma dose inicial de 7 mg / kg, via intravenosa a cada 12 horas (KARLSSON et al., 2009; NEELY et al., 2010)

O posaconazol é um antifúngico de amplo espectro, ativo contra *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Cryptococcus* spp., zigomicetos e *Fusarium* spp. (GREENBERG et al., 2006; RAAD et al., 2006, PFALLER et al., 2013) e espécies de *Candida* resistentes ao fluconazol (JOHNSON & KAUFFMAN, 2003). Está recomendado no tratamento de infecções fúngicas invasivas em pacientes imunocomprometidos que são refratários ou intolerantes aos agentes antifúngicos anfotericina B, fluconazol e itraconazol (HACHEM et al., 2000). Os estudos farmacocinéticos demonstraram que o posaconazol é ativo por via oral e possui meia-vida de aproximadamente 25h (COURTNEY et al., 2003). Em contraste com outros azólicos, posaconazol inibe poucas enzimas do citocromo P450 o que determina menores interações medicamentosas, fato de importância em pacientes imunocomprometidos sob complexas terapias (WEXLER et al., 2004). Para a profilaxia da aspergilose invasiva em adultos com a doença do enxerto-versus-hospedeiro posaconazol tem sido recomendado como primeira escolha (ULLMANN et al., 2007). Além disso, é muito eficaz na prevenção de

infecções fúngicas em pacientes pediátricos após o transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas (DORING et al., 2014). Possui maior efeito inibitório *in vitro* contra fungos filamentosos do que voriconazol, itraconazol e anfotericina B (PFALLER et al., 2002b). Posaconazol possui boa atividade contra Zigomicetos e é o mais ativo entre os azólicos (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2009; SPREGHINI et al., 2010; KONDORI et al., 2011; DROGARI-APIRANTHITOU et al., 2012) constituindo-se em uma nova perspectiva para o tratamento de zigomicoses. Sua atividade *in vivo* foi demonstrada contra vários modelos de Zigomicetos (SUN et al., 2002; SCHALK et al., 2006).

A ampla utilização destes agentes, especialmente do fluconazol, deu origem a preocupações a respeito da emergência de resistência a esta classe de antifúngicos (CHARLIER et al., 2006). Como resultado, a vigilância da resistência aos azólicos entre as espécies de *Candida* está sendo, a cada dia, mais necessária (PFALLER & DIEKEMA, 2002a).

3.6.2 Equinocandinas

Esta classe de antifúngico possui um amplo espectro de ação e tem como alvo o complexo enzimático β -1,3-D-glucana sintase, necessária para a síntese de polímeros β -1,3-D-glucano, que é um componente essencial da parede celular de muitos fungos (DOUGLAS, 2001; DENNING, 2003). Glucana sintase é um complexo enzimático com pelo menos duas subunidades, Fksp e Rho1p (KONDOH et al., 1997). A subunidade Fksp, é codificada por três genes relacionados - FKS1, FKS2 e FKS3- e catalisa a transferência de moléculas de açúcar a partir de moléculas doadoras ativadas para moléculas receptoras específicas formando ligações glicosídicas (SAWISTOWSKA-SCHRODER et al, 1984; TANG & PARR, 1991; KONDOH et al, 1997).

As equinocandinas são agentes licenciados para o tratamento de candidíase invasiva pelo Food e Drug Administration (FDA) (BRIELMAIER et al., 2008). Tais agentes possuem um perfil farmacológico seguro por agirem em um alvo não encontrado em células de mamíferos (PATTERSON, 2000).

Quimicamente, as equinocandinas são lipopeptídeos semi-sintéticos com estrutura química de hexapeptídeos cíclicos ligados a uma cadeia lateral de ácido graxo (KURTZ et al., 2001), é solúvel em água (DENNING, 2003). Todas as preparações de equinocandinas apresentam-se na forma intravenosa. A caspofungina é solúvel em água e metanol, e ligeiramente solúvel em etanol (CASPOFUNGIN ACETATO). A micafungina é solúvel em

água (DENNING, 2003), ao contrário da anidulafungina que é ligeiramente solúvel em etanol (VAZQUEZ & SOBEL, 2006).

Estudos observaram uma potente atividade *in vitro* das equinocandinas frente a maioria das espécies de *Candida*, incluindo aquelas com elevado nível de resistência aos azólicos (TAWARA et al., 2000). Raramente tem sido reportada resistência adquirida ou redução da suscetibilidade para as equinocandinas, e quando registrada, na maioria dos casos esteve associada com mutação no gene FKS1 (LAVERDIERE et al., 2006).

O protótipo para anidulafungina (LY303366) foi identificado em 1974 (NYFELER & KELLER, 1974). Porém, somente em 2009, a anidulafungina passou a ser comercializado no Brasil, para o tratamento de candidíase invasiva e em pacientes não neutropênicos (BORMANN & MORRISON, 2009). Possui atividade antifúngica *in vitro* contra uma ampla gama de espécies de *Candida*, incluindo *C. glabrata* e *C. krusei*, as quais possuem resistência inata ou induzida aos azólicos (PFALLER et al., 2008a,b). É ativa contra *Aspergillus* spp., mas, é inativa contra *Cryptococcus neoformans* e zigomicetos (COHEN-WOLKOWIEZ et al., 2006). Não é metabolizada pelo fígado e nem excretada pelo rim (DOWELL et al., 2007); o fato de sofrer degradação química no sangue limita sua interação com outros medicamentos tornando desnecessário o ajuste da dose em pacientes com insuficiência hepática ou renal (DOWELL et al., 2004; DAMLE et al., 2009). Não foram observados eventos adversos atribuíveis à anidulafungina em crianças e neonatos (COHEN-WOLKOWIEZ et al., 2011).

A caspofungina foi a primeira equinocandina ser comercializada no Brasil no ano 2000 (BORMANN & MORRISON, 2009). O seu protótipo (MK991) foi relatado em 1989 (MASUREKAR et al., 1992). O acetato de caspofungina, originalmente desenvolvido na Merck Research Laboratories, é um lipopeptídeo semi-sintético derivado da penumocandina B₀, produto da fermentação do fungo *Glarea lozoyensis*. Esta equinocandina foi aprovada para uso clínico constituindo-se num fungicida com mínima toxicidade para o hospedeiro (GEORGOPAPADAKOU, 2001).

A caspofungina é ativa no tratamento de infecções por *Candida* spp. e *Aspergillus* spp.. As concentrações inibitórias mínimas são maiores para *A. terreus* e *A. nidulans*. Não possui atividade contra *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon* spp, *Rhizopus* spp. e *Fusarium* spp. (DODDS et al., 2006). Foi aprovada para uso em candidemia e outras infecções invasivas causadas por *Candida*, além de candidíase esofágica, aspergilose invasiva em pacientes que são refratários ou intolerantes a outras terapias padrões (KARTSONIS et al., 2003; ESPINEL-INGROFF, 1998). Também se mostrou eficaz no tratamento de pacientes com candidíase esofágica fluconazol resistentes (KARTSONIS et al., 2002).

Devido ao seu mecanismo de ação diferenciado, não é previsto multi resistência com outras classes de antifúngicos como os azólicos (ANDRIOLE et al., 1999; KARTSONIS et al., 2003) e poliênicos (KARTSONIS et al., 2003). Sua atividade *in vitro* é similar frente a isolados de *Candida* sensíveis ou resistentes ao fluconazol (BACHMAN et al., 2002). No entanto, mecanismos de resistência tem sido identificados, e cresce o número de relatos de casos de falhas na terapia com caspofungina (WALKER et al., 2010). Em *Candida* spp. a suscetibilidade a caspofungina varia de *C. albicans* como o mais sensível, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* como sendo menos sensíveis (BARCHIESI et al., 2006; CANTON et al., 2006; PFALLER et al., 2006a).

A micafungina (FK463) foi identificada em 1990 (IWAMOTO et al., 1994) como um derivado da FR901370, um componente natural isolado de culturas de *Coleophoma empedri* (TAWARA et al., 2000). Tal composto tem elevado peso molecular e não possui boa absorção oral (HIEMENZ et al., 2005).

Em 2010, a micafungina foi aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária para o uso no Brasil. Esta também foi designada para o tratamento de candidíase invasiva, para profilaxia de indivíduos submetidos a transplantes de células hematopoiéticas e infecções por *Aspergillus* (BORMANN & MORRISON, 2009).

A micafungina apresenta atividade fungicida contra *Candida* spp. e atividade fungistática contra *Aspergillus* spp. Isto é consequência da maior distribuição de β -1,3-D-glucano na parede celular de *Candida* spp. do que em *Aspergillus* spp. A micafungina não exerce nenhuma atividade contra zigomicetos e *Cryptococcus*, pois tais fungos são desprovidos de β -1,3-D-glucano em sua parede celular. Apresenta, ainda, potente atividade contra as formas micelianas de *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* e *Coccidioides immitis* (NAKAI et al., 2002).

Segundo Maesaki e colaboradores (2000), a micafungina apresentou atividade antifúngica em camundongos infectados por *C. albicans* resistentes aos azólicos. Esta equinocandina demonstrou atividade contra biofilmes de *Candida* spp. e reduziu a aderência de cepas de *C. albicans* sensíveis e resistentes ao fluconazol em células epiteliais (BORG-VON et al., 2002). Micafungina demonstra atividade contra *Candida* spp, incluindo isolados resistentes aos azólicos (IKEDA et al., 2000; TAWARA et al., 2000). Os efeitos colaterais são raros, mesmo em doses até 15 mg/Kg e caracterizam-se por aminotransferases alanina/aspartato elevadas, hipocalcemia, hiperbilirrubinemia e hipertensão (; HERESI et al., 2006; SMITH et al., 2009; ARRIETA et al., 2011).

A atividade fungicida das equinocandinas sobre *Candida* spp. elegeu estes antifúngicos como preferenciais para tratamento das candidíases sistêmicas. Os *breakpoints* espécie-específicos constantes no documento M27-S4 (2012), foram estabelecidos com base nos *cutoffs* epidemiológicos (*epidemiological cutoff values* ou *ECV*) e evidenciam as naturais diferenças entre as espécies de *Candida*. O *cutoff* epidemiológico tem sido sugerido como um indicador confiável para discriminar cepas não sensíveis a um determinado antimicrobiano, tomando-se por base o perfil de suscetibilidade natural daquela espécie. Numa distribuição de CIMs para um grande número de isolados, o *cutoff* epidemiológico é a moda das CIMs para determinado antifúngico. Não é considerado um *breakpoint* porque não prediz sucesso ou insucesso terapêutico mas permite separar cepas desprovidas de mecanismos de resistência (*wild type strains*) daquelas onde há mecanismos funcionantes (*non-wild type strains*). Na interpretação da suscetibilidade às equinocandinas deve-se enfatizar que o documento M27-S4 não incluiu *C. dubliniensis*, portanto, a inexistência de *breakpoints* espécie-específicos a esta espécie, impõe a utilização dos *breakpoints* gerais estabelecidos pelo documento M27-S3 (2008).

Atualmente, a suscetibilidade a caspofungina é a mais difícil de ser interpretada devido a inexistência de indicadores confiáveis, mesmo para micro-organismos incluídos na M27-S4. Recentemente, Espinel-Ingroff et al. (2013) ao tentar estabelecer novos *cutoffs* epidemiológicos para a caspofungina, com base na técnica CLSI M27-A3, detectaram excessiva variabilidade intra e interlaboratorial, impossibilitando tais definições. Ao mesmo tempo advertiram que mesmo os *breakpoints* espécie-específicos constantes na M27-S4 deveriam ser revistos exceto para *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*, os quais mostraram-se estáveis. A variabilidade das CIMs para a caspofungina é um problema já conhecido o qual impediu o EUCAST de definir *breakpoints* a esta equinocandina. Frente a estas dificuldades, Pfaller et al. (2014b) propuseram a utilização da micafungina como indicador da suscetibilidade a caspofungina, similarmente ao fluconazol como indicador da suscetibilidade aos azólicos. A grande variabilidade das CIMs de caspofungina poderia explicar o significativo aumento das CIMs no grupo III (*C. dubliniensis* fluconazol-resistente), uma vez que resistência cruzada entre azólicos e equinocandinas não era esperada. Por outro lado em biofilmes de *C. albicans* previamente expostos ao fluconazol, foram observadas redução da atividade das equinocandinas. Também foi observado que vários isolados clínicos de *C. albicans* após tratamento com fluconazol também evidenciaram maior resistência à caspofungina, embora não ocorrendo em *C. glabrata* e *C. dubliniensis*. Este fenômeno de exposição ao fluconazol repercutindo em resistência a caspofungina, está relacionado à

indução de respostas ao estresse celular mediadas por Hsp90 (SARKAR et al., 2014). Hsp90 possui um importante papel na mediação da resistência fúngica, na tolerância as equinocandinas e potencializa a resistência aos azólicos em *C. albicans* (SINGH et al., 2009); fato similar pode ter ocorrido com os achados do presente estudo.

4. ARTIGO

SUSCETIBILIDADE DE *Candida dubliniensis* FLUCONAZOL-RESISTENTES ÀS EQUINOCANDINAS E AZÓLICOS

Laíssa Arévalo Bandeira^{1*}, Débora Alves Nunes Mario¹, Laura Bedin Denardi¹, Erico Silva Loreto², Janio Morais Santurio², Sydney Hartz Alves¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

4.1 RESUMO

C. dubliniensis, desde sua identificação, tem sido mais frequentemente isolada de indivíduos com candidíase de orofaringe infectados pelo vírus HIV e, em geral, é confundida com *C. albicans*. A maioria dos isolados dessa espécie é sensível ao fluconazol, no entanto, a facilidade com que adquirem resistência a esse antifúngico, torna preocupante infecções por essa espécie. Neste trabalho foi avaliado o perfil de suscetibilidade de isolados de *C. albicans* (GI) *C. dubliniensis* fluconazol sensíveis (GII), e isolados de *Candida dubliniensis* fluconazol resistentes (GIII), frente à anidulafungina, caspofungina, micafungina, voriconazol, itraconazol e posaconazol. *C. albicans* (GI) foi considerada 100% sensível aos antifúngicos com base nos documentos M27-S4 e M27-S3. *C. dubliniensis* sensível (GII) foi considerado 100% sensível às equinocandinas, voriconazol, itraconazol, com base no M27-S3 e 100% sensível ao posaconazol com base no cutoff epidemiológico. *C. dubliniensis* resistente (GIII) foi 100% sensível às equinocandinas, voriconazol, 100% resistente ao itraconazol com base no M27-S3. Com base nos *cutoffs* epidemiológicos, 4,54% foram considerados resistentes a anidulafungina, 31,8% resistente a micafungina, 22,7% resistente ou não sensíveis ao voriconazol e 100% sensível ao posaconazol. A avaliação da suscetibilidade aos antifúngicos é um tema complexo e, no momento em que redefinições das CIMs definidoras de sensibilidade ou resistência estão sofrendo intensas revisões, nota-se dificuldades nas interpretações de tais testes.

Palavras-Chaves: *Candida dubliniensis*, resistência antifúngica, fluconazol, agentes antifúngicos.

4.2 INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Candida* estão entre os patógenos fúngicos que mais frequentemente causam infecções em seres humanos (PFALLER & DIEKEMA, 2004). *Candida albicans* é a espécie mais prevalente do gênero, todavia, *C. dubliniensis* é um patógeno emergente, sendo isolado principalmente da cavidade oral de pacientes infectados pelo HIV e eventualmente envolvida em candidíases sistêmicas em pacientes imunocomprometidos (COLEMAN et al., 1997; SULLIVAN et al., 1999).

Nos últimos anos, a crescente utilização de agentes antifúngicos tem favorecido a emergência de leveduras resistentes, com repercussões nas falhas terapêuticas e aumento dos custos hospitalares. Este quadro impõe que medidas de vigilância da suscetibilidade ou de investigações sobre a magnitude da resistência sejam tomadas (O'RIORDAN et al., 2005; TARDIVO et al., 2005; SOUZA et al., 2010).

Ainda que primariamente sensível aos antifúngicos, *C. dubliniensis* caracteriza-se pelo rápido desenvolvimento da resistência ao fluconazol (MORAN et al., 1997; MORAN et al., 1998; SCHEID et al., 2012). Há sugestões de que *C. dubliniensis* se torne resistente ao fluconazol durante o curso da antifungoterapia, tornando-se um agente patogênico relativamente mais resistente e, conseqüentemente, mais difícil de tratar (MORAN et al., 1997; KIRKPATRIC et al., 1998; PEREA et al., 2002). O aumento da virulência em isolados que tornam-se resistentes é também um ponto que, embora polêmico, tem argumentos fortes, pois conforme demonstrado por Zepelin et al. (2002), os isolados resistentes demonstraram maior aderência às células epiteliais e aumento na atividade de exo-enzimas como as proteases.

O fluconazol é o antifúngico mais utilizado nas candidíases, no entanto, seu uso tem sido desafiado pela etiologia das candidíases onde um número de espécies fúngicas é cada vez maior, bem como pela emergência da resistência aos azólicos (COLOMBO et al., 2007).

Recentemente a interpretação dos testes de suscetibilidade passou a considerar *breakpoints* espécie-específicos frente a cada agente antifúngico; entretanto, tais *breakpoints* inexitem para *C. dubliniensis* (CLSI, M27-S4, 2012). Este fato torna a interpretação dos testes de suscetibilidade de *C. dubliniensis* problemático, sobretudo quando a resistência a azólicos estiver presente. No âmbito da espécie *C. dubliniensis* fluconazol-resistente desconhece-se a extensão da resistência cruzada com o posaconazol bem como a suscetibilidade destes isolados frente às equinocandinas. O presente estudo foi objetivado a investigar estas relações à luz dos documentos que norteiam a interpretação dos testes.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 Micro-organismos

Todos os isolados clínicos de *C. dubliniensis* foram previamente identificadas pela amplificação aleatória ácido polimórfico desoxirribonucleico (ADN) (RAPD), utilizando os *primers* CDU (50 GCG ATC CCC A-30) (SULLIVAN et al., 1995) e B-14 (50-A GAT CAA GTC C-30) (BAUER et al., 1993). Isolados de *Candida* foram obtidas de pacientes com diferentes formas clínicas da candidíase, incluindo candidíase orofaríngea, candidíase vulvovaginal, intertriginosas, e envolvimento ungueal. A maioria dos isolados de *C. dubliniensis* obtidos de pacientes com SIDA com candidíase orofaríngea; dois isolados foram de candidíase vulvovaginal (pacientes com SIDA) e uma cepa foi isolada a partir da flora normal do escarro de um paciente sem SIDA. Essas cepas foram isoladas de serviços hospitalares diferentes, localizadas em seis cidades brasileiras. Todas as amostras foram mantidas na coleção estoque do Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI), Universidade Federal de Santa Maria (Santa Maria Cidade, Brasil).

Candida albicans (n=22) constituiu-se no Grupo I; *C. dubliniensis* foram distribuídas em dois grupos: Grupo II (n=22) ou grupo FS (fluconazol-sensível) e Grupo III (n=22) ou grupo FR (fluconazol-resistente). O Grupo III foi derivado do Grupo II após exposição a concentrações crescentes de fluconazol, conforme a técnica de indução da resistência proposta por Fekete- Forgács et al., (2000). Como controle foram utilizadas: *C. albicans* ATCC 90028 e *C. krusei* ATCC 6258

4.3.2 Agentes antifúngicos

Os agentes antifúngicos avaliados foram anidulafungina e voriconazol (Pfizer, Inc, New York, NY), caspofungina (Merck Research Laboratories, Rahway, NJ), micafungina (Fujisawa Pharmaceutical Co Ltd, Osaka, Japão), fluconazol (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO), itraconazol (Jansen Pharmaceutica) e posaconazol (Shering-Plough).

4.3.3 Testes de suscetibilidade *in vitro*

Os testes de suscetibilidade foram realizados de acordo com a técnica de microdiluição em caldo M27-A3 (CLSI, 2008a).

As soluções estoques dos agentes antifúngicos foram preparadas em água destilada estéril e conservadas a -70°C . As soluções intermediárias foram preparadas em Caldo RPMI 1640 tamponado com MOPS de acordo com a técnica empregada. As faixas de concentrações dos antifúngicos testados foram de: $0,004\mu\text{g/mL}$ - $2,048\mu\text{g/mL}$ para anidulafungina e micafungina e de $0,03125\mu\text{g/mL}$ - $16\mu\text{g/mL}$ para caspofungina. Para os azólicos as faixas testadas foram de: $0,007\mu\text{g/mL}$ - $512\mu\text{g/mL}$ para fluconazol; $0,002\mu\text{g/mL}$ - $64\mu\text{g/mL}$ para itraconazol; $0,002\mu\text{g/mL}$ - $4,096\mu\text{g/mL}$ para voriconazol e posaconazol.

O crescimento dos micro-organismos foi visualmente monitorado, tendo a concentração inibitória mínima (CIM) definida como a menor concentração necessária para inibir 80% do crescimento dos fungos, em relação aos seus respectivos controles.

Recentemente, estudos foram conduzidos para redefinir *cutoffs* epidemiológicos, incluindo-se micro-organismos não considerados na M27-S4. Para *C. dubliniensis* os *cutoffs* epidemiológicos foram: fluconazol ($0,5\mu\text{g/L}$), posaconazol ($0,25\mu\text{g/L}$) e voriconazol ($0,03\mu\text{g/L}$) e para *C. albicans* frente ao posaconazol foi de $0,06\mu\text{g/L}$ (ESPINEL-INGROFF et al., 2014). Em adição, Pfaller et al. (2014a) estabeleceram *cutoffs* epidemiológicos para anidulafungina ($0,125\mu\text{g/L}$) e micafungina ($0,125\mu\text{g/L}$).

As interpretações das CIMs foram assim realizadas: a) *C. albicans* frente à anidulafungina, caspofungina, micafungina, fluconazol e voriconazol com base no M27-S4 (CLSI, 2012); b) *C. albicans* frente ao itraconazol com base no M27-S3 (CLSI, 2008b); c) *C. albicans* frente ao posaconazol, de acordo com o *cutoff* epidemiológico (ESPINEL-INGROFF et al., 2014); d) *C. dubliniensis* frente ao itraconazol conforme M27-S3; e) *C. dubliniensis* frente ao fluconazol e voriconazol segundo M27-S3 e pelos *cutoffs* epidemiológicos (ESPINEL-INGROFF et al., 2014) e o posaconazol somente pelo *cutoff* epidemiológico (ESPINEL-INGROFF et al., 2014); f) *C. dubliniensis* frente a anidulafungina e micafungina com base na M27-S3 e pelos *cutoffs* epidemiológicos (PFALLER et al., 2014a) enquanto que *C. dubliniensis* frente a caspofungina somente segundo M27-S3 (CLSI, 2008b).

Para análise estatística foi utilizado teste de Mann-Whitney para comparação entre os grupos sensíveis e resistentes dentro de cada espécie estudada. E para comparações entre os antifúngicos foi utilizado Anova seguido de Tukey. O software utilizado foi GraphPad Prisma 7, com nível de significância de 0.05%.

4.4 RESULTADOS

As tabelas 1 e 2 apresentam os parâmetros de suscetibilidade dos 3 grupos estudados frente aos antifúngicos (intervalos de CIMs, CIM50, CIM90 e médias geométricas das CIMs).

Os grupos I e II mostraram-se sensíveis ao fluconazol; o grupo *C. dubliniensis* fluconazol-sensível (G II) foi significativamente mais sensível do que o grupo *C. albicans* (G I) ($p < 0,05$). Após 15 dias de exposição a concentrações crescentes de fluconazol, todos os isolados de *C. dubliniensis* puderam ser classificados, com base nos *breakpoints* estabelecidos pelo documento M27-S3 (2008) bem como nos *cutoffs* epidemiológicos definidos por Espinel-Ingroff et al. (2014), como resistentes ao fluconazol. O grupo de *C. dubliniensis* fluconazol-resistente (G III) foi significativamente mais resistente ao fluconazol do que os grupos I e II ($p < 0,001$).

Frente ao itraconazol, os grupos de *C. albicans* (G I) e *C. dubliniensis* (GII), com base nos *breakpoints* do M27-S3, mostraram 100% sensibilidade. Com base nos mesmos *breakpoints* o grupo formado por *C. dubliniensis* fluconazol-resistente (GIII) passou a ser 100% resistente a este triazólico. As comparações entre os grupos evidenciaram diferenças significativas entre o grupo III e os demais ($p < 0,05$), mas não entre os grupos I e II ($p > 0,05$).

Nos ensaios com o voriconazol o grupo I (*C. albicans*) foi considerado 100% sensível como base nos *breakpoints* estabelecidos pelo documento M27-S4. Na inexistência de *breakpoints* espécie-específicos para *C. dubliniensis*, os grupos II e III foram classificados com base no documento M27-S3 (2008) e nos *cutoff* epidemiológicos. Pelos critérios do M27-S3 os grupos II e III são 100% sensíveis ao voriconazol. Com base no *cutoff* epidemiológico o grupo II (*C. dubliniensis* fluconazol-sensível) é 100 % sensível; já o grupo III evidenciou 17 (77,2%) isolados sensíveis e 5 (22,7%) não sensíveis ou resistentes. As comparações entre os 3 grupos frente ao voriconazol evidenciaram diferenças significativas entre si, onde, com base nas médias geométricas verificou-se $GII < GI < GIII$. O grupo III evidenciou média geométrica 14,4 vezes maior do que a média geométrica do grupo II.

Na inexistência de *breakpoints* para o posaconazol, utilizou-se o *cutoff* epidemiológico (ESPINEL-INGROFF et al., 2014). Com *cutoff* epidemiológico de 0,06 µg/mL todos os isolados de *C. albicans* (G I) foram considerados sensíveis. Para *C. dubliniensis*, o *cutoff* epidemiológico de 0,25 µg/mL indicou que todos os isolados de *C. dubliniensis* (G II e III) permaneceram sensíveis ao posaconazol. Já as comparações entre os grupos, evidenciaram que o GII (*C. dubliniensis* fluconazol-sensível) foi significativamente mais sensível que os grupos I e III ($p < 0,05$). O grupo *C. dubliniensis* fluconazol-resistente (G III) foi significativamente mais resistente do que o grupo I (*C. albicans*) ($p < 0,05$).

Frente a anidulafungina o grupo I (*C. albicans*) foi 100% sensível como base nos *breakpoints* estabelecidos pelo documento M27-S4. O grupo *C. dubliniensis* fluconazol-sensível (GII) também pôde ser considerado 100% com base nos *breakpoints* do documento M27-S3 bem como no *cutoff* epidemiológico (PFALLER et al., 2014). Com base no documento M27-S3, o grupo III pôde ser considerado como 100% sensível; todavia ao utilizar-se o *cutoff* epidemiológico, 21 (95,45%) dos isolados foram considerados sensíveis e apenas 1 (4,54%) como não sensível a anidulafungina. A média geométrica das CIMs de anidulafungina referente ao grupo III foi 3 vezes maior do que a média geométrica evidenciada pelo grupo II (*C. dubliniensis* fluconazol-sensível) ($p < 0,05$). As comparações entre as CIMs dos grupos I e II não indicaram diferenças significativas.

Nos testes com micafungina o grupo de *C. albicans* (GI) foi 100% sensível como base nos *breakpoints* estabelecidos pelo documento M27-S4; o grupo II (*C. dubliniensis* fluconazol-sensível) foi julgado 100% sensível à micafungina com base no documento M27-S3; entretanto, a interpretação pelo *cutoff* epidemiológico revelou 2 (9,09%) isolados como não sensíveis à micafungina. Tomando-se por base os *breakpoints* do documento M27-S3, todos os isolados do grupo III podem ser considerados como sensíveis a micafungina, mas utilizando-se o *cutoff* epidemiológico (PFALLER et al., 2014) 7 (31,8%) isolados podem ser classificados como não sensíveis a micafungina. A comparação estatística entre os 3 grupos indicou que o grupo *C. dubliniensis* fluconazol-sensível (GII) foi significativamente mais sensível a micafungina do que os grupos I e III.

Frente a caspofungina, o grupo de *C. albicans* (GI) foi 100% sensível a caspofungina, com base no M27-S4 (2012). Os grupos II e III podem também ser classificados como 100% sensíveis se utilizarmos os parâmetros do documento M27-S3(2008). Cabe ainda destacar que o Grupo II foi significativamente mais sensível do que o Grupo III ($p < 0,05$) mas diferenças significativas não foram detectadas entre as CIMs dos grupos I e II.

4.5 TABELAS

Tabela 1 –Suscetibilidade ($\mu\text{g/mL}$) *in vitro* de *C. dubliniensis* sensíveis e resistentes ao fluconazol frente a equinocandinas e triazólicos.

Antifúngicos	Grupos	Intervalos das CIMs	CIM50	CIM90	MG
Anidulafungina	FS	0,004-0,032 **	0,008	0,032	0,01
	FR	0,008-0,256	0,032	0,064	0,03
Caspofungina	FS	0,0625-0,5 *****	0,125	0,25	0,12
	FR	0,250-1,00	0,50	1,00	0,533
Micafungina	FS	0,004-0,128 *	0,032	0,0625	0,03
	FR	0,016-0,250	0,064	0,128	0,055
Voriconazol	FS	0,002-0,016 *****	0,004	0,008	0,0045
	FR	0,008-0,512	0,016	0,256	0,025
Posaconazol	FS	0,002-0,004 *****	0,002	0,004	0,0022
	FR	0,008-0,125	0,008	0,032	0,011
Itraconazol	FS	0,008- 0,125 *****	0,03	0,06	0,026
	FR	4,00 – 16,0	8,00	16,0	10,96
Fluconazol	FS	0,125-0,50 *****	0,25	0,50	0,20
	FR	64,0-128	64,0	128	87,7

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

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

MG= Média geométrica; FS= Fluconazol sensível; FR= Fluconazol resistente

*, **, ***, ***** diferença estatística entre *C. dubliniensis* sensível da *C. dubliniensis* resistente frente ao antifúngico testado.

Tabela 2 –Suscetibilidade ($\mu\text{g/mL}$) *in vitro* de *C. albicans* sensíveis ao fluconazol frente as equinocandinas e triazólicos.

Antifúngicos	Grupos	Intervalos das CIMs	CIM50	CIM90	MG
Anidulafungina	FS	0,008-0,064	0,016	0,064	0,025
Caspofungina	FS	0,0625-0,250	0,125	0,250	0,154
Micafungina	FS	0,016-0,064	0,032	0,064	0,042
Fluconazol	FS	0,125-2,00	0,50	2,00	0,476
Itraconazol	FS	0,030 – 0,125	0,060	0,125	0,084
Voriconazol	FS	0,016 – 0,125	0,030	0,0625	0,042
Posaconazol	FS	0,008 – 0,030	0,016	0,030	0,019

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

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

MG= Média geométrica.

4.6 DISCUSSÃO

C. dubliniensis foi reconhecida como uma nova espécie de *Candida* em decorrência dos trabalhos de Sullivan et al. (1995) ao caracterizarem isolados de *C. albicans* oriundos da orofaringe de pacientes com SIDA. Em 1997 Moran et al. relataram a facilidade de *C. dubliniensis* tornar-se resistente ao fluconazol o que foi corroborado por outros autores, caracterizando-se como um fenômeno associado a isolados oriundos de pacientes infectados pelo HIV ou como resultado do prolongado uso do fluconazol (RUHNKE et al., 2000; PEREA et al., 2002).

Na microbiota fúngica da boca, *C. albicans* é a espécie predominante enquanto *C. dubliniensis* é considerada um componente menor. Apesar de *C. albicans* evidenciar maior virulência do que *C. dubliniensis*, as proteinases de *C. dubliniensis* são menos afetadas pelos antirretrovirais inibidores da protease do que as de *C. albicans*. A emergência de *C. dubliniensis* pode ter sido consequência da baixa imunidade dos pacientes com SIDA associada ao tratamento com antirretrovirais inibidores da protease o que favoreceu o desenvolvimento desta espécie, podendo ser identificada (SULLIVAN et al., 1995, PEREA et al., 2002; LORETO et al., 2010). As similaridades biológicas entre *C. albicans* e *C. dubliniensis* justificam a inclusão de *C. albicans* no presente estudo.

A padronização dos testes de suscetibilidade para fungos leveduriformes permitiu o monitoramento da emergência da resistência bem como a detecção do fenômeno da resistência cruzada entre antimicóticos da mesma classe ou entre classes distintas (PFALLER et al., 2007). A avaliação da suscetibilidade de *C. dubliniensis* resistentes ao fluconazol frente as equinocandinas e ao posaconazol ainda não foi investigada. Este estudo, objetivado a esta questão, discute também as dificuldades de interpretação de tais testes, uma vez que as CIMs definidoras de sensibilidade ou resistência estão sofrendo intensa revisão.

Atualmente a interpretação dos testes de suscetibilidade de fungos leveduriformes fundamentados na técnica de microdiluição em caldo proposta pelo CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) repousa sobre 3 documentos : M27-A3 (2008) que define as condições para realização dos ensaios, o documento M27-S3 (2008) que estabelece os *breakpoints* para os principais antifúngicos e o documento M27-S4 (2012) que propõe os novos *breakpoints* espécie-específicos para o fluconazol, voriconazol e as equinocandinas para as 6 espécies do gênero *Candida*; todavia, *C. dubliniensis* não foi incluída no M27-S4 (2012). Neste contexto, no presente estudo, a interpretação das CIMs de *C. albicans* é definida pelo M27-S4 exceto nos testes com itraconazol que utilizou-se o M27-S3, uma vez que este triazólico não foi incluído no M27-S4; *breakpoints* para o posaconazol ainda não foram incluídos em nenhum destes documentos.

Conforme o M27-S3, nos testes com itraconazol os grupos fluconazol-sensíveis (GI e GII) foram interpretados como sensíveis ao itraconazol; por outro lado, o GIII foi resistente a este triazólico. Este fenômeno de resistência cruzada entre fluconazol e itraconazol tem sido frequente e está bem documentado através de estudos prévios (CARTLEDGE et al., 1997 e CUENCA-ESTRELLA et al., 1999).

Frente ao voriconazol e posaconazol o grupo de *C. dubliniensis* fluconazol-resistente (G III) foi classificado como sensível a estes triazólicos, conforme M27-S3 e *cutoff* epidemiológicos, respectivamente, embora tenha se registrado significativo aumento nas CIMs. A resistência cruzada do fluconazol com voriconazol e posaconazol é menos acentuada do que com o itraconazol e também varia em função das espécies de *Candida* envolvidas. *C. albicans* e *C. parapsilosis* manifestam o mesmo perfil aqui observado para *C. dubliniensis* enquanto que *C. glabrata* e *C. tropicalis* evidenciam resistência cruzada mais intensa (SANGUINETI et al., 2005). Segundo alguns autores o aumento das CIMs já se constitui num sinalizador para a resistência a azólicos (CUENCA-ESTRELLA et al., 1999; STEVENS & STEVENS, 1996).

Como a classe dos azólicos compartilha os mesmos mecanismos de ação e de resistência, a resistência cruzada é um fenômeno esperado. Segundo Pfaller & Diekema (2007) menos de 50% dos isolados de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol mantêm-se sensíveis aos novos triazólicos. De modo geral, a sensibilidade do Grupo III ao voriconazol e posaconazol contraria o postulado por Pfaller & Diekema (2007) mas está de acordo com o estudo de Lockhart et al. (2012) onde isolados de *C. dubliniensis* resistentes ao fluconazol foram 100% sensíveis ao voriconazol e posaconazol.

A atividade fungicida das equinocandinas sobre *Candida* spp. elegeu estes antifúngicos como preferenciais para tratamento das candidíases sistêmicas. Os *breakpoints* espécie-específicos constantes no documento M27-S4 (2012), foram estabelecidos com base nos *cutoffs* epidemiológicos (*epidemiological cutoff values* ou *ECV*) e evidenciam as naturais diferenças entre as espécies de *Candida*. O *cutoff* epidemiológico tem sido sugerido como um indicador confiável para discriminar cepas não sensíveis a um determinado antimicrobiano, tomando-se por base o perfil de suscetibilidade natural daquela espécie. Numa distribuição de CIMs para um grande número de isolados, o *cutoff* epidemiológico é a moda das CIMs para determinado antifúngico. Não é considerado um *breakpoint* porque não prediz sucesso ou insucesso terapêutico mas permite separar cepas desprovidas de mecanismos de resistência (*wild type strains*) daquelas onde há mecanismos funcionantes (*non-wild type strains*). Na interpretação da suscetibilidade às equinocandinas deve-se enfatizar que o documento M27-S4 não incluiu *C. dubliniensis*, portanto, a inexistência de *breakpoints* espécie-específicos a esta espécie, impõe a utilização dos *breakpoints* gerais estabelecidos pelo documento M27-S3 (2008).

Frente às equinocandinas, o grupo I (*C. albicans*) foi sensível as 3 equinocandinas; da mesma forma os grupos II (*C. dubliniensis* fluconazol-sensível) e o grupo III (*C. dubliniensis* fluconazol-resistentes), conforme o M27-S3. Cabe salientar o significativo aumento das CIMs no grupo III frente a caspofungina, o que não era esperado.

Recentemente, estudos foram conduzidos para redefinir *cutoffs* epidemiológicos, incluindo-se micro-organismos não considerados na M27-S4. Para *C. dubliniensis* os *cutoffs* epidemiológicos foram: fluconazol (0,5 µg/L), posaconazol (0,25 µg/L) e voriconazol (0,03 µg/L) e para *C. albicans* frente ao posaconazol foi de 0,06 µg/L (ESPINEL-INGROFF et al., 2014). Em adição, Pfaller et al. (2014a) estabeleceram *cutoffs* epidemiológicos para anidulafungina (0,125 µg/L) e micafungina (0,125 µg/L). Tomando-se por base estes *cutoffs* epidemiológicos, as interpretações alteram-se significativamente pois a resistência a

equinocandinas manifesta-se nos grupos II e III de *C. dubliniensis*, fato ainda não descrito em nenhum estudo, o que requer cautelosa interpretação.

Atualmente, a suscetibilidade a caspofungina é a mais difícil de ser interpretada devido a inexistência de indicadores confiáveis, mesmo para micro-organismos incluídos na M27-S4. Recentemente, Espinel-Ingroff et al. (2013) ao tentar estabelecer novos *cutoffs* epidemiológicos para a caspofungina, com base na técnica CLSI M27-A3, detectaram excessiva variabilidade intra e interlaboratorial, impossibilitando tais definições. Ao mesmo tempo advertiram que mesmo os *breakpoints* espécie-específicos constantes na M27-S4 deveriam ser revistos exceto para *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*, os quais mostraram-se estáveis. A variabilidade das CIMs para a caspofungina é um problema já conhecido o qual impediu o EUCAST de definir *breakpoints* a esta equinocandina. Frente a estas dificuldades, Pfaller et al. (2014b) propuseram a utilização da micafungina como indicador da suscetibilidade a caspofungina, similarmente ao fluconazol como indicador da suscetibilidade aos azólicos. A grande variabilidade das CIMs de caspofungina poderia explicar o significativo aumento das CIMs no grupo III (*C. dubliniensis* fluconazol-resistente), uma vez que resistência cruzada entre azólicos e equinocandinas não era esperada. Por outro lado em biofilmes de *C. albicans* previamente expostos ao fluconazol, foram observadas redução da atividade das equinocandinas. Também foi observado que vários isolados clínicos de *C. albicans* após tratamento com fluconazol também evidenciaram maior resistência à caspofungina, embora não ocorrendo em *C. glabrata* e *C. dubliniensis*. Este fenômeno de exposição ao fluconazol repercutindo em resistência a caspofungina, está relacionado à indução de respostas ao estresse celular mediadas por Hsp90 (SARKAR et al., 2014). Hsp90 possui um importante papel na mediação da resistência fúngica, na tolerância as equinocandinas e potencializa a resistência aos azólicos em *C. albicans* (SINGH et al., 2009); fato similar pode ter ocorrido com os achados do presente estudo.

Finalmente, é oportuno considerar que a avaliação da suscetibilidade dos fungos leveduriformes a antifúngicos é um tema complexo e, no momento em que redefinições estão em curso, as dificuldades de interpretação tornam-se mais agudas.

4.7 REFERÊNCIAS

CARTLEDGE, J.D.; MIGDLEY, J.; GAZZARD, B.G. Clinically significant azole-resistance in *Candida* isolates from HIV-positive patients with oral candidiasis. **AIDS**, v. 11(15), 1839-1844, 1997.

CLINICAL LABORATORY AND STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, 3rd ed. Approved Standard. M27-A3. Wayne, P.A.: Clinical and laboratory Standards Institute, 2008a.

CLINICAL LABORATORY AND STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Third Informational Supplement. CLSI document M27-S3. Wayne, P.A.: Clinical and laboratory Standards Institute, 2008b.

CLINICAL LABORATORY AND STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement. CLSI document M27S4. Wayne, P.A.: Clinical and laboratory Standards Institute, 2012.

COLEMAN, D.C.; SULLIVAN, D.J.; BENNETT, D.E.; MORAN, G.P.; BARRY, H.J.; SHANLEY, D.B. Candidiasis: the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*. **AIDS**, v.11(5), 557-567, 1997.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L.R.; 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. Control Hosp. Epidemiol.**, v.28 (5), 570-576, 2007.

CUENCA-ESTRELLA, M.; DIAZ-GUERRA, T.M.; MELLADO, E.; MANZON, A.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. Comparative *in vitro* activity of voriconazole and itraconazole against fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant clinical isolates of *Candida* species from Spain. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.18 (6), 432-435, 1999.

ESPINEL-INGROFF, A.; ARENDRUP, M.C.; PFALLER, M.A.; BONFIETTI, L.X.; BUSTAMANTE, B.; CANTON, E.; CHRYSSANTHOU, E.; CUENCA-ESTRELLA, M.; FOTHERGILL, A.; FULLER, J.; GAUSTAD, P.; GONZALEZ, G.M.; GUARRO, J.; LASS-FLORL, C.; LOCKHART, S.R.; MEIS, J.F.; MOORE, C.B.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PELAEZ, T.; PUKINSKAS, R.B.S.; SAINT-GERMAIN, G.; SZESZS, M.W.; TURNIDGE, J. Interlaboratory variability of caspofungin MICs for *Candida* spp. using CLSI and EUCAST methods: should the clinical laboratory be testing this agent?. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.57 (12), 5836-5842, 2013.

ESPINEL-INGROFF, A.; PFALLER, M.A.; BUSTAMANTE, B.; CANTON, E.; FOTHERGILL, A.; FULLER, J.; GONZALEZ, G.M.; LASS-FLORL, C.; LOCKHART, S.R.; MARTIN-MAZUELOS, E.; MEIS, J.F.; MELHEM, M.S.C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PELAEZ, T.; SZESZS, M.W.; SAINT-GERMAIN, G.; BONFIETTI, L.X. Multilaboratory study of epidemiological cutoff values for detection of resistance in eight

Candida species to fluconazole, posaconazole, and voriconazole. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58 (4), 2006-2012, 2014.

FEKETE-FORGÁCS, K.; GYURC, L.; LENKEY, B. Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. **Mycoses**, v.43(7-8), 273-279, 2000.

KIRKPATRICK, W.R.; REVANKAR, S.G.; MCATEE, R.K.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; FOTHERGILL, A.W.; MCCARTHY, D.I.; SANCHE, S.E.; CANTU, R.A.; RINALDI, M.G.; PATTERSON, T.F. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in North America by primary CHROMagar *Candida* screening and susceptibility testing of isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v.36(10), 3007–3012, 1998.

LOCKHART, S.R.; IQBAL, N.; CLEVELAND, A.A.; FARLEY, M.M.; HARRISON, L.H.; BOLDEN, C.B.; BAUGHMAN, W.; STEIN, B.; HOLLICK, R.; PARK, B.J.; CHILLER, T. Species identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* bloodstream isolates from population-based surveillance studies in two U.S. cities from 2008 to 2011. **J. Clin. Microbiol.**, v. 50(11): 3435-3442, 2012.

LORETO, E.S.; SCHEID, L.A.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G.; SANTURIO, J.M.; ALVES, S.H. *Candida dubliniensis*: epidemiology and phenotypic methods for identification. **Mycopathologia**, v.169 (6), 431-43, 2010.

MORAN, G.P.; SULLIVAN, D.J.; HENMAN, M.C.; MCCREARY, C.E.; HARRINGTON, B.J.; SHANLEY, D.B.; COLEMAN, D.C. Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives *in vitro*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.41, 617-623, 1997.

MORAN, G.P.; SANGLARD, D.; DONNELLY, S.M.; SHANLEY, D.B.; SULLIVAN, D.J.; COLEMAN, D.C. Identification and expression of multidrug transporters responsible for fluconazole resistance in *Candida dubliniensis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.42, 1819–1830, 1998.

O’RIORDAN, K.; AKILOV, O.E.; HASAN, T. The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. **Photodiagn. Photodyn.**, v.2(4), 247-262, 2005.

PEREA, S.; LÓPEZ-RIBOT, J.L.; WICKES, B.L.; KIRKPATRICK, DIB, O.P.; BACHMANN, S.P.; KELLER, S.M.; MARTINEZ, M.; PATTERSON, T.F. Molecular Mechanisms of Fluconazole Resistance in *Candida dubliniensis* Isolates from Human

Immunodeficiency Virus-Infected Patients with Oropharyngeal Candidiasis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.46(6), 1695–1703, 2002.

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.**, v.10 (1), 11-23, 2004.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Azole antifungal drug cross-resistance: mechanisms, epidemiology and clinical significance. **J. Invasive Fungal Infect.**, v. 1(3), 74-92, 2007.

PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; BOYKEN, L.; RICE, C.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R.J.; DIEKEMA, D.J. Use of fluconazole as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to voriconazole among 13,338 clinical isolates of *Candida* spp. Tested by clinical and laboratory standards institute-recommended broth microdilution methods. **J. Clin. Microbiol.**, v.45(1), 70-5, 2007.

PFALLER, M.A.; ESPINEL-INGROFF, A.; BUSTAMANTE, B.; CANTON, E.; DIEKEMA, D.J.; FOTHERGILL, A.; FULLER, J.; GONZALEZ, G.M.; GUARRO, J.; LASS-FLORL, C.; LOCKHART, S.R.; MARTIN-MAZUELOS, E.; MEIS, J.F.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PELAEZ, P.; SAINT-GERMAIN, G.; TURNIDGE, J. Multicenter study of anidulafungin and micafungin MIC distributions and epidemiological cutoff values for eight *Candida* species and the CLSI M27-A3 broth microdilution method. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58 (2), 916-922, 2014a.

PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; DIEKEMA, D.J.; JONES, R.N.; CASTANHEIRA, M. Use of micafungin as surrogate marker to predict susceptibility and resistance to caspofungin among 3764 clinical isolates of *Candida* by use of CLSI methods and interpretative criteria. **J. Clin. Microbiol.**, v. 52(1), 108-114, 2014b.

RUHNKE, M.; SCHMIDT-WESTHAUSEN, A.; MORSCHHÄUSER, J. Development of simultaneous resistance to fluconazole in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in a patient with AIDS. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.46(2), 291-5, 2000.

SANGUINETI, M.; POSTERARO, B.; FIORI, B.; RANNO, S.; TORELLI, R.; FADDA, G. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during hospital survey of antifungal resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49(2), 668-679, 2005.

SARKAR, S.; PRIYA UPPULURI; CHRISTOPHER G. PIERCE AND JOSE L. LOPEZ-RIBOT. An *in vitro* study of sequential fluconazol and caspofungin treatment against *Candida albicans* biofilms. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.58(2), 1183-1186, 2014.

SCHEID, L.A.; MARIO, D.A.; KUBIÇA, T.F.; SANTURIO, J.M.; ALVES, S.H. *In vitro* activities of antifungal agents alone and in combination against fluconazole-susceptible and -resistant strains of *Candida dubliniensis*. **Braz. J. Infect. Dis.**, v.16, 78-81, 2012.

SINGH, S.D.; ROBBINS, N.; ZAAS, A.K.; SCHELL, W.A.; PERFECT, J.R.; COWEN, L.E. Hsp90 governs echinocandin resistance in the pathogenic yeast *Candida albicans* via calcineurin. **PLoS Pathog.** v.5 (7), e1000532, 2009.

SOUZA, R.C.; JUNQUEIRA, J.C.; ROSSONI, R.D.; PEREIRA, C.A.; MUNIN, E.; JORGE, A.O. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. **Laser Med. Sci.**, v.25 (3), 385-389, 2010.

STEVENS, D.A.; STEVENS, J.A. Cross resistance phenotypes of fluconazole-resistant *Candida* species: results with 655 clinical isolates with different methods. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 26 (3-4), 145-148, 1996.

SULLIVAN, D.J.; WESTERNENG, T.J.; HAYNES, K.A.; BENNET, .D.E.; COLEMAN, D.C. *Candida dubliniensis* sp. Nov.: phenotypic and molecular characterization of novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. **Microbiology**, v.141, 1507-1521, 1995.

SULLIVAN, D.J.; MORAN, G.; DONNELLY, S.; GEE, S.; PINJON, E.; MCCARTAN, B.; SHANLEY, D.B.; COLEMAN, D.C. *Candida dubliniensis*: an update. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.16(2), 72-76, 1999.

TARDIVO, J.P.; GIGLIO, A.; OLIVEIRA, C.S.; GABRIELLI, D.S.; JUNQUEIRA, H.C.; TADA, D.B.; SEVERINO, D.; TURCHIELLO, R.F.; BAPTISTA, M.S. Methylene blue in photodynamic therapy: from basic Mechanisms to clinical applications. **Photodiagn. Photodyn.** v.2(3), 175-191, 2005.

ZEPELIN, B.M.; NIEDERHAUS, T.; GROSS, U.; SEIBOLD, M.; MONOD, M.; TINTELNOT, K. Adherence of different *Candida dubliniensis* isolates in the presence of fluconazole. **AIDS**, v.16(9), 1237-1244, 2002.

5. DISCUSSÃO

C. dubliniensis tem uma distribuição global e está principalmente associada com candidíase oral em infectados pelo vírus HIV (vírus da imunodeficiência humana) (SULLIVAN et al., 1995). Embora a maioria dos isolados de *C. dubliniensis* serem suscetíveis aos azólicos, cepas resistentes foram recuperadas de cavidade oral de pacientes infectados com o HIV, com candidíase orofaríngea e exposição prévia ao fluconazol (MORAN et al., 1997; KIRKPATRIC et al., 1998). O uso indiscriminado de agentes antifúngicos azólicos pode ter contribuído para o desenvolvimento de microrganismos altamente resistentes, principalmente em espécies que são mais propensas a desenvolver resistência a agentes como o fluconazol (MARTINEZ et al., 2002). Testes de susceptibilidade antifúngica revelaram altos níveis de resistência aos azólicos entre isolados de *C. dubliniensis* em comparação com *C. albicans* (CHUNCHANUR et al., 2009). A substituição de *C. albicans* por *C. dubliniensis* é conhecida por ocorrer em pacientes tratados com fluconazol. A pressão antifúngica exercida por esta droga influencia a ecologia microbiana nestes pacientes, espécies que são mais capazes de se adaptar à pressão antifúngica persistem sobre aqueles que são reprimidas pelo tratamento (HAMZA et al., 2008).

Neste estudo, nós investigamos a atividade *in vitro* das equinocandinas frente duas espécies distintas (*C. dubliniensis* e *C. albicans*) e atividade das equinocandinas e azólicos frente a isolados de *C. dubliniensis* sensíveis (FS) e resistentes (FR) ao fluconazol. Em muitos estudos, tem-se observado a potente atividade das equinocandinas contra várias espécies de *Candida* tais como, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. dubliniensis* (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2003; PFALLER et al., 2011b; GARCÍA-AGUDO et al., 2012). Além disso, esta classe de antifúngicos já demonstrou atividade contra *C. dubliniensis* com menor sensibilidade ao fluconazol (PFALLER et al., 1999). No presente estudo observamos uma excelente atividade das três equinocandinas contra *C. albicans* e *C. dubliniensis* FS. Considerando os *breakpoints* estabelecidos pela M27-S4 e M27-S3, 100% dos isolados foram suscetíveis a esses antifúngicos, e uma menor sensibilidade a esses antifúngicos foi observada em *C. dubliniensis* FR, mas ainda assim, 100% dos isolados permaneceram suscetíveis. O mesmo já foi observado em isolados de *C. glabrata* resistente ao fluconazol (MARIO et al., 2012). Krause e colaboradores (2004) em uma comparação de fluconazol com anidulafungina, verificaram uma melhoria da taxa de sucesso do tratamento com o uso de anidulafungina, mesmo nos casos envolvendo espécies fluconazol sensíveis, tais

como *C. albicans* e *C. tropicalis*. Além disso, anidulafungina tem sido mostrada ativa contra biofilmes de *Candida* spp. (PEMÁM et al., 2008).

Em contraste com nosso estudo, Muller e colaboradores (2001) observaram maiores CIMs para micafungina em isolados de *C. dubliniensis* do que em *C. albicans*. No entanto, em conformidade, micafungina manteve-se ativa contra essas duas espécies de *Candida*. Estudos relatam a micafungina como tendo melhor atividade, que as demais equinocandinas, contra *C. lusitaniae* (CANTÓN et al., 2013), *C. parapsilosis* e *C. guilliermondi* (AXNER-ELINGS et al., 2011). Além disso, a micafungina tem demonstrado atividade contra *Candida* spp. resistentes aos azólicos (IKEDA et al., 2000; TAWARA et al., 2000)

A caspofungina demonstra atividade contra isolados de *C. dubliniensis* sensíveis e resistentes ao fluconazol (PFALLER et al., 1999; PEREA et al., 2002). Neste estudo foi observado um aumento das CIMs para *C. dubliniensis* resistente ao fluconazol, mesmo com esse aumento, a caspofungina permaneceu ativa frente a esse grupo, apresentando-se em conformidade com os estudos prévios. Essa diminuição da sensibilidade à caspofungina em espécies como *C. albicans* e *C. krusei* é atribuída a mutações no gene Fks1, gene que codifica a enzima 1,3- β D-glucana-sintase (PARK et al., 2005). No entanto, já se tem relato de *C. krusei* resistente às equinocandinas (HAKKI et al., 2006) e *C. parapsilosis* resistente a anidulafungina (PFALLER et al., 2013), sem alteração no gene Fks, mostrando assim que devem existir outros mecanismos de resistência ligados às equinocandinas.

Em biofilmes de *C. albicans* que foram primeiramente expostos ao fluconazol, foram observadas diminuição da eficácia das equinocandinas. A diminuição da atividade antifúngica do fluconazol foi dependente da concentração do mesmo, em concentrações elevadas, observou-se uma maior resistência à caspofungina. Além disso, foi observado que vários isolados clínicos de *C. albicans* após tratamento com fluconazol também evidenciaram maior resistência à caspofungina, mas o mesmo não foi observado *C. glabrata* e *C. dubliniensis*. Este fenômeno está relacionado à indução de respostas ao estresse celular mediadas por Hsp90 (SARKAR et al., 2014). Hsp90 possui um importante papel na mediação da resistência fúngica, na tolerância as equinocandinas e potencializa a resistência aos azólicos em *C. albicans* (SINGH et al., 2009).

Os azólicos, tem demonstrado boa atividade frente aos isolados de *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. (PFALLER et al., 2013) e em espécies de *Candida* resistentes ao fluconazol (JOHNSON & KAUFFMAN, 2003). Itraconazol, voriconazol e posaconazol são ativos contra isolados de *C. dubliniensis* sensíveis ao fluconazol (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2003; PFALLER et al., 2004b; ESPINEL-INGROFF et al., 2005), e isolados de *C. dubliniensis*

resistente ao fluconazol (MORAN et al., 1997, KIRKPATRICK et al., 1998). Mas, estudos já observaram resistência cruzada entre os triazólicos em isolados de *C. dubliniensis* (SCHEID et al., 2012; PFALLER et al., 2013). Neste estudo, foi bem evidenciada resistência cruzada de fluconazol com itraconazol nos isolados de *C. dubliniensis* resistentes ao fluconazol. O que vai de conformidade com estudos realizados por Cartledge e colaboradores (1997) e Cuenca-Estrella e colaboradores (1999), mas contraria o estudo documentado de Perea e colaboradores (2002), onde não foi observada resistência cruzada com itraconazol em isolados de *C. dubliniensis* resistentes ao fluconazol. A resistência cruzada com voriconazol não foi observada se utilizarmos os parâmetros do documento M27-S3, ocorrendo somente uma diminuição da suscetibilidade para esse antifúngico. No entanto, quando utilizado o *cutoff* epidemiológico, é observada resistência cruzada com voriconazol em 22,7% dos isolados, o posaconazol foi 100% ativo frente aos grupos estudados, com base nos *cutoff* epidemiológico.

Estudos moleculares mostraram que o mecanismo de resistência primária de isolados de *C. dubliniensis* resistentes ao fluconazol obtidas *in vitro* é a regulação positiva dos principais mediadores Mdr1p (MORAN et al., 1998; PEREA et al., 2002), os genes MDR1 parece ser específico para fluconazol, enquanto que genes CDR parecem remover da célula fúngica uma gama de antifúngicos azólicos (SANGLARD et al., 1995; MORAN et al., 1998; WHITE et al., 1998). A regulação positiva concomitante dos genes CDR e ERG11 foi encontrado em isolados de *C. dubliniensis* resistentes ao fluconazol (PEREA et al., 2002). A resistência cruzada de fluconazol com outros azólicos é um achado incomum em isolados de *C. dubliniensis* resistentes (SULLIVAN et al., 2004). Tem-se relatos *Aspergillus fumigatus*, isolado de paciente com fibrose cística em tratamento com itraconazol, multi-resistente aos azólicos (itraconazol, posaconazol, voriconazol, ravuconazol), mas suscetíveis a anfotericina B e caspofungina (ARENDRUP et al., 2008).

As infecções causadas por espécies menos frequentes de *Candida* têm aumentado nos últimos anos (DIEKEMA et al., 2009) e tem-se tornado uma importante causa de infecções hospitalares, afetando principalmente pacientes imunocomprometidos (STEFFAN et al., 1997). Estas infecções mostram uma alta taxa de mortalidade (STEFFAN et al. 1997; ST-GERMAIN et al., 2001; PEMÁN et al., 2005). Assim, ao invés deste estudo definir conhecimentos, levanta-se questionamentos da falta de definições para espécies importantes como *C. rugosa*, *C. lusitaniae*, *C. nivariensis* e *C. bracarensis*. É oportuno enfatizar que fungemia devido a espécie *C. rugosa* pode estar associada com uma alta taxa de mortalidade (BHERA et al., 2010) e continua a ser uma causa frequente de infecção da corrente sanguínea

(MINCES et al., 2009). Estudos sugerem que isolados *C. rugosa* podem apresentar sensibilidade diminuída ao fluconazol e ao voriconazol (PFALLER et al., 2006b; PFALLER et al., 2010),

Outra espécie importante é *C. lusitaniae* que tem sido associada com uma alta taxa de mortalidade (CLANCY et al., 1996) e com candidemia, principalmente em pacientes com doenças malignas hematológicas, também foi classificado como um agente de surtos nosocomiais (ATKINSON et al., 2008; DIMOPOULOS et al., 2008). *C. lusitaniae* possui propensão a desenvolver resistência a anfotericina B durante a terapia (PAPPAGIANIS et al., 1979; MINARI et al., 2001; FAVEL et al., 2003) e resistência aos azólicos (NGUYEN et al., 1996; MINARI et al., 2001; LOCKHART et al., 2012) e a caspofungina (DESNOS-OLLIVIER et al., 2011) também já foram relatadas.

Na mesma linha de reduzida sensibilidade e sérias dificuldades terapêuticas e com crescentes taxas de mortalidade, inclui-se *C. nivariensis* e *C. bracarensis*, dois novos patógenos emergentes (ALCOBA-FLOREZ et al., 2005; WARREN et al., 2010). *Candida nivariensis* tem sido relatada como fluconazol resistente (FUJITA et al., 2007) e é importante ressaltar que essa espécie tem sido descrita com menor sensibilidade a agentes antifúngicos azólicos e flucitocina, quando comparado com *C. glabrata* (BORMAN et al., 2008). Para *C. bracarensis*, já foi-se observado um isolado com elevado CIM para anfotericina (LOCKHART et al., 2009).

Além do exposto acima, com os novos *breakpoints* estabelecidos questiona-se ainda como fica a interpretação dos testes comercialmente disponíveis (E-test, sensititre yeast-one) e anteriormente aprovados para uso clínico, pois, por ocasião de sua aprovação baseou-se na correlação com os *breakpoints* gerais da M27-S3. Logo, é preciso que sejam avaliados e comparados por métodos de referência para comprovar a confiabilidade dos resultados das CIMs (BOURGEOIS et al., 2014).

6. CONCLUSÃO

A avaliação da suscetibilidade de *C. dubliniensis* aos antifúngicos permitiu verificar que:

- *C. albicans* foi sensível às equinocandinas, voriconazol, itraconazol e ao posaconazol, com base nos documentos M27-S4, M27-S3 e no *cutoff* epidemiológico, respectivamente.
- *C. dubliniensis* fluconazol sensível foi sensível às equinocandinas, voriconazol e itraconazol com base no M27-S3 e sensível ao posaconazol com base no *cutoff* epidemiológico. No entanto, ao considerar *cutoff* epidemiológico para micafungina, observou-se 9,09% de isolados não sensíveis a esse antifúngico.
- *C. dubliniensis* fluconazol resistente foi sensível às equinocandinas, ao voriconazol, porém foi 100% resistente ao itraconazol com base no M27-S3 e foi sensível ao posaconazol com base no *cutoff* epidemiológico. Ao considerar os *cutoffs* epidemiológicos para anidulafungina, micafungina e voriconazol observou-se 4,54%, 31,08% e 22,7% de isolados não sensíveis a esses antifúngicos, respectivamente.
- Anidulafungina e micafungina apresentaram menores CIMs do que caspofungina. Entre os azólicos as menores CIMs, foram observadas para o posaconazol.
- Ao interpretar as CIMs, tomando-se por base os *cutoffs* epidemiológicos, houve diferença nas interpretações dos perfis de suscetibilidade, isolados anteriormente classificados como sensíveis passaram a ser classificados como resistentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; CASTELLI, M.V.; CUESTA, I.; ZARAGOZA, O.; MONZÓN, A.; MELLADO, E.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J.L. *In vitro* activity of antifungals against Zygomycetes. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.15, 71-76, 2009.

ALCOBA-FLOREZ, J.; MENDEZ-ALVAREZ, S.; CANO, J.; GUARRO, J.; PEREZ-ROTH, E.; DEL PILAR, A.M. Phenotypic and molecular characterization of *Candida nivariensis* sp. nov., a possible new opportunistic fungus. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, 4107–4111, 2005.

ALVES, S.H.; MILAN, E.P.; BRANCHINI, M.L.; NISHIMURA, K.; FUKUSHIMA, K.; OLIVEIRA, L.O.; COSTA, J.M.; COLOMBO, A.L. First isolation of *Candida dubliniensis* in Rio Grande do Sul, Brazil. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.39, 165-168, 2001.

ALVES, S. H.; MILAN, E. P.; LAET SANT'ANA, P.; OLIVEIRA, L. O.; SANTURIO, J. M.; COLOMBO, A. L. Hypertonic Sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 43, 85–86, 2002.

ALVES, S.H.; LORETO, E.S.; LINARES, C.E.; SILVEIRA, C.P.; SCHEID, L.A.; PEREIRA, D.B.; SANTURIO, J.M. Comparison among tomato juice agar with other three media for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v.48, 119-121, 2006.

ANDRIOLE, V.T. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 44, 151-162, 1999.

ANTONIADOU, A.; TORRES, H.A.; LEWIS, R.E.; THORNBYS, J.; BODEY, G.P.; TARRAND, J.P.; et al. Candidemia in a tertiary care cancer center: in vitro susceptibility and its association with outcome of initial antifungal therapy. **Medicine (Baltimore)**, v.82, 309-321, 2003.

ARENDRUP, M.C.; PERKHOFER, S.; HOWARD, S.J.; GARCIA-EFFRON, G.; VISHUKUMAR, A.; PERLIN, D.; LASS-FLORL, C. Establishing *in vitro*–*in vivo* correlations for *Aspergillus fumigatus*: the challenge of azoles versus echinocandins. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.52, 3504–3511, 2008.

ARENDRUP, MC. Epidemiology of invasive candidiasis. **Curr. Opin. Crit. Care**, v.16, 445-452, 2010.

ARENDRUP, M.C.; BRUUN, B.; CHRISTENSEN, J.J.; FUURSTED, K.; JOHANSEN, H.K.; KJAELDGAARD, P.; KNUDSEN, J.D.; KRISTENSEN, L.; MØLLER, J.; NIELSEN, L.; ROSENVINGE, F.S.; RØDER, B.; SCHØNHEYDER, H.C.; THOMSEN, M.K.; TRUBERG, K. National surveillance of fungemia in Denmark (2004 to 2009). **J. Clin. Microbiol.**, v.49, 325-334, 2011.

ARRIETA, A.C.; MADDISON, P.; GROLL, A.H. Safety of micafungin in pediatric clinical trials. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.30, e97-e102, 2011.

ATKINSON, B.J.; LEWIS, R.E.; KONTOYIANNIS, D.P. *Candida lusitanae* fungemia in cancer patients: risk factors for amphotericin B failure and outcome. **Med. Mycol.**, v.46, 541–546G, 2008.

AXNER-ELINGS, M.; BOTERO-KLEIVEN, S.; JENSEN, R.H.; ARENDRUP, M.C. Echinocandin Susceptibility Testing of *Candida* Isolates Collected during a 1-Year Period in Sweden. **J. Clin. Microbiol.**, v.49, 2516-2521, 2011.

BACHMANN, S.P.; PATTERSON, T.F.; LÓPEZ-RIBOT, J.L. *In Vitro* Activity of Caspofungin (MK-0991) against *Candida albicans* Clinical Isolates Displaying Different Mechanisms of Azole Resistance. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, 2228–2230, 2002.

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

BARCHIESI, F.; SPREGHINI, E.; TOMASSETTI, S.; DELLA, V.A.; ARZENI, D.; MANSO, E.; SCALISE, G. Effects of caspofungin against *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.5, 2719–2727, 2006.

BASMA, R.; BARADA, G.; OJAIMI, N.; KHALAF, R.A. Susceptibility of *Candida albicans* to common and novel antifungal drugs, and relationship between the mating type locus and resistance, in Lebanese hospital isolates. **Mycoses**, v.52, 141-148, 2008.

BAUER, D.; MULLER, H.; REICH, J.; et al. Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). **Nucleic Acids Res.**, v.21, 4272-4280, 1993.

BHERA, B.; SINGH, R.I.; XESS, I.; MATHUR, P.; HASAN, F.; MISRA, M.C. *Candida rugosa*: a possible emerging cause of candidemia in trauma patients. **Infection**, v.38, 387-393, 2010.

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

BIGGS, W.S.; WILLIAMS, R.M. Common gynecologic infections. **Prim. Care Clin. Office Pract.** v.36, 33-51, 2006.

BLIGNAUT, E.; PUJOL, C.; JOLY, S.; SOLL, D.R. Racial distribution of *Candida dubliniensis* colonization among South Africans. **J. Clin. Microbiol.** v.41, 1838-1842, 2003.

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

BORMAN, A.M.; PETCH, R.; LINTON, C.J.; PALMER, M.D.; BRIDGE, P.D.; JOHNSON, E.M. *Candida nivariensis*, an emerging pathogenic fungus with multidrug resistance to antifungal agents. **J. Clin. Microbiol.**, v.46, 933-938, 2008.

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

BORST, A., M. T. RAIMER, D. W.; WARNOCK, C. J.; MORRISON, B. A. Rapid acquisition of stable azole resistance by *Candida glabrata* isolates obtained before the clinical introduction of fluconazole. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.49, 783-787, 2005.

BOSCO-BORGEAT, M.E.; TAVERNA, C.G.;CORDOBA, S.; ISLA, M.G.;MURISENGO,O. A.;SZUSZ, W.; VIVOT, W.;DAVEL, G. Prevalence of *Candida dubliniensis* Fungemia in Argentina: Identification by a Novel Multiplex PCR and Comparison of Different Phenotypic Methods. **Mycopathologia**, v.172, 407-414, 2011.

BOURGEOIS, N.; LAURENS, C.; BERTOUT, S.; BALARD, Y.; KRASTEVA, D.; RISPAIL, P.; LACHAUD, L. Assessment of caspofungin susceptibility of *Candida glabrata* by the Etest®, CLSI, and EUCAST methods, and detection of FKS1 and FKS2 mutations. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, [Epub ahead of print], 2014.

BRANDT, M.E.; HARRISON, L.H.; PASS, M.; et al. *Candida dubliniensis* fungemia: the first four cases in North America. **Emerg. Infect. Dis.**, v.6, 1-6, 2000.

BRIELMAIER, B.D.; CASABAR, E.; KUTZEBORN, C.M.; MCKINNON, P.S.; RITCHIE, D.J. Early clinical experience with anidulafungin at a large tertiary care medical center. **Pharmacother.**, v.28, 64-73, 2008.

BROWM, A. J., GOW, N. A. R.: Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. **Trends Microbiol.**, v.7, 333–338, 1999.

BULLEN, J.J. The significance of iron in infection. **Rev. Infect. Dis.**, v.3, 1127–1138, 1981.

CANTÓN, E.; PEMAN, J.; SASTRE, M.; ROMERO, M.; ESPINEL-INGROFF, A. Killing kinetics of caspofungin, micafungin, and amphotericin B against *Candida guilliermondii*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.50, 2829–2832, 2006.

CANTÓN, E.; PEMAN, J.; HERVAS, D.; ESPINEL-INGROFF, A. Examination of the *in vitro* fungicidal activity of echinocandins against *Candida lusitanae* by time–killing methods. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.68, 864–868, 2013.

CARTLEDGE, J.D.; MIGDLEY, J.; GAZZARD, B.G. Clinically significant azole-resistance in *Candida* isolates from HIV-positive patients with oral candidiasis. **AIDS**, v. 11(15), 1839-1844, 1997.

CASPOFUNGIN ACETATO. **Caspofungin Acetato (Cancidas)**. FDA Advisory Committee Meeting Background. Disponível em http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3676b1_02.pdf (acessado em setembro de 2012).

CASTRO, A.G. **Estudo comparativo da eficácia entre a utilização da terapia fotodinâmica (PDT) e da nistatina (MICOSTATIN) no tratamento da candidíase oral em pacientes HIV**. 2010. Dissertação (Mestrado em Odontologia) Universidade Paulista, São Paulo, 2010.

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

CHEN, S.C.; HALLIDAY, C.L.; MEYER, W. A review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic mycoses with an emphasis on polymerase chain reaction-based assays. **Med. Mycol.**, v.40, 333-357, 2002.

CHUNCHANUR, S.K.; NADGIR, S.D.; HALES, L.H.; PATIL, B.S.; KAUSAR, Y.; CHANDRASEKHAR, M.R. Detection and antifungal susceptibility testing of oral *Candida*

dublinsiensis from human immunodeficiency virus-infected patients. **Indian J. Pathol. Microbiol.**, v.52, 501-4, 2009.

CLANCY, C.J.; NGUYEN, M.H.; YU, V.L.; OKOYE, F.E. Fungemia caused by *Candida lusitanae*. **Infect. Med.**, v.13, 940-95, 1996.

CLINICAL LABORATORY AND STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Third Informational Supplement. CLSI document M27-S3. Wayne, P.A.: Clinical and laboratory Standards Institute, 2008b.

CLINICAL LABORATORY AND STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement. CLSI document M27S4. Wayne, P.A.: Clinical and laboratory Standards Institute, 2012.

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

COHEN-WOLKOWIEZ, M.; BENJAMIN, D.K. JR.; PIPER, L.; CHEIFETZ, I.M.; MORAN, C.; LIU, P.; ARAM, J.; KASHUBA, A.D.; CAPPARELLI, E.; WALSH, T.J.; HOPE, W.W.; SMITH, P.B. Safety and pharmacokinetics of multiple-dose anidulafungin in infants and neonates. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v.89, 702-707, 2011.

COLEMAN, D.C.; SULLIVAN, D.J.; BENNETT, D.E.; MORAN, G.P.; BARRY, H.J.; SHANLEY, D.B. Candidiases: the emergence of a novel species, *Candida dublinsiensis*. **AIDS**, v.11, 557-567, 1997.

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

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

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L.R.; 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. Control Hosp. Epidemiol.**, v.28, 570-576, 2007.

COSTERTON, J.W. Overview of microbial biofilms. **J. Ind. Microbiol.**, v.15, 137–40, 1995.

COURTNEY, R.; PAI, S.; LAUGHLIN, M.; LIM, J.; BATRA, V. Pharmacokinetics, safety, and tolerability of oral posaconazole administered in single and multiple doses in healthy adults. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.47, 2788–2795, 2003.

CUENCA-ESTRELLA, M.; DIAZ-GUERRA, T.M.; MELLADO, E.; MANZON, A.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. Comparative *in vitro* activity of voriconazole and itraconazole against fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant clinical isolates of *Candida* species from Spain. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.18 (6), 432-435, 1999.

DAMLE, B.D; DOWELL, J.A.; WALSKY, R.L.; WEBER, G.L.; STOGNIEW, M.; INSKEEP, P.B. *In vitro* and *in vivo* studies to characterize the clearance mechanism and potential cytochrome P450 interactions of anidulafungin. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.53, 1149-1156, 2009.

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

DERESINSKI, S. C.; STEVENS, D. A. Caspofungin. **Clin. Infect. Dis.**, v.36: 1445-57, 2003.

DESNOS-OLLIVIER, M.; MOQUET, O.; CHOUAKI, T.; GUÉRIN, A.M.; DROMER, F. Development of echinocandin resistance in *Clavispora lusitaniae* during caspofungin treatment. **J. Clin. Microbiol.**, v.49, 2304–2306, 2011.

DIDOMENICO, B. Novel antifungal drugs. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.2, 509-515, 1999.
DIEKEMA, D.J.; MESSER, S.A.; BOYKEN, L.B.; HOLLIS, R.J. KROEGER, J.; TENDOLKAR, S.; PFALLER, M.A. *In vitro* activity of seven systemically active antifungal agents against a large global collection of rare *Candida* species as determined by CLSI broth microdilution methods. **J. Clin. Microbiol.**, v.47, 3170-3177, 2009.

DIEKEMA, D.J.; MESSER, S.A.; BOYKEN, L.B.; HOLLIS, R.J.; KROEGER, J.; TENDOLKAR, S.; PFALLER, M.A. *In vitro* activity of seven systemically active antifungal agents against a large global collection of rare *Candida* species as determined by CLSI broth microdilution methods. **J. Clin. Microbiol.**, v.47, 3170-3177, 2009.

DIMOPOULOS, G.; NTZIORA, F.; RACHIOTIS, G.; ARMAGANIDIS, A.; FALAGAS, M.E. *Candida albicans* versus non-*albicans* intensive care unit-acquired bloodstream infections: differences in risk factors and outcome. **Anesth. Analg.**, v.106, 523–529, 2008.

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

DORING, M.;BLUME, O.;HAUFE, S.;HARTMANN, U.; KIMMING, A.;SCHWARZE, C.P.;LANG, P.; HANGRETINGER, R.;MULLER, I. Comparison of itraconazole, voriconazole, and posaconazole as oral antifungal prophylaxis in pediatric patients following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.33, 629-638, 2014.

DOUGLAS, C. Fungal beta (1,3)-D-glucan synthesis. **Med. Mycol.**, v.39, 55-66, 2001.

DOUGLAS, L. J. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends Microbiol.**, v.11, 30–36 2003.

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

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.**, v.47, 461-470, 2007.

DROGARI-APIRANTHITOU, M.; MANTOPOULOU, F.D.; SKIADA, A.; KANIOURA, L.; GRAMMATIKOU, M.; VRIONI, G.; MITROUSSIA-ZIOUVA, A.; TSAKRIS, A.; PETRIKKOS, G. *In vitro* antifungal susceptibility of filamentous fungi causing rare infections: synergy testing of amphotericin B, posaconazole and anidulafungin in pairs. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.67, 1937-1940, 2012.

ELLEPOLA, A.N.B.; SAMARANAYAKE, L.P. Oral *Candida* infections and antimycotics. **Crit.Rev.Oral Biol.Med.**, v.11, 172-198, 2000.

ELLEPOLA, A.N.; MORRISON, C.J. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. **J. Microbiol.**, v.43, 65-84, 2005.

ELLEPOLA, A.N.B.;KHAN, Z.U.; JOSEPH, B.;CHANDY, R.; PHILIP, L. Prevalence of *Candida dubliniensis* among oral *Candida* isolates in patients attending the Kuwait University Dental Clinic. **Med. Princ. Pract.** v.20, 271–276, 2011.

ESPINEL-INGROFF, A. Comparison of *in vitro* activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (1-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. **J. Clin. Microbiol.** v.36, 2950-2956, 1998.

ESPINEL-INGROFF, A.; BARCHIESI, F.; CUENCA-ESTRELLA, M.; PFALLER, M.A.; RINALDI, M.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; VERWEIJ, P.E. International and Multicenter of EUCAST and CLSI M27-A2 broth comparison microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. **J. Clin. Microbiol.**, v.43,3884-3889, 2005.

FAGGI, E.; PINI, G.; CAMPISI, E.; MARTINELLI, C.; DIFONZO, E. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus infected and non-infected patients end in a yeast culture collection. **Mycoses**, v.48, 211-215, 2005.

FAN-HAVRAD, P.; CAPANO, D.; SMITH, S.M.; MANGIA, A.; ENG, R.H.K. Development of resistance in *Candida* isolates from patients receing prolonged antifungal therapy. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.35, 2302-2305, 1991.

FAVEL, A.; MICHEL-NGUYEN, A.; PEYRON, F.; MARTIN, C.; THOMACHOT, L.; DATRY, A.; BOUCHARA, J.P.; CHALLIER, S.; NOËL, T.; CHASTIN, C.; REGLI, P. Colony morphology switching of *Candida lusitanae* and acquisition of multidrug resistance during treatment of a renal infection in a newborn: case report and review of the literature. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.47, 331–339, 2003.

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

FERREIRA, A.V.; PRADO, C.G.; CARVALHO, R.R.; DIAS, K.S.T.;DIAS, A.L.T. *Candida albicans* and Non-*C. albicans* *Candida* Species: Comparison of Biofilm Production and Metabolic Activity in Biofilms, and Putative Virulence Properties of Isolates from Hospital Environments and Infections. **Mycopathologia**, v.175, 265–272, 2013.

FINKEL, J. S.; MITCHELL, A. P. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 9, 109–118, 2011.

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

FOTEDAR, R.; AL-HEDAITHY, S.S. *Candida dubliniensis* at a University in Saudi Arabia. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, 1907-1911, 2003.

FOTEDAR, R.; AL-HEDAITHY, S.S. Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. **Mycoses**, v.48, 62-67. 2005.

FUJITA, S.; SENDA, Y.; IWAGAMI, T.; MIYAZAKI, H.; OOTA, Y.; TAKADA, H.; YAMADA, K.; KAWANO, M. Catheter-related fungemia due to fluconazole-resistant *Candida nivariensis*. **J. Clin. Microbiol.**, v.45, 3459-3461, 2007.

GARCÍA-AGUDO, L.; GARCÍA-MARTOS, P.; MARTOS-CAÑADAS, J.; AZNAR-MARÍN, P.; MARÍN-CASANOVA, P.; RODRÍGUEZ-IGLESIAS, M. Evaluation of the Sensititre Yeast One microdilution method for susceptibility testing of *Candida* species to anidulafungin, caspofungin, and micafungina. **Rev. Esp. Quimioter.**, v. 25, 256-260, 2012.
GARCÍA-GONZALÉZ, C.; MEHLIS, A.M.; GARCÍA-RODRIGUEZ, J. Prevalence of *Candida dubliniensis* in a tertiary hospital in Madrid. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clín.**, v.29, 159-160, 2011.

GARG, A.; SINGH, S. Enhancement in antifungal activity of Eugenol in immunosuppressed rats through lipid nanocarriers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 87, 280-288, 2011.

GE, Y.P.; HE, G.X.; LIN, T.; LU, G.X.; SHEN, Y.N.; LIU, W.D. First Isolation of *Candida dubliniensis* from Oral Cavities of Dermatological Patients in Nanjing, China. **Mycopathologia**, v. 172, 465-471, 2011.

GEORGOPAPADAKOU, N.H. Update on antifungals targeted to the cell wall: focus on beta-1,3-glucan synthase inhibitors. **Expert. Opin. Invest. Drugs.**, v.10, 269-280, 2001.

GHANNOUM, M.A.; RICE, L.B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.12, 501-517, 1999.

GIANNINI, P.J.; SHETTY, K.V. Diagnosis and management of oral Candidiasis. **Otolaryngol Clin. North Am.**, v.44, 231-240, 2011.

GILFILLAN, G.D.; SULLIVAN, D.J.; HAYNES, K.; PARKINSON, T.; COLEMAN, D.C.; GOW, N.A. *C. dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. **Microbiology**, v.144, 829-838, 1998.

GOLDANI LZ, SUGAR AM. Treatment of murine pulmonary mucormycosis with SCH 42427, a broad-spectrum triazole antifungal drug. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.33, 369–372, 1994.

GOZALBO, D.; ROIG, P.; VILLAMÓN, E.; GIL, M.L. *Candida* and Candidiasis: The cell wall as a potential molecular target for antifungal therapy. **Curr. Drug. Targets Infect. Disord**, v.4, 117–135, 2004.

GREENBERG, R.N.; MULLANE, K.; VAN-BURIK, J.A.; RAAD, I.; ABZUG, M.J.; ANSTEAD, G.; HERBRECHT, R.; LANGSTON, A.; MARR, K.A.; SCHILLER, G.; SCHUSTER, M.; WINGARD, J.R.; GONZALEZ, C.E.; REVANKAR, S.G.; CORCORAN, G.; KRYSCIO, R.J.; HARE, R. Posaconazole as salvage therapy for zygomycosis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.50, 126–133, 2006.

GROLL, A. H.; PISCITELLI, S.C.; WALSH, T.J. Clinical pharmacology of systemic antifungal agents: a comprehensive review of agents in clinical use, current investigation compounds, and putative targets for antifungal drug development. **Adv. Pharm.**, v. 44, 343–500, 1998.

GUBBINS, P.O.; ANAISSIE, E.J. Overview of antifungal agents 2006. **IDSE**, v. 9, 7-12, 2006.

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**, v.43, 179–185, 2005.

HACHEM, R.Y.; RAAD, I.I.; AFIF, C.M.; NEGRONI, R.; GRAYBILL, J.; HADLEY, S.; KANTARJIAN, H.; ADAMS, S.; MUKWAYA, G. An open, non-comparative multicenter study to evaluate efficacy and safety of posaconazole (SCH 56592) in the treatment of invasive fungal infections (IFI) refractory (R) to or intolerant (I) to standard therapy (ST). In: Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 40, 2000, Toronto (Canada). **Resumo**. 2000, p. 372.

HAJJEH, 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.; BENJAMIN, L.E.; SANZA, L.T.; HUIE, S.; YEO, S.F.; 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.**, v.42, 1519–1527, 2004.

HAKKI, M.; STAAB, J.F.; MARR, K.A. Emergence of a *Candida krusei* isolate with reduced susceptibility to caspofungin during therapy. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.50: 2522–2524, 2006.

HAMZA, O.J.; MATEE, M.I.; MOSHI, M.J.; SIMON, E.N.; MUGUSI, F.; MIKX, F.H.; HELDERMAN, W.H.; RIJS, A.J.; VAN DER VEN, A.J.; VERWEIJ, P.E. Species distribution and in vitro antifungal susceptibility of oral yeast isolates from Tanzanian HIV-infected patients with primary and recurrent oropharyngeal candidiasis. **BMC Microbiol.**, v.8, 135, 2008.

HANNULA, J.; SAARELA, M.; DOGAN, B.; PAATSAMA, J.; KOUKILA-KAHKOLA, P.; PIRINEM, S.; ALAKOMI, H.L.; PERHEENTUPA, J.; ASIKAINEN, S. Comparison of virulence factors of oral *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates in healthy people and patients with chronic candidosis. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.15, 238-244, 2000.

HAYNES, K. Virulence in *Candida* species. **Trends Microbiol.**, v. 9, 591-596, 2001.
HERESI, G.P.; GERSTMANN, D.R.; REED, M.D.; VAN DEN ANKER, J.N.; BLUMER, J.L.; KOVANDA, L.; KEIRNS, J.J.; BUELL, D.N.; KEARNS, G.L. The pharmacokinetics and safety of micafungin, a novel echinocandin, in premature infants. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.25, 1110-1115, 2006.

HIEMENZ, J.; CAGNONI, P.; SIMPSON, D.; DEVINE, S.; CHAO, N.; KEIRNS, J.; LAU, W.; FACKLAM, D.; BUELL, D. Pharmacokinetic and maximum tolerated dose study of micafungin in combination with fluconazole versus fluconazole alone for prophylaxis of fungal infections in adult patients undergoing a bone marrow or peripheral stem cell transplant. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, 1331-1336, 2005.

HOYER, L. L. The ALS gene family of *Candida albicans*. **Trends Microbiol.**, v. 9, 176–180, 2001.

IKEDA, F.; WAKAI, Y.; MATSUMOTO, S.; MAKI, K.; WATABE, E.; TAWARA, S. Efficacy of FK463, a new lipopeptide antifungal agent, in mouse models of disseminated candidiasis and aspergillosis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.44, 614-618, 2000.

IWAMOTO, T.; FUJIE, A.; SAKAMOTO, K.; TSURUMI, Y.; SHIGEMATSU, N.; YAMASHITA, M.; HASHIMOTO, S. OKUHARA, M.; KOHSAKA, M. WF11899A, B and C, novel antifungal lipopeptides, I: Taxonomy, fermentation, isolation and physico-chemical properties. **J. Antibiot.**, v.47, 1084-1091, 1994.

JABRA-RIZK, M.A.; FALKLER, W.A.; MERZ, W.G.; BAQUI, A.A.M.A.; KELLEY, J.I.; MEILLER, T.F. Cell surface hydrophobicity-associated of *Candida dubliniensis* to human buccal epithelial cells. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.18, 17-22, 2001.

JABRA-RIZK, M.A.; FALKLER, W.A.; MEILLER, T.F. Fungal biofilms and drug resistance. **Emerg. Infect. Dis.**, v.10, 14–19, 2004.

JABRA-RIZK, M.A.; JOHNSON, J.K.; FORREST, G.; MANKES, K.; MEILLER, T.F.; VENEZIA, R. A. Prevalence of *Candida dubliniensis* Fungemia at a Large Teaching Hospital. **Clin. Infect. Dis.**, v.41, 1064-167, 2005.

JACOBSEN, M.D.; WHYTE, J.A.; ODDS, F.C. *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* respond differently to echinocandin antifungal agents in vitro. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.51, 1882-1884, 2007.

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

JEWTOUCHOWICZ, V.M.; MUJICA, M.T.; BRUSCA, M.I.; SORDELLI, N.; MALZONE, M.C.; POLA, S.J.; IOVANNITTI, C.A.; ROSA, A.C. Phenotypic and genotypic identification of *Candida dubliniensis* from subgingival sites in immunocompetent subjects in Argentina. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.23, 505–509, 2008.

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

JOHNSON, M. D.; MACDOUGALL, C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PERFECT, J.R.; REX, J.H.; Combination antifungal therapy. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.48: 693-715, 2004.

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

KANAFANI, Z.A.; PERFECT, J.R. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clin. Infect. Dis.**, v.46, 120-128, 2008.

KARLSSON, M.O.; LUTSAR, I.; MILLIGAN, P.A. Population pharmacokinetic analysis of voriconazole plasma concentration data from pediatric studies. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.53, 935-944, 2009.

KARTSONIS, N.; DINUBILE, M.J.; HICKS, P.S.; RYAN, S.; SABLE, C.A. Efficacy of caspofungin in the treatment of esophageal Candidiasis resistant to fluconazole. **JAIDS**, v.31, 183-187, 2002.

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

KHAN, Z.; AHMAD, S.; JOSEPH, L.; CHANDY, R. *Candida dubliniensis*: An Appraisal of Its Clinical Significance as a Bloodstream Pathogen. **Plosone**, v.7, e32952, 2012.

KIBBLER, C.C.; SEATON,S.; BARNES,R.A.; GRANSDEN,W.R.; HOLLIMAN,R.E.; JOHNSON,E.M.; PERRY,J.D.; SULLIVAN,D.J.; WILSON,J.A. Management and outcome of bloodstream infections due to *Candida* species in England and Wales. **J. Hosp. Infect.**,v.54, 18-24, 2003.

KIRKPATRIC, W.R.; REVANKAR, S.G.; MCATEE, R.K.; LO'PEZ-RIBOT, J.L.;FOTHERGILL, A.W.; MCCARTHY, D.I.; SANCHE, S.E.; CANTU, R.A.; RINALDI, M.G.; PATTERSON, T.F. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in North America by primary CHROMagar *Candida* screening and susceptibility testing of isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, 3007–3012, 1998.

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

KRAUSE, D. S.; REINHARDT, J.; VAZQUEZ, J..A.; REBOLI, A.; GOLDSTEIN, B.P; WIBLE, M.; HENKEL, T. Phase 2, randomized, dose-ranging study evaluating the safety and efficacy of anidulafungin in invasive candidiasis and candidemia. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.48, 2021-2024, 2004.

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

KONDORI, N.; SVENSSON, E.; MATTSBY-BALTZER, I. *In vitro* susceptibility of filamentous fungi to itraconazole, voriconazole and posaconazole by Clinical and Laboratory Standards Institute reference method and E-test. **Mycoses**, v.54, 318-322, 2011.

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.**, v.20, 349-353, 2005.

KURTZ, M.B.; REX, J.H.; Glucan synthase inhibitors as antifungal agents. **Adv. Protein. Chem.** v.56, 423-475, 2001.

LACASSIN, F.; DAMOND, F.; CHOCHILLON, C.; LONGUET, P.; LEBRAS, J.; VILDE, J.L.; LEPORT, C. Response to fluconazole by 23 patients with human immunodeficiency virus infection and oral candidiasis: pharmacological and mycological factors. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.40, 1961-1963, 1996.

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

LAVERDIERE, M.; LALONDE, R.G.; BARIL, J.; SHEPPARD, D.C.; PARK, S.; PERLIN, D.S. Progressive loss of echinocandin activity following prolonged use for treatment of *Candida albicans* esophagitis. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 57, 705-708, 2006.

LEONHARD, M.; MOSER, D.; REUMUELLER, A.; MANCUSI, G.; BIGENZAHN, W.; SCHNEIDER-STICKLER, B. Comparison of biofilm formation on new phonax and provox 2 voice prostheses -a pilot study. **Head Neck**, v.32, 886–895, 2010.

LEWIS, R.E.; KONTOYIANNIS, D.P. Rationale for combination antifungal therapy. **Pharmacother.**, v.21, 149-164, 2001.

LOCKHART, S.R.; MESSER, S.A.; GHERNA, M.; BISHOP, J.A.; MERZ, W.G.; PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Identification of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in a large global collection of *Candida glabrata* isolates: comparison to the literature. **J. Clin. Microbiol.**, v.47, 1216-1217, 2009.

LOCKHART, S.R.; IQBAL, N.; CLEVELAND, A.A.; FARLEY, M.M.; HARRISON, L.H.; BOLDEN, C.B.; BAUGHMAN, W.; STEIN, B.; HOLLICK, R.; PARK, B.J.; CHILLER, T. Species identification and antifungal susceptibility of *Candida* bloodstream isolates from population-based surveillance in two US cities: 2008–2011. **J. Clin. Microbiol.**, v.50, 3435–3442, 2012.

LORETO, E.S.; POZZATTI, P.; SCHEID, L.A.; SANTURIO, D.; SANTURIO, J.M.; ALVES, S.H. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Rosemary Extract Agar and Oregano Extract Agar. **J. Clin. Lab. Anal.**, v.22, 172–177, 2008.

MAESAKI, S.; HOSSAIN, M.A.; MIYAZAKI, Y.; TOMONO, K.; TASHIRO, T.; KOHNO, S. Efficacy of FK463, a (1,3)- β -D-glucan synthase inhibitor, in disseminated azole-resistant *Candida albicans* infection in mice. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, 1728-1730, 2000.

MÄHNß, B.; STEHR, F.; SCHAFFER, W.; NEUBER, K. Comparison of standard phenotypic assays with a PCR method to discriminate *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. **Mycoses**, v.48, 55-61, 2005.

MANN, J.M.; MOSSER, D.M.; BUCKLEY, H.R. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, v.62, 5154–5156, 1994.

MARICHAL, P.; VANDEM BOSSCHE, H. Mechanisms of resistance to azoles antifungals. **Acta Biochim. Pol.**, v.42, 509-516, 1995.

MARIO, D.A.N.; DENARDI, L.B.; BANDEIRA, L.A.; ANTUNES, M.S.; SANTURIO, J.M.; SEVERO, L.C.; ALVES, S.H. The activity of echinocandins, amphotericin B and voriconazole against fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant Brazilian *Candida glabrata* isolates. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.107, 433-436, 2012.

MARTINEZ, M.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; KIRKPATRICK, W.R.; COCO, B.J.; BACHMANN, S.P.; PATTERSON, T.F. Replacement of *Candida albicans* with *C. dubliniensis* in human immunodeficiency virus infected patients with oropharyngeal candidiasis treated with fluconazole. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, 3135–9, 2002.

MASUREKAR, P.S.; FOUNTOULAKIS, J.M.; HALLADA, T.C.; SOSA, M.S.; KAPLAN, L. Pneumocandins from *Zalerion arboricola*, II: modification of product spectrum by mutation and medium manipulation. **J. Antibiot.**, v. 45, 1867-1874, 1992.

MATTEI, A.S. ***Candida albicans* versus *C.dubliniensis*: identificação, virulência, perfil de suscetibilidade antifúngica e epidemiologia dos casos clínicos de candidose sistêmica diagnosticados em um hospital de Porto Alegre-RS**. 2013. 123f. Tese (Doutorado em Ciências Pneumológicas)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

MILAN, E.P; COLOMBO, A.L.; LAETSANT`ANA, P.; MELO, A. Primeiro isolamento da *Candida dubliniensis* no Brasil. In: Congresso Brasileiro de Infectologia, 11, 1999, São Paulo. **Resumo**. p.32.

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

MINCES, L.R.; HO, K.S.; VELDKAMP, P.J.; CLANCY, C.J. *Candida rugosa*: a distinctive emerging cause of candidaemia. A case report and review of the literature. **Scand. J. Infect. Dis.**, v.41, 892-897, 2009.

MISHRA, N.N.; PRASAD, T.; SHARMA, N.; PAYASI, A.; PRASAD, R.; GUPTA, D.K.; SINGH, R. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. **Acta Microbiol. Immunol. Hungar.**, v.54, p. 201–235, 2007.

MOKADDAS, E.; KHAN, Z.U.; AHMAND, S. Prevalence of *Candida dubliniensis* among cancer patients in Kuwait: a 5-year retrospective study. **Mycoses**, v. 54, p.29-34, 2011.

MORAN, G.P.; SULLIVAN, D.J.; HENMAN, M.C.; MCCREARY, C.E.; HARRINGTON, B.J.; SHANLEY, D.B.; COLEMAN, D.C. Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from Human Immunodeficiency Virus (HIV)-infected and non- HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives *in vitro*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, p.617-623, 1997.

MORAN, G.P.; SANGLARD, D.; DONNELLY, S.M.; SHANLEY, D.B.; SULLIVAN, D.J.; COLEMAN, D.C. Identification and expression of multidrug transporters responsible for fluconazole resistance in *Candida dubliniensis*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.42, p.1819-1830, 1998.

MORAN, G.P.; STOCKES, C.; THEWES, S.; HUBE, B.; COLEMAN, D.C.; SULLIVAN, D. Comparative genomics using *Candida albicans* DNA microarrays reveals absence and divergence of virulence associated genes in *Candida dubliniensis*. **Microbiology**, v.150, p.3363-3382, 2004.

MORAN, G.P.; COLEMAN, D.C.; SULLIVAN, D.J. *Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: Why Is *C. albicans* More Pathogenic?. **Int. J. Microbiol.**, v.2012, 7p., 2012.
MOSCA, C.O.; MORAGUES, M.D; BRENA, S.; ROSA, A.C.; PONTON, J. Isolation of *Candida dubliniensis* in a teenager with denture stomatitis. **Med. Oral. Patol. Oral Cir. Bucal**, v.10, p.28-31, 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.**, v.49, p.767-769, 2005.

MULLER, F.M.C.; KURZAI, O.; HACKER, J.; FROSCH, M.; MUHLSCHLEGEL, F. Effect of the growth medium on the *in vitro* antifungal activity of micafungina (FK463) against clinical isolates of *C. dubliniensis*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.48, 713-715, 2001.

NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S. J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartil proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 67, p.400–428, 2003.

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

NEELY, M.; RUSHING, T.; KOVACS, A.; JELLIFFE, R.; HOFFMAN, J. Voriconazole pharmacokinetics and pharmacodynamics in children. **Clin. Infect. Dis.**, v.50, p.27-36, 2010.

NGUYEN, M.H.; MORRIS, A.J.; DOBSON, M.E.; SNYDMAN, D.R.; PEACOCK, J.E.; RINALDI, M.G.; YU, V.L. *Candida lusitanae* an important emerging pathogen. **Infect. Dis. Clin. Pract.**, v.5, 273–278, 1996.

NIEWRTH, M.; KORTING, H. C. Phospholipases of *Candida albicans*. **Mycoses**, v.44, p.361–367, 2001.

NONAKA, C.; NASCIMENTO, G.; GOULART FILHO, J.; LIMA, K.; MILAN, E. *Candida dubliniensis* – levedura emergente associada à candidose oral. **Rev. Odontol. UNESP**, v.37, p.125-132, 2008.

NYFELER, R.; KELLER, S.W. Metabolites of microorganisms, 143 echinocandin B, a novel polypeptide-antibiotic from *Aspergillus nidulans* var *echinulatus* – isolation and structural components. **Helv. Chim. Acta.**, v.57, p.2459- 2477, 1974.

ODDS, F.C.; NUFFEL, L.V.; DAMS, G. Prevalence of *C. dubliniensis* isolates in a yeast stock collection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p.2869-2873, 1998.

O’RIORDAN, K.; AKILOV, O.E.; HASAN, T. The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. **Photodiagn. Photodyn.**, v.2, p.247-262, 2005.

OROZCO, A.S.; HIGGINBOTHAN, L.M.; HITCHCOCK, C.A.; PARKINSON, T.; FALCONER, D.; IBRAHIM, A.S.; GHANNOUM, M.A.; FILLER, S.G. Mechanisms of fluconazole resistance in *Candida krusei*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.42, p.2645-2649, 1998.

OSHEROV, N.; MAY, G.S.; ALBERT, N.D.; KONTOYIANNIS, D.P. Overexpression of Sbe2p, a Golgi protein, results in resistance a caspofungina in *Saccharomyces cerevisiae*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.46, p.2462-2469, 2002.

OSTROSKY-ZEICHNER. L.; REX, J.H.; PAPPAS, P.G.; HAMILL, R.J.; LARSEN, R.A.; HOROWITZ, H.W.; POWDERLY, W.G.; HYSLOP, N.; KAUFFMAN, C.A.; CLEARY, J.;

MANGINO, J.E; LEE, J. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the united states. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.47, 3149–3154, 2003.

PADERU, P.; PARK, S.; PERLIN, D.S. Caspofungin uptake is mediated by a high-affinity transporter in *Candida albicans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.48, p.3845-3849, 2004.

PAPPAGIANIS, D.; COLLINS, M.S.; HECTOR, R.; REMINGTON, J. Development of resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae* infecting a human. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.16, 123–126, 1979.

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.**, v.48, p.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* sp. isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.49, p.3264-3273, 2005.

PATTERSON, T.F. Current and future approaches to antifungal therapy. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v.13, p.579-581, 2000.

PELTROCHE-LIACSAHUANGA, H.; DÖHMEN, H.; HAASE, G. Recovery of *Candida dubliniensis* from sputum of cystic fibrosis patients. **Mycoses**, v.45, p.15-18, 2002.

PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; GOBERNADO, M.; THE SPANISH ECMM WORKING GROUP ON CANDIDEMIA. Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from blood: results of a 2-year multicentre study in Spain. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.24, 23-30, 2005.

PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; VALENTÍN, A. Actividad de la anidulafungina sobre biopelículas de *Candida*. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.25, p.124-128, 2008.

PEREA, S.; LOPES-RIBOT, J.L.; WICKES, B.L.; KIRKPATRICK, DIB, O.P.; BAXHAMANN, S.P.; KELLER,S.M.; MARTINEZ, M.; PATTERSON, T.F. Molecular Mechanisms of Fluconazole Resistance in *Candida dubliniensis* Isolates from Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients with Oropharyngeal Candidiasis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.46, p.1695–1703, 2002.

PERLIN, D.S. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. **Drug Resist. Updat.**, v.10, p.121–130, 2007.

PFALLER, M. A.; JONES, R.N.; MESSER, S.A.; EDMOND, M.B.; WENZEL, R.P. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to species of *Candida* other than *Candida albicans*: Frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE program. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.30, p.121-129, 1998.

PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; GEE, S.; JOLY, S.; PUJOL, C.; SULLIVAN, D.J.; COLEMAN, D.C.; SOLL, D.R. *In vitro* susceptibilities of *Candida dubliniensis* isolates tested against the new triazole and echinocandin antifungal agents. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, p.870-872, 1999.

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

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Role of sentinel surveillance of candidemia: trends in species distribution and antifungal susceptibility. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, p.3551-3557, 2002a.

PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; HOLLIS, R.J.; JONES, R.N. Antifungal activity of posaconazole, ravuconazole, and voriconazole compared to those of itraconazole and amphotericin B against 239 clinical isolates of *Aspergillus* spp. and other filamentous fungi: report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2000. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.46, p.1032–1037, 2002b.

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

PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; BOYKEN, L.; RICE, C.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R.J.; DIEKEMA, D.J. Caspofungin activity against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida*. **J Clin Microbiol.**, v.41, p.5729-5731, 2003a.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; MESSER, S.A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R.J.; JONES, R.N. *In vitro* activities of voriconazole, posaconazole, and four licensed systemic antifungal

agents against *Candida* species infrequently isolated from blood. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, 78–83, 2003b.

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.**, v.10, p.11-23, 2004.

PFALLER, M.A.; MESSERA, S.A.; BOYKENA, L.; HOLLISA, R.J.; RICEA, C.; TENDOLKARA, S.; DIEKEMA, D.J. In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and fluconazole against 4,169 clinical isolates of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* collected during 2001 and 2002 in the ARTEMIS global antifungal surveillance program. **Diagn Microbiol. Infect. Dis.**, v.48, 201–205, 2004.

PFALLER, M.A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R.J.; MESSER, S.A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D.J. *In vitro* susceptibilities of *Candida* spp. to caspofungin: four years of global surveillance. **J. Clin. Microbiol.**, v.44, p.760–763, 2006a.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; COLOMBO, A.L.; KIBBLER, C.; NG, K.P.; GIBBS, D.L.; NEWELL, V.A. *Candida rugosa*, an emerging fungal pathogen with resistance to azoles: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. **J. Clin. Microbiol.**, v.44, 3578–3582, 2006b.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. A. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.20, p.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.**, v.46, p.150–156, 2008a.

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

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; GIBBS, D.L.; NEWELL, V.A.; ELLIS, D.; TULLIO, V.; RODLOFF, A.; FU, W.; LING, T.A.; GLOBAL ANTIFUNGAL SURVEILLANCE GROUP. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. **J. Clin. Microbiol.**, v.4, 1366-77, 2010.

PFALLER, M.A.; CATANHEIRA, M.; DIEKEMA, D.J.; MESSER, S.A.; JONES, R.N. Triazole and echinocandin MIC distributions with epidemiological cutoff values for differentiation of wild-type strains from non-wild-type strains of six uncommon species of *Candida*. **J. Clin. Microbiol.**, v.49, p.3800-3804, 2011a.

PFALLER, M.A.; CASTANHEIRA, M.; MESSER, S.A.; MOET, G.J.; JONES, R.N. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus fumigatus*: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiologic cutoff values to characterize resistance in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2009). **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.69, p.45-50, 2011b.

PFALLER, M.A. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for treatment. **Am. J. Med.**, v 125, S3-S13, 2012.

PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; WOOSLEY, L.N.; JONES, R.N.; CASTANHEIRA, M. Echinocandin and Triazole Antifungal Susceptibility Profiles for Clinical Opportunistic Yeast and Mold Isolates Collected from 2010 to 2011: Application of New CLSI Clinical Breakpoints and Epidemiological Cutoff Values for Characterization of Geographic and Temporal Trends of Antifungal Resistance. **J. Clin. Microbiol.**, v.51, p.2571-2581, 2013.

PINJON, E.; SULLIVAN, D.; SALKIN, I.; SHANLEY, D.; COLEMAN, D. Simple, inexpensive, reliable, method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, p.2093-2095, 1998.

PINJON, E.; MORAN, G.P.; COLIN, J.J.; KELLY, S.L.; SANGLARD, D.; COLEMAN, D.; SULLIVAN, D. Molecular mechanisms of itraconazole resistance in *Candida dubliniensis*. **Antimicrob. Agents Chemoth.**, v.47, p.2424-2437, 2003.

PINTO E SILVA, A.T.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; SILVA-DIAS, A.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A.G. Dynamics of in vitro acquisition of resistance by *Candida parapsilosis* to different azoles. **FEMS Yeast. Res.**, v.9, p.626-633, 2009.

PONTON, J.; RUCHEL, R.; CLEMONS, K.V.; COLEMAN, D.C.; GRILLOT, R.; GUARRO, J.; ALDEBERT, D.; AMBROISE-THOMAS, P.; CANO, J.; CARRILLO-MUÑOZ, A.J.; GENÉ, J.; PINEL, C.; STEVENSP, D.A; SULLIVAN, D.J. Emerging pathogens. **Med. Mycol.**, v.38, p.225-236, 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.**, v.24, p.198-209, 2007.

RAAD, I.I.; GRAYBILL, J.R.; BUSTAMANTE, A.B.; CORNELLY, O.A.; GAONA-FLORES, V.; AFIF, C.; GRAHAM, D.R.; GREENBERG, R.N.; HADLEY, S.; LANGSTON, A.; NEGRONI, R.; PERFECT, J.R.; PITISUTTITHUM, P.; RESTREPO, A.; SCHILLER, G.; PEDICONE, L.; ULLMANN, A.J. Safety of long-term oral posaconazole use in the treatment of refractory invasive fungal infections. **Clin Infect Dis**, v.42, p.1726–1734, 2006.

ROMANO, J., NIMROD, G.; BEN-TAL, N.; SHADKCHAN, Y.; BARUCH, K.; SHARON, H.; OSHEROV, N. Disruption of the *Aspergillus fumigatus* ECM33 homologue results in rapid conidial germination, antifungal resistance and hypervirulence. **Microbiology**, v.152, p.1919-1928, 2006.

SÁNCHEZ-VARGAS, L.O.; PÉREZ-RIOS, P.; ROMO-GARCÍA, J.; CORONAZQUIERDO, F.P.; HIDALGO-LOPERENA, H.; FRANCO-MARTINEZ, F. Determinación de pH saliva y cultivo en pacientes con candidosis bucal HIV positivos y HIV negativos. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.19, p.155-160, 2002.

SANDVEN, P.; BEVANGER, L.; DIGRANES, A.; HAUKLAND, H.H.; MANNSAKER, T.; GAUSTAD, P. Candidemia in Norway (1991 to 2003): results from a nationwide study. **J. Clin. Microbiol.**, v.44, p.1977- 1981, 2006.

SANGLARD, D.; KUCHLER, K.; ISCHER, F.; PAGANI, J.L.; MONOD, M.; BILLE, J. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients, involve specific multidrug transporters. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.39, 2378–2386, 1995.

SANGLARD, D. Multiple resistance mechanisms to azole antifungals in yeast clinical isolates. **Drug Resist. Updat.** v.1, p. 255-265, 1998.

SANGLARD, D. Resistance and tolerance mechanisms to antifungal drugs in fungal pathogens. **Mycologist**, v.17, p.74-77, 2003.

SANTOS, E.R. **Avaliação da suscetibilidade de *Candida* spp. isoladas de candidemias: um estudo de 15 anos.** 2012. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

SARKAR, S.; UPPULURI, P.; PIERCE, C.G.; LOPEZ-RIBOT, J.L. An *In Vitro* Study of Sequential Fluconazole/Caspofungin Treatment against *Candida albicans* Biofilms. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.58, p.1183-1186, 2014.

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

SCHALK, E.; MOHREN, M.; JENTSCH-ULLRICH, K.; DOMBROWSKI, F.; FRANKE, A.; KOENIGSMANN, M. Zygomycoses in patients with acute leukaemia. **Ann Hematol.**, v.85, p.327-332, 2006.

SCHEID, L.A.; MARIO, D.A.; KUBIÇA, T.F.; SANTURIO, J.M.; ALVES, S.H. *In vitro* activities of antifungal agents alone and in combination against fluconazole-susceptible and -resistant strains of *Candida dubliniensis*. **Braz. J. Infect. Dis.**, v.16, p.78-81, 2012.

SCHUETZER-MUEHLBAUER, M.; WILLINGER, B.; KRAPF, G.; ENZINGER, S.; PRESTERL, E.; KUCHLER, K. The *Candida albicans* Cdr2p ATP-binding cassette (ABC) transporter confers resistance to caspofungina. **Mol. Microbiol.**, v.48, p.225-235, 2003.

SEBTI, A.; KIEHN, T.E.; PERLIN, D.; CHATURVEDI, V.; WONG, M.; DONEY, A.; PARK, S.; SEPKOWITZ, K.A. *Candida dubliniensis* at a câncer center. **Clin. Infect. Dis.**, v.32, p.1034-1038, 2001.

SENA, M.F.; GONDIM, L.A.; SOUZA, G.C.; FERREIRA, M.A.; LIMA, K.C. Tratamento de candidíase oral em pacientes com câncer de cabeça e pescoço: uma revisão sistemática. **Rev. AMRIGS**, Porto Alegre, v.53, p.241-245, 2009.

SHEEHAN, D.J.; HITCHCOCK, C.A.; SIBLEY, C.M. Current and emerging azole antifungal agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.12, p.40-79, 1999.

SHINDE, R.B.; CHAUHAN, N.M.; RAUT, J.S.; KARUPPAYIL, S.M. Sensitization of *Candida albicans* biofilms to various antifungal drugs by cyclosporine A. **Ann. Clin. Micro.**, v.4, p.11-27, 2012.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2^a ed., p. 265-274, 2004.

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

SINGH, S.D.; ROBBINS, N.; ZAAS, A.K.; SCHELL, W.A.; PERFECT, J.R.; COWEN, L.E. Hsp90 governs echinocandin resistance in the pathogenic yeast *Candida albicans* via calcineurin. **PLoS Pathog.**, v.5, p.e1000532, 2009.

SINGH, R.I.; XESS, I.; MATHUR, P.; BEHERA, B.; GUPTA, B.; MISRA, M.C. Epidemiology of candidaemia in critically ill trauma patients: experiences of a level I trauma centre in North India. **J. Med. Microbiol.**, v.60, 342–348, 2011.

SMITH, P.B.; WALSH, T.J.; HOPE, W.; ARRIETA, A.; TAKADA, A.; KOVANDA, L.L.; KEARNS, G.L.; KAUFMAN, D.; SAWAMOTO, T.; BUELL, D.N.; BENJAMIN, D.K.JR. Pharmacokinetics of an elevated dosage of micafungin in premature neonates. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.28, p.412-415, 2009.

SOBEL, J.D.; AKINS, R.A. The role of resistance in *Candida* infections: Epidemiology and treatment. **Antimicrob. Drug Resistance**, v.2, p.931-951, 2009.

SOUZA, R.C.; JUNQUEIRA, J.C. ; ROSSONI, R.D.; PEREIRA, C.A.; MUNIN, E.; JORGE, A.O. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. **Laser Med. Sci.**, v.25, p.385-389, 2010.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIAK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada a Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2^a ed., v.1, 752 p., 2002.

SPREGHINI, E.; ORLANDO, F.; GIANNINI, D.; BARCHIESI, F. *In vitro* and *in vivo* activities of posaconazole against zygomycetes with various degrees of susceptibility. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.65, p.2158-2163, 2010.

STAAB, J. F.; BRADWAY, S. D.; FIDEL, P. L.; SUNDSTROM, P. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. **Science**, v.283, p.1535–1538, 1999.

STAIB, P.; MORSCHHAUSER, J. Chlamydospore formation on Staib agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*. **Mycoses**, v.42, p.521-524, 1999.

STEFFAN, P.; VAZQUEZ, J.A.; BOIKOV, D.; XU, CH.; SOBEL, J.D; AKINS, R.A. Identification of *Candida* species by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting of colony lysates. **J. Clin. Microbiol.**, v.35, 2031-2039, 1997.

ST-GERMAIN, G.; LAVERDIÈRE, M.; PELLETIER, R.; BOURGAULT, A.M.; LIBMAN, M.; LEMIEUS, C.; NOËL, G. Prevalence and antifungal susceptibility of 442 *Candida* isolates from blood and other normally sterile sites: results of a 2-year (1996 to 1998) multicenter surveillance in Quebec, Canada. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, 949-953, 2001.

SUGAR, A.M.; LIU, X.P. Combination antifungal therapy in treatment of murine pulmonary mucormycosis: roles of quinolones and azoles. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.44, p.2004-2006, 2000.

SULLIVAN, D.J.; WESTERNENG, T.J.; HAYNES, K.A.; BENNET, .D.E.; COLEMAN, D.C. *Candida dubliniensis* sp. Nov.: phenotypic and molecular characterization of novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. **Microbiology**, v.141, p.1507-1521, 1995.

SULLIVAN, D.J.; MORAN, G.; DONNELLY, S.; GEE, S.; PINJON, E.; MCCARTAN, B.; SHANLEY, D.B.; COLEMAN, D.C. *Candida dubliniensis*: an update. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.16, p.72-76, 1999.

SULLIVAN, D.J.; MORAN, G.P.; PINJON, E.; Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. **FEMS Yeast Res.**, v.4, p.369-376, 2004.

SULLIVAN, D.J.; MORAN, G.P.; COLEMAN, D.C. *Candida dubliniensis*: ten years on. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.253, p.9-17, 2005.

SUN, Q.N.; NAJVAR, L.K.; BOCANEGRA, R.; LOEBENBERG, D.; GRAYBILL, JR. *In vivo* activity of posaconazole against *Mucor* spp. in an immunosuppressed-mouse model. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, p.2310-2312, 2002.

SUN, N.; LI, D.; FONZI, W.; LI, X.; ZHANG, L.; CALDERONE, R. Multidrug-Resistant Transporter Mdr1p-Mediated Uptake of a Novel Antifungal Compound. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.57, p.5931-5939, 2013.

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

TARDIVO, J.P.; GIGLIO, A.; OLIVEIRA, C.S.; GABRIELLI, D.S.; JUNQUEIRA, H.C.; TADA, D.B.; SEVERINO, D.; TURCHIELLO, R.F.; BAPTISTA, M.S. Methylene blue in photodynamic therapy: from basic Mechanisms to clinical applications. **Photodiagn. Photodyn.** v.2, p.175-191, 2005.

TAWARA, S.; IKEDA, F.; MAKI, K.; MORISHITA, Y. OTOMO, K.; TERATANI, N.; GOTO, T.; TOMISHIMA, M.; OHKI, H.; YAMADA, A.; KAWABATA, K.; TAKASUGI, H.; SAKANE, K.; TANAKA, H.; MATSUMOTO, F.; KUWAHARA, S. *In vitro* activities of

a new lipopeptide antifungal agent, FK463, against a variety of clinically important fungi. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v.44, p.57-62, 2000.

TEKELI, A.; KOYUNCU, E.; DOLAPCI, I.; GUVEN, G.S.; SAHIN, G.O.; UZUN, O. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples of Turkish HIV-positive patients. **Mycoses**, v.48, p.197-201, 2005.

TEN CATE, J.M.; KLIS, F.M.; PEREIRA-CENCI, T.; CRIELAARD, W.; de GROOT, P.W. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. **J. Dent. Res.**, v.88, p.105-115, 2009.

TOBUDIC, S.; KRATZERR, C.; LASSNIGG, A.; PRESTERL, E. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. **Mycoses**, v.55, p.199–204, 2012.

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.**, v.35, p.627-630, 2002.

ULLMANN, A.J.; LIPTON, J.H.; VESOLE, D.H.; CHANDRASEKAR, P.; LANGSTON, A.; TARANTOLO, S.R.; GREINIX, H.; MORAIS DE AZEVEDO, W.; REDDY, V.; BOPARAI, N.; PEDICONE, L.; PATINO, H.; DURRANT, S. Posaconazole or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease. **N. Engl. J. Med.**, v.356, p.335–347, 2007.

VALE-SILVA, L.A.; GONÇALVES, M.J.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L.; PINTO, E. Antifungal activity of the essential oil of thymus x viciosoi against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and *Dermatophyte* species. **Planta Med.**, v. 76, p.882-888, 2010.

VAN HAL, S.J.; STARK, D.; HARKNESS, J.; MARRIOTT, D. *Candida dubliniensis* meningitis as delayed sequela of treated *C. dubliniensis* fungemia. **Emerg. Infect. Dis.** v.14, p.327-329, 2008.

VAZQUEZ, J.A.; SOBEL, J.D. Anidulafungin: A Novel Echinocandin. **Clin Infect Dis.**, v.43, 215-222, 2006.

VILLAR-VIDAL, M.; MARCOS-ARIAS, C.; ERASO, E.; QUINDÓS, G. Variation in biofilm formation among blood and oral isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v.29, p.660–665, 2011.

WALKER, L.A.; GOW, N.A.; MUNRO, C.A. Fungal echinocandin resistance. **Fungal. Genet. Biol.**, v.47, p.117-126, 2010.

WALSH, T.J.; LUTSAR, I.; DRISCOLL, T.; DUPONT, B.; RODEN, M.; GHAHRAMANI, P.; HODGES, M.; GROLL, A.H.; PERFECT, J.R. Voriconazole in the treatment of aspergillosis, scedosporiosis and other invasive fungal infections in children. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.21, p.240-248, 2002.

WARNOCK, D. W. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. **J. Med. Mycol.**, v.48, p.1-12, 2007.

WARREN, T.A.; MCTAGGART, L.; RICHARDSON, S.E.; ZHANG, S.X. *Candida bracarensis* bloodstream infection in an immunocompromised patient. **J. Clin. Microbiol.**, v.48, 4677-9, 2010.

WEBSTER, J. R.; WEBER, W. S. **Introduction to Fungi**. New York: Cambridge University Press, 3^a ed., 855p., 2007.

WEXLER, D.; COURTNEY, R.; RICHARDS, W.; BANFIELD, C.; LIM, J.; LAUGHLIN, M. Effect of posaconazole on cytochrome P450 enzymes: a randomized, open-label, two-way crossover study. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.21, p.645–653, 2004.

WHITE, T.C.; MARR, K.A.; BOWDEN, R.A. Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.11, 382–402, 1998

WILLIS, A.M.; COULTER, W.A.; SULLIVAN, D.J.; COLEMAN, D.C.; HAYES, J.R.; BELL, P.M.; LAMEY, P.J. Isolation of *Candida dubliniensis* from insulin-using diabetes mellitus patients. **J. Oral Pathol. Med.**, v.29, p.86-89, 2000.

WIRSCHING, S.; MORAN, G.P.; SULLIVAN, D.J.; COLEMAN, D.C.; MORSCHHAUSER, J. MDR1-mediated drug resistance in *Candida dubliniensis*. **Antimicrob Agents Chemoter.**, v.45, p.3416-3421, 2001.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S.M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R.P.; EDMOND, M.B. Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals: Analysis of 24,179 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. **Clin. Infect. Dis.**, v.39, p.309-317, 2004.

WORKOWSKI, K.A.; BERMAN, S.M. Sexually transmitted diseases treatment guidelines. **MMWR Recomm. Rep.**, v.55, p.1-94, 2006.

ZEPELIN, B.M.; NIEDERHAUS, T.; GROSS, U.; SEIBOLD, M.; MONOD, M.; TINTELNOT, K. Adherence of different *Candida dubliniensis* isolates in the presence of fluconazole. **AIDS**, v.16, p.1237-1244, 2002.

8 LISTA DE ANEXOS

Tabela I: Suscetibilidade ($\mu\text{g/mL}$) de isolados de *Candida dubliniensis* sensíveis ao fluconazol frente à anidulafungina (ANF), caspofungina (CPF), micafungina (MCF), voriconazol (VRC), posaconazol (POSA), itraconazol (ITZ), fluconazol (FLU).

Isolados	CIMANF	CIMCPF	CIMMCF	CIMVRC	CIMPOSA	CIMITRA	CIMFLU
Cd 01 S	0,004	0,0625	0,0040	0,004	0,002	0,008	0,125
Cd 02 S	0,004	0,0625	0,0160	0,008	0,004	0,015	0,250
Cd 03 S	0,004	0,0625	0,0160	0,004	0,002	0,008	0,250
Cd 04 S	0,008	0,0625	0,0320	0,004	0,002	0,008	0,125
Cd 05 S	0,016	0,1250	0,0320	0,004	0,002	0,015	0,125
Cd 06 S	0,008	0,1250	0,0160	0,004	0,002	0,008	0,125
Cd 07 S	0,016	0,1250	0,0625	0,008	0,002	0,015	0,500
Cd 08 S	0,016	0,1250	0,0160	0,008	0,002	0,030	0,250
Cd 09 S	0,008	0,1250	0,0160	0,004	0,002	0,060	0,125
Cd 10 S	0,004	0,2500	0,0320	0,004	0,002	0,125	0,125
Cd 11 S	0,032	0,5000	0,1250	0,002	0,002	0,125	0,125
Cd 12 S	0,032	0,5000	0,0625	0,008	0,002	0,015	0,250
Cd 13 S	0,016	0,2500	0,0320	0,004	0,002	0,008	0,250
Cd 14 S	0,032	0,1250	0,0625	0,002	0,002	0,060	0,250
Cd 15 S	0,008	0,0625	0,0320	0,016	0,004	0,060	0,250
Cd 16 S	0,016	0,1250	0,0320	0,004	0,004	0,060	0,500
Cd 17 S	0,008	0,0625	0,0320	0,002	0,002	0,030	0,250
Cd 18 S	0,008	0,0625	0,0080	0,004	0,002	0,015	0,125
Cd 19 S	0,016	0,1250	0,1250	0,004	0,002	0,060	0,500
Cd 20 S	0,008	0,1250	0,0625	0,004	0,002	0,030	0,125
Cd 21 S	0,016	0,1250	0,0320	0,004	0,002	0,060	0,125
Cd 22 S	0,008	0,0625	0,0320	0,008	0,002	0,030	0,500

CIM: Concentração Inibitória Mínima, Cd: *Candida dubliniensis*, S: Sensíveis.

Tabela II: Suscetibilidade ($\mu\text{g/mL}$) de isolados de *Candida dubliniensis* resistente ao fluconazol frente à anidulafungina (ANF), caspofungina (CPF), micafungina (MCF), voriconazol (VRC), posaconazol (POSA), itraconazol (ITZ), fluconazol (FLU).

Isolados	CIMANF	CIMCPF	CIMMCF	CIMVRC	CIMPOSA	CIMITZ	CIMFLZ
Cd 01 R	0,032	0,25	0,016	0,016	0,016	16,0	64,00
Cd 02 R	0,016	0,25	0,128	0,008	0,008	16,0	64,00
Cd 03 R	0,008	0,25	0,016	0,016	0,008	4,00	128,0
Cd 04 R	0,016	1,00	0,128	0,064	0,008	16,0	64,00
Cd 05 R	0,016	0,50	0,016	0,064	0,008	8,00	128,0
Cd 06 R	0,032	0,50	0,064	0,016	0,008	16,0	128,0
Cd 07 R	0,032	0,50	0,064	0,008	0,016	16,0	128,0
Cd 08 R	0,064	0,50	0,128	0,016	0,008	8,00	128,0
Cd 09 R	0,032	1,00	0,064	0,032	0,008	8,00	128,0
Cd 10 R	0,032	1,00	0,256	0,008	0,008	8,00	64,00
Cd 11 R	0,032	1,00	0,064	0,512	0,125	16,0	64,00
Cd 12 R	0,016	0,50	0,032	0,032	0,008	8,00	128,0
Cd 13 R	0,032	0,50	0,064	0,016	0,008	8,00	64,00
Cd 14 R	0,064	0,50	0,128	0,256	0,032	8,00	64,00
Cd 15 R	0,016	0,50	0,032	0,032	0,008	16,0	128,0
Cd 16 R	0,064	0,50	0,064	0,016	0,016	8,00	64,00
Cd 17 R	0,064	0,50	0,128	0,016	0,008	16,0	128,0
Cd 18 R	0,016	0,50	0,016	0,008	0,008	8,00	64,00
Cd 19 R	0,256	1,00	0,128	0,256	0,032	16,0	64,00
Cd 20 R	0,032	1,00	0,064	0,008	0,008	16,0	64,00
Cd 21 R	0,032	0,50	0,032	0,008	0,008	16,0	64,00
Cd 22 R	0,008	0,25	0,016	0,008	0,008	8,00	128,0

CIM: Concentração Inibitória Mínima, Cd: *Candida dubliniensis*, R: Resistente.

Tabela III: Suscetibilidade ($\mu\text{g/mL}$) de isolados de *Candida albicans* sensíveis ao fluconazol frente à anidulafungina (ANF), caspofungina (CPF), micafungina (MCF), voriconazol (VRC), posaconazol (POSA), itraconazol (ITZ), fluconazol (FLU).

Isolados	CIMANF	CIMCPF	CIMMCF	CIMVRC	CIMPOSA	CIMITZ	CIMFLZ
Ca 01 S	0,064	0,1250	0,064	0,0625	0,030	0,0625	0,250
Ca 02 S	0,064	0,1250	0,064	0,1250	0,030	0,1250	1,000
Ca 03 S	0,064	0,1250	0,064	0,0625	0,008	0,0300	0,500
Ca 04 S	0,064	0,2500	0,064	0,0625	0,030	0,0625	0,250
Ca 05 S	0,016	0,2500	0,032	0,1250	0,030	0,1250	1,000
Ca 06 S	0,032	0,1250	0,032	0,0300	0,030	0,1250	0,125
Ca 07 S	0,032	0,1250	0,032	0,0300	0,016	0,0300	0,500
Ca 08 S	0,064	0,1250	0,064	0,0625	0,030	0,0625	0,500
Ca 09 S	0,032	0,1250	0,032	0,0300	0,030	0,1250	0,500
Ca 10 S	0,016	0,1250	0,032	0,0300	0,016	0,1250	0,125
Ca 11 S	0,016	0,2500	0,064	0,0625	0,016	0,0625	0,500
Ca 12 S	0,016	0,2500	0,064	0,0625	0,030	0,0625	1,000
Ca 13 S	0,064	0,2500	0,064	0,0300	0,030	0,1250	2,000
Ca 14 S	0,016	0,2500	0,032	0,0625	0,016	0,0625	0,125
Ca 15 S	0,016	0,2500	0,064	0,0300	0,030	0,1250	0,500
Ca 16 S	0,032	0,1250	0,064	0,0300	0,016	0,0625	0,125
Ca 17 S	0,032	0,1250	0,032	0,0160	0,008	0,0625	2,000
Ca 18 S	0,016	0,0625	0,032	0,0160	0,032	0,1250	2,000
Ca 19 S	0,016	0,1250	0,064	0,0300	0,008	0,1250	2,000
Ca 20 S	0,016	0,1250	0,016	0,0300	0,008	0,0625	0,500
Ca 21 S	0,016	0,1250	0,032	0,0160	0,008	0,1250	1,000
Ca 22 S	0,016	0,1250	0,064	0,0625	0,030	0,1250	0,250
Ca 23 S	0,016	0,1250	0,032	0,0300	0,030	0,1250	0,250
Ca 24 S	0,032	0,2500	0,064	0,0625	0,016	0,0625	2,000
Ca 25 S	0,016	0,1250	0,032	0,0625	0,016	0,0625	0,250
Ca 26 S	0,008	0,1250	0,032	0,0160	0,008	0,0625	0,250
Ca 27 S	0,032	0,2500	0,064	0,1250	0,030	0,1250	0,500
Ca 28 S	0,032	0,1250	0,032	0,0625	0,030	0,1250	0,500
Ca 29 S	0,032	0,1250	0,032	0,0625	0,016	0,0625	0,250
Ca 30 S	0,016	0,2500	0,016	0,0160	0,016	0,1250	0,250

CIM: Concentração Inibitória Mínima, Ca: *Candida albicans*, S: Sensíveis.