

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

Ana Luísa Dias Fontinha

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B, pelo método de microdiluição

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2010

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

Ana Luísa Dias Fontinha

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

**Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde**

Porto, 2010

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

Ana Luísa Dias Fontinha

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

A aluna,

**Monografia apresentada à
Universidade Fernando Pessoa como
parte dos requisitos para obtenção do
grau de licenciada em Ciências
Farmacêuticas.**

SUMÁRIO

As leveduras do género *Candida* estão presentes na flora normal da pele e em algumas mucosas do Homem desde o nascimento, não deixando no entanto de ter a capacidade de provocar infecção.

Quaisquer alterações orgânicas, independentes da natureza, favorecem a manifestação infecciosa deste fungo leveduriforme, principalmente quando existem condições que propiciam a sua proliferação exacerbada.

Candida albicans é o agente mais frequentemente isolado nas candidoses. No entanto vários autores têm documentado um aumento de espécies de *Candida* não *albicans* nas últimas décadas, o que é preocupante, pois algumas espécies têm sensibilidade diminuída aos triazóis, (ex: *C. glabrata*), ou mesmo resistência à sua acção, (ex: *C. krusei*), ou à Anfotericina B, (ex: *C. lusitaniae*).

Os principais grupos de antifúngicos em uso, com acção sobre espécies de *Candida*, compreendem polienos (Anfotericina B e Nistatina) e os derivados dos azóis, como os imidazóis (Cetoconazol e Miconazol) e os triazóis (Itraconazol, Fluconazol e Voriconazol).

De entre os antifúngicos empregues na terapia de candidoses sistémicas, a Anfotericina B tem sido considerada o mais eficaz.

Possui actividade fungicida “*in vivo*” e “*in vitro*” contra leveduras do género *Candida spp*, *Cryptococcus neoformans* e fungos filamentosos como *Aspergillus spp*, zigomicetos e fungos demáceos, além dos fungos dimórficos. No entanto, a sua forma endovenosa tem um uso limitado devido à alta toxicidade hepática, frequentemente associada com disfunção renal.

Neste estudo foram utilizadas estirpes provenientes de amostras clínicas obtidas quer a nível hospitalar quer em ambulatório, tendo sido ao todo estudadas 58 isolados de *Candidas*.

Foi utilizado o método de microdiluição em caldo, de acordo com a norma Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approved Standard- Second Edition, anteriormente designada de *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS).

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

No entanto, este método revelou ser de difícil interpretação e não muito reprodutível, dependendo em grande parte do operador, quando utilizado para determinar a susceptibilidade à Anfotericina B. Por um lado devido à dificuldade em estabelecer um end-point para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI), e por outro pela sua realização por parte de operadores pouco experientes. Para tal reforça-se a necessidade de procurar um método mais adequado, de forma a dar resultados fiáveis que representem a actividade “*in vivo*” da Anfotericina B relativamente a leveduras do género *Candida*, possibilitando assim uma ajuda para um tratamento mais adequado.

O presente estudo foi realizado no sentido de avaliar a sensibilidade de diversas estirpes de *Candida spp.*, isoladas de amostras clínicas, à Anfotericina B. Pretendia-se avaliar a prevalência de resistência e confirmar, ou não, a informação bibliográfica.

AGRADECIMENTOS

Este espaço de agradecimentos é dedicado a todos os que estiveram presentes na minha vida durante estes 6 anos e que fizeram dela um período fantástico e enriquecedor. A todos um bem hajam.

Em primeiro lugar dedico um enorme agradecimento à Professora Doutora Fátima Cerqueira pela sua disponibilidade, pelo acompanhamento atento e constante, por aceitar ser minha orientadora neste trabalho. Agradeço também, o facto de me ajudar na conclusão do meu curso com a presente monografia.

Ao Dr. Ricardo por todo o apoio, por estar sempre disponível para as minhas muitas solicitações.

A todos os professores por tornarem estes 6 anos muito enriquecedores, por nos transmitirem todos os conhecimentos de que necessitamos, por responderam às minhas dúvidas, tornando a minha tarefa de aprendizagem muito mais simplificada. Pela sua disponibilidade, pelo acompanhamento atento e constante e pelo empenho em proporcionar aos alunos uma formação de excelência, o meu sincero agradecimento.

Ao meu pai e à minha mãe por esta enorme prenda que me proporcionaram, o meu curso. Sem vocês não seria possível, todo o vosso apoio foi incondicional. O meu muito obrigada.

A vocês minhas grandes amigas, Christelle, Cristina, Cristiana, Sofia sem vocês teria sido mais difícil. Agradeço-vos todos os nossos momentos de estudo, todas as nossas experiências de vida, por estarem sempre disponíveis para ouvir com todo o entusiasmo, todas as experiências por mim vividas durante estes anos, pelo companheirismo e por serem além de tudo minha família. Um grande beijo.

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

Ao meu namorado, por sempre me apoiar e compreender, por estar a meu lado nos momentos mais difíceis e por acreditar em mim. O teu apoio foi imprescindível.

Aos meus irmãos, amigos e cunhadas obrigada por fazerem destes 6 anos um período fantástico.

À Universidade Fernando Pessoa, pela excelente formação que proporciona aos seus alunos.

ÍNDICE

Sumário.....	5
Agradecimentos	7
Índice de figuras	11
Índice de tabelas	12
Abreviaturas	13
I – Introdução	15
II – Género <i>Candida</i>	18
1 . Espécies de <i>Candida</i>	21
1.1. <i>Candida albicans</i>	21
1.2. <i>Candida dubliniensis</i>	23
1.3. <i>Candida lusitaniae</i>	24
1.4. <i>Candida krusei</i>	25
1.5. <i>Candida tropicalis</i>	26
1.6. <i>Candida glabrata</i>	27
1.7. <i>Candida parapsilosis</i>	28
1.8. <i>Candida guilliermondii</i>	30
1.9. <i>Candida rugosa</i>	31
III – Candidoses.....	32
IV – Infecções nosocomiais.....	36
V – Classes de Antifúngicos.....	39

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

1. Polienos	40
1.1 Anfotericina B.....	40
1.1.1.Novas formulações de Anfotericina B.....	44
1.2. Outros polienos	46
1.3. Resistência aos polienos.....	48
VI - Susceptibilidade das <i>Candidas spp</i> à Anfotericina B.....	48
1. Objectivo do estudo.....	49
2. Materiais e Métodos.....	49
2.1 Reagentes.....	49
2.2 Preparação da solução de Anfotericina B.....	49
2.3 <i>Candida spp</i>	49
2.4 Concentração mínima inibitória.....	49
3. Resultados.....	51
3.1. Origem da amostra.....	51
4. Discussão.....	51
5. Conclusão.....	56
VII – Bibliografia.....	57

Índice de Figuras

Figura 1 – <i>Candida albicans</i> em Corn Meal Agár.....	22
Figura 2 – Candidose oral.....	33
Figura 3 – Vulvovaginite	34
Figura 4 – Balanite	34
Figura A – Oníquia.....	35
Figura B – Perioníquia.....	35
Figura 5 – Estrutura química da Anfotericina B.....	41
Figura 6 – AmBisome.....	44

Índice de tabelas

Tabela 1 – Características dos lípidos de formulações de Anfotericina B.....	45
Tabela 2 – Directrizes de interpretação dos testes de susceptibilidade “in vitro” das espécies de <i>Candida</i>	50
Tabela 3 – Limites recomendados para CMI de 48 horas.....	50
Tabela 4 – Susceptibilidade das estirpes de <i>Candida</i> à Anfotericina B	51

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

ABREVIATURAS

AB – Anfotericina B

ADN (DNA) – Ácido Desoxirribonucleico

AM3 – Antibiótico médio 3

CFU – Concentração Fungicida Mínima

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMI – Concentração Mínima Inibitória

DMPG – Diesteroilfosfatidilglicerol

DMSO – Dimetilsulfóxido

DCO – Decoxicolato de sódio

Ex – Exemplo

IgA – Imunoglobulina A

K⁺ – Ião potássio

H⁻ – Ião hidrogénio

kg – kilograma

µl – microlitro

µg – micrograma

mg – miligrama

ml – mililitro

NaCl – Cloreto de Sódio

NCCLS – *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SLS – Lauril Sulfato de Sódio

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

ATCC - American Type Culture Collection

SDA – Sabouraud Dextrose Agár

CEBIMED – Centro de Estudos em Biomedicina

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

I – Introdução

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

Os fungos são células eucariotas desprovidas de clorofila e que se reproduzem por esporos. Os fungos leveduriformes são unicelulares e os restantes, que constituem a grande maioria, são filamentosos.

As leveduras pertencem a uma categoria de fungos saprófitas inofensivos. No entanto tem havido uma evolução da patologia fúngica sendo hoje frequente as candidoses por qualquer espécie de *Candida spp.*, especialmente em indivíduos com o sistema imunitário comprometido (Ferreira e Sousa, 2000).

A incidência de risco de vida devido a infecções fúngicas provocadas por leveduras do género *Candida* tem aumentado significativamente em número e gravidade nas últimas duas décadas (Vandeputte et al, 2005).

Estas infecções são particularmente frequentes em pacientes imunodeprimidos, seja devido ao uso de imunossuppressores, citostáticos ou infecção, como infecção VIH/SIDA (Vandeputte et al, 2005).

Espécies do género *Candida* são as mais frequentemente isoladas como causa de infecções fúngicas invasivas, sendo classificada como a quarta causa mais comum de infecções sanguíneas a nível dos hospitais (Zepelin et al, 2007). Tal facto, leva a que o tratamento de infecções fúngicas seja contestado pela emergência da resistência aos antifúngicos, em parte devido ao seu abundante uso profilático e ao crescente aumento de imunodeprimidos (Noel et al, 2003).

C. albicans faz parte da flora comensal, podendo ser isolada das mucosas e da superfície cutânea. No entanto é a responsável pela maioria das candidoses humanas (Ferreira e Sousa, 2000). Pode por isso causar infecções oportunistas das superfícies que coloniza, bem como de tecidos profundos a que possa aceder (Perumal et al, 2007).

Programas de vigilância longitudinal nos E.U.A. e Europa têm detectado um aumento na prevalência de infecções fúngicas causadas por diferentes espécies de *Candida*, como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* (Zepelin et al, 2007). Além disso, parecem existir acentuadas diferenças na distribuição de diferentes espécies e nas susceptibilidades aos antifúngicos entre os diferentes países, havendo necessidade de vigilância contínua em cada

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

país de forma a controlar as tendências dos patógenos e dos antifúngicos (Mokkadas et al, 2007; Silva et al, 2009; Zepelin et al, 2007).

A eficácia da terapêutica antifúngica depende directamente de um diagnóstico precoce, assim como do estado imunológico do paciente. Portanto, pacientes com depressão do sistema imunológico podem não responder satisfatoriamente ao tratamento independentemente das propriedades do antifúngico utilizado.

Do mesmo modo, dadas as dificuldades de diagnóstico já mencionadas, muitas vezes a introdução da terapêutica específica ocorre tardiamente, contribuindo para os altos índices de mortalidade observados em infecções fúngicas invasivas (Ribeiro et al, 2004).

Durante décadas a anfotericina B foi usada como terapêutica de primeira escolha. No entanto devido à sua nefrotoxicidade o seu uso passou a ser limitado. Como alternativa começaram a ser usados os derivados dos azóis. Actualmente *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr* e *C. krusei* apresentam algumas resistências ao fluconazol (Gomez-Lopez et al, 2008; Orozco et al, 1998; Sanguinetti et al, 2005; Silva et al, 2009).

De forma a ultrapassar os vários problemas da terapêutica antifúngica que iam surgindo são feitas combinações de novos agentes junto a antifúngicos mais tradicionais mostrando sinergismo ou pelo menos actividade aditiva contra *Candida*. São também usadas as equinocandinas, novos azóis e novas formulações de anfotericina B de forma a minimizar os seus efeitos nefrotóxicos (Ribeiro et al, 2004).

Com a presente monografia, pretende-se fazer um estudo de susceptibilidade da *Candida spp* à Anfotericina B, avaliando a utilização do método de microdiluição. É possível ainda fazer um estudo das alternativas a este método como forma de ultrapassar as limitações que ele apresenta, sendo possível um melhor conhecimento da resposta das leveduras do género *Candida spp.* à Anfotericina B.

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

II – Género *Candida*

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

Infecções fúngicas invasivas causadas por *Candida spp.* são as principais causas de morbidade e mortalidade em indivíduos imunocomprometidos. Mais de 150 espécies de *Candida* já foram associadas a patologias humanas (Borman et al, 2008).

C. albicans continua a ser o agente predominante causador de infecções nosocomiais, no entanto um número crescente de infecções tem sido atribuída a espécies de *Candida não-albicans*, tais como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* e *C. krusei* que se tornaram emergentes nos últimos anos, sendo considerados importantes patógenos oportunistas (Borman et al, 2008).

Candida spp. são facilmente identificadas por métodos micológicos convencionais, que dependem de uma combinação de características morfológicas, bem como da capacidade dos organismos seleccionados para fermentar fontes de açúcares ou assimilar uma variedade de compostos de carbono e nitrogénio (Borman et al, 2008). No entanto um número crescente de leveduras menos comuns, que são difíceis de identificar por métodos fenotípicos, foram relatadas como causadoras de infecções humanas.

Certas *Candidas spp.* como *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, apenas podem ser identificadas através de métodos moleculares. Além disso novas espécies de *Candida spp.* potencialmente patogénicas, têm sido descritas com base na atípica fermentação e assimilação e com sequências únicas de DNA. *C. nivariensis* é um exemplo disso, foi descrita em 2005 e mostrou uma estreita relação genética com a *C. glabrata*, sendo sugerida como um possível novo fungo oportunista (Borman et al, 2008).

Semelhanças na sequência desta estirpe com uma sequência de uma estirpe isolada de flores do Canadá, sugerem que a infecção por *C. nivariensis* ou a colonização de três pacientes poderia ter sido adquirida nas plantas do jardim do hospital (Borman et al, 2008).

As leveduras do género *Candida* em meio sólido, contendo agár Sabouraud dextrose, formam colónias húmidas, cremosas, de aspecto liso ou rugoso e coloração branco-amarelada.

Na cultura em Corn-meal agár, há formação predominante de pseudomicélios, podendo ser encontrados verdadeiros micélios e clamidósporos.

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

A formação de tubos germinativos por *Candida spp.* ocorre em cultura com soros de animais a 37°C. Em meio líquido, induzem a presença de sedimento em caldo Sabouraud dextrose e provas de assimilação de fonte carbono (maltose, glicose, celobiose, lactose, galactose e sacarose) e de fermentação de açúcares (dextrose, maltose, sacarose e lactose) permitem a identificação das espécies de *Candida* (Ribeiro et al, 2004).

Apresentam factores de virulência: aderência, dimorfismo (formação de micélio), variabilidade fenotípica (“switching”), produção de toxinas e enzimas extracelulares.

A aderência deve-se a características químicas e estruturais da parede celular. O composto químico que permite a união é uma manoproteína, enquanto que a estrutura é uma capa fibrilar que recobre a parede. Tem-se descrito também outras moléculas de aderência, como as adesinas (lectinas e glicoproteínas de superfície) do agente infectante, e receptores protéicos (laminina, fibronectina e fibrina) presentes na superfície celular das mucosas. Esta interacção pode ser influenciada pela temperatura, pH, nutrientes, IgA secretória e hidrofobicidade superficial celular (Ponton et al, 1996; Ribeiro et al, 2004).

A formação de pseudo-hifas e a rapidez com que a sua morfologia pode variar são características de infecciosidade (Odds et al, 1997; Ribeiro et al, 2004).

O desenvolvimento de micélio pelas espécies de *Candida* também favorece as infecções fúngicas decorrentes da variabilidade antigénica da superfície e do formato micelial que propicia maior aderência, dificultando a acção fagocitária pelo sistema imune.

O mecanismo “switching”, de alta frequência e reversibilidade, presenciado nas leveduras do género *Candida*, conduz a alterações morfológicas das colónias fúngicas e das propriedades de superfície celular, além de favorecer também mudanças na sensibilidade aos antifúngicos (Ribeiro et al, 2004)

1. Espécies de *Candida*

São numerosas as espécies de *Candida*, identificadas até ao momento. Devido às suas diferenças a nível de epidemiologia, virulência e resistência aos antifúngicos, é hoje necessário ter em atenção as características particulares de cada espécie.

Ou pela sua importância em termos de prevalência ou por características específicas, nomeadamente de resistência a antifúngicos, ou por serem reconhecidas como espécies emergentes, são referidas as características de algumas dessas espécies.

1.1 *Candida albicans*

C. albicans foi isolada de primatas, animais domesticados e outros mamíferos e aves. Em humanos *C. albicans* coloniza preferencialmente as superfícies das mucosas e tracto intestinal que se acredita ser um importante reservatório para a infecção. *C. albicans* pode colonizar praticamente todo o tracto gastrointestinal, desde a cavidade oral até ao recto e tecido perianal, podendo ocorrer inoculação fecal-oral (Cannon e Chaffin, 1999; Londoño et al, 1998).

A região vulvovaginal de cerca de 40% das mulheres saudáveis é colonizada por espécies de *Candida*, sendo a *C. albicans* principalmente isolada e o tracto genitourinário representa outro reservatório para inoculação oral (Cannon e Chaffin, 1999).

C. albicans sobrevive melhor em superfícies húmidas do que objectos inanimados, mas se o grau de contaminação for alto o suficiente, as células viáveis permaneceram em superfícies secas durante pelo menos 24 horas (Cannon e Chaffin, 1999).

A parede celular de *C. albicans* é uma estrutura robusta e dinâmica, que protege a célula das mudanças no ambiente extracelular. É o ponto de contacto directo com células do hospedeiro, e contém determinantes antigénicos, glicoproteínas envolvidas na adesão aos tecidos do hospedeiro. A parede é constituída por uma camada interna do esqueleto composto por quitina, β 1, 3 – e β 1, 6-glucanas, e uma camada exterior que é dominada por proteínas altamente glicosiladas. Estas proteínas modificam-se com átomos de azoto e ou oxigénio

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

ligados a mananas, ambos os quais podem ainda ser elaborados com oligomannosidos que estão ligados através de ligações fosfodiéster (fosfomananas). As mananas têm um papel importante na integridade da parede celular, na adesão a células do hospedeiro e dos tecidos, na virulência e no estabelecimento de uma resposta pelas células do sistema imunológico (Mora- Montes et al, 2010).

Apesar de *C. albicans* ser a espécie mais frequentemente isolada, tem-se mostrado sensível a todos os antifúngicos de uso sistêmico. Mas casos de resistência aos triazóis são detectados em pacientes que fazem uso prolongado desses medicamentos.



Figura 1: *Candida albicans* em Corn Meal Agár. (Fonte: www.optimalhealthnetwork.com (Consultado a 23 de Setembro de 2010))

1.2 Candida dubliniensis

C. dubliniensis é uma espécie de *Candida* recentemente identificada, que é fenotipicamente semelhante (apresenta clamidósporos e tubo germinativo), mas geneticamente distinta da *C. albicans*. Porém é menos patogénica e tem maior facilidade de desenvolver resistência aos antifúngicos triazóis (Kirkpatrick et al, 1998; Noel et al, 2003; Pinjon et al, 1998; Sullivan et al, 1997).

A grande maioria dos isolados de *C. dubliniensis* provém da cavidade oral de adultos e crianças infectadas com VIH e de adultos com SIDA (Noel et al, 2003). *C. dubliniensis* tem sido identificada como o principal agente causador de candidose orofaríngea, particularmente em pacientes com infecções recorrentes (Noel et al, 2003). Também tem sido identificada como um agente causador de candidose oral em indivíduos VIH-negativos, incluindo indivíduos saudáveis e diabéticos (Kirkpatrick et al, 1998; Pinjon et al, 1998; Sullivan et al, 1997).

Da mesma forma, *C. dubliniensis* foi identificada a partir de amostras de outros locais anatómicos, incluindo fezes, expectoração, urina, exsudados de secreções vaginais, feridas, e no tracto respiratório (Noel et al, 2003).

Finalmente, este organismo tem sido implicado clinicamente em infecções invasivas em pacientes infectados pelo VIH (Noel et al, 2003).

1.3 Candida lusitaniae

Candida lusitaniae é uma levedura haplóide e dimórfica que foi em 1970 descrita pela primeira vez como uma das poucas espécies de *Candida* que se sabe ter um ciclo sexual completo (Young et al, 2003).

Relatos recentes indicam que os isolados de *C. lusitaniae* são principalmente sensíveis à Anfotericina B, no entanto o mecanismo que permite que as células mudem de susceptíveis a resistentes tem sido estudado, pois a frequência com que esta levedura passa a resistente é relativamente alta. Tal facto deve ser considerado como consequência do seu genoma haplóide, no qual as mutações dominante ou recessivo podem ser expressas (Merz et al, 1984; Noel et al, 2003; Peyron et al, 2001; Sanchez et al, 1992).

C. lusitaniae é pouco frequente, sendo principalmente isolada em pacientes com cancro (Noel et al, 2003).

1.4 Candida krusei

C. krusei causa problemas em termos de clínica pela sua resistência quase universal aos derivados azólicos (ex. fluconazol), podendo também ter reduzida susceptibilidade para outras alternativas terapêuticas tais como a Flucitosina e a Anfotericina B. O fenótipo multiresistente exibido por *C. krusei* representa um dilema na terapêutica quando se está a considerar as opções de tratamento para pacientes neutropénicos (Orozco et al, 1998; Pfaller et al 2008).

Todavia, as candidoses localizadas (esofagite e candidúria) não constituem forçosamente um risco à vida do paciente e não é constatada clinicamente a necessidade de ocorrência de disseminação hematogénica (Pfaller et al 2008).

No entanto, a relação que se estabelece entre o microrganismo e o hospedeiro pode, em certos casos, favorecer este processo de disseminação através de riscos típicos do ambiente hospitalar ou não (internamento em unidade de terapia intensiva, uso de cateteres venosos centrais, prescrição de antibióticos de amplo espectro, diabetes e diálise) (Pfaller et al 2008; Ribeiro et al, 2004).

A infecção por *C. krusei* está relacionada com neoplasias hematológicas, transplante de medula óssea, neutropenia e uso prévio de fluconazol, uma vez que é resistente a este antifúngico (Pfaller et al 2008).

Apesar de apresentar resistência intrínseca ao Fluconazol *C. krusei* geralmente permanece susceptível “*in vitro*” ao Voriconazol, porque o Voriconazol tem sido utilizado com sucesso para tratar alguns pacientes infectados com *C. krusei* (Orozco et al, 1998).

Também as Equinocandinas têm sido usadas devido à sua actividade fungicida e excelente actividade “*in vitro*” contra a *C. krusei* (Hakki et al, 2006).

C. krusei deve ser considerada um importante indicador de espécies, que devem ser monitorizadas por desenvolver resistência antifúngica (Pfaller et al 2008).

1.5 Candida tropicalis

C. tropicalis surgiu como um fungo oportunista potencialmente perigoso. Isto pode ser devido, tanto a um aumento da sensibilização e identificação específica da *C. tropicalis* como um agente etiológico da infecção como a um aumento do número de pacientes imunocomprometidos susceptíveis ao ataque de fungos oportunistas (Barchiesi et al 2000; Fromtling et al, 1987).

Esta levedura é comum tanto no ambiente como um comensal do organismo humano. Sob certas condições, *C. tropicalis* demonstrou causar significativa morbidade e mortalidade e tem sido descrito, como um patógeno importante em pacientes imunocomprometidos (Barchiesi et al, 2000; Fromtling et al, 1987).

Num estudo feito, *C. tropicalis* foi o fungo oportunista mais frequentemente isolado de amostras de pacientes que se encontravam na unidade de cuidados intensivos (Fromtling et al, 1987). *C. tropicalis* também tem sido relatada como sendo um patógeno oportunista frequente num hospital oncológico e foi identificada como o agente etiológico de uma variedade de infecções, incluindo pielonefrite, infecções do tracto urinário inferior, tromboflebite, artrite, bursite, meningite, infecção de múltiplos órgãos, pericardite e vulvovaginites (Fromtling et al, 1987).

C. tropicalis tem mostrado na maioria dos casos sensibilidade aos triazóis e à Anfotericina B. Esta informação é importante para a comunidade médica, particularmente para os hospitais e clínicas que são responsáveis pelo tratamento dos imunocomprometidos (Fromtling et al, 1987).

1.6 Candida glabrata

C. glabrata surgiu recentemente como um patógeno significativo em diferentes ambientes hospitalares, onde é responsável por um crescente número de infecções sistémicas.

Num estudo recente, *C. glabrata* foi a segunda espécie de *C. não albicans* mais comum como causa de fungemia nos Estados Unidos (Sanguinetti et al, 2005). *C. glabrata* é também a espécie de *Candida* mais frequentemente isolada da cavidade oral de pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana - (VIH) (Fernandes et al, 2009; Fidel et al, 1999; Sanguinetti et al, 2005).

O aumento do número de infecções sistémicas causadas por *C. glabrata* merece uma grande preocupação devido à alta taxa de mortalidade associada a fungemia com *C. glabrata* e à propensão destes microorganismos desenvolvem rapidamente resistência aos azóis. Vários estudos têm revelado que uma percentagem significativa de isolados clínicos de *C. glabrata* é resistente ao Fluconazol (cerca de 9%) e ao Itraconazol (37 a 40%) (Bossche et al, 1992; Sanguinetti et al, 2005).

Candida glabrata é normalmente menos sensível ao Fluconazol e apresenta (CMI) maior para Anfotericina B (Sanguinetti et al, 2005).

1.7 Candida parapsilosis

Candida parapsilosis é a espécie de *Candida não-albicans* mais frequentemente isolada de culturas de sangue na maioria das regiões do mundo fora dos Estados Unidos (Gomez-Lopez et al, 2008).

C. parapsilosis é mais frequentemente isolada da pele e geralmente é responsável pela infecção em recém nascidos, transplantados e pacientes a realizar nutrição parenteral (Gomez-Lopez et al, 2008; Silva et al, 2009). É conhecida pela capacidade de formar biofilmes em cateteres e outros dispositivos implantados, pela propagação nosocomial através das mãos e pela persistência no ambiente hospitalar (Silva et al, 2009).

A frequência de candidose invasiva por *C. parapsilosis* tem aumentado nos últimos anos, sobretudo em Espanha e na América Latina. Felizmente, a infecção disseminada pela corrente sanguínea devido a esta espécie está associada com uma taxa de mortalidade significativamente mais baixa do que as infecções causadas por outras espécies de *Candida* (Gomez-Lopez et al, 2008).

Apesar da importância de *C. parapsilosis* como fungo nosocomial, poucos estudos têm abordado a epidemiologia global e o seu perfil de susceptibilidade antifúngica (Gomez-Lopez et al, 2008; Pfaller et al, 2008).

Embora esta espécie não seja considerada propensa a desenvolver resistência aos antifúngicos, diversos relatórios sugerem que a sensibilidade diminuída a azóis e Equinocandinas pode ser motivo de preocupação (Gomez-Lopez et al, 2008; Moudgal et al, 2005).

Duas novas espécies denominadas *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* têm sido recentemente propostas, pois *C. parapsilosis* apresenta uma composição genética variável (Gomez-Lopez et al, 2008). Verificou-se que a *C. parapsilosis* forma um complexo composto por três grupos geneticamente distintos. O grupo I é relativo à *C. parapsilosis*, o grupo II e III relativo à *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* respectivamente (Silva et al, 2009).

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

O interesse por uma melhor caracterização do grupo *psilosis* depende não só da epidemiologia de *C. parapsilosis*, mas também de suspeitas sobre as diferenças dos perfis de susceptibilidade antifúngica da *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* (Gomez-Lopez et al, 2008; Silva et al, 2009). A diferença de susceptibilidade entre as três espécies pode influenciar as escolhas terapêuticas (Silva et al, 2009).

Embora *C. parapsilosis* não seja considerada propensa ao desenvolvimento de resistência antifúngica, diversos relatórios sugerem a sua diminuída sensibilidade aos azóis e equinocandinas se pode tornar motivo de interesse clínico (Silva et al, 2009).

Estas duas novas espécies podem habitar nichos importantes em determinadas populações de pacientes, salientando assim a necessidade de vigilância contínua em cada país para monitorizar a prevalência e distribuição dessas três espécies (Silva et al, 2009).

1.8 Candida guilliermondii

C. guilliermondii é uma espécie rara de *Candida*, mais frequentemente associada com onicomicoses, sendo raramente vista como uma causa de infecção fúngica invasiva (Pfaller et al, 2006). Dick e colaboradores, relatou um caso de candidíase disseminada provocada pela *C. guilliermondii* em que o paciente morreu apesar da terapia com Anfotericina B. O organismo demonstrou por ensaios “*in vitro*” ser resistente à Anfotericina B (Dick et al, 1985; Pfaller et al, 2006). A resistência ao fluconazol foi relatada num caso de osteomielite do dedo causada por *C. guilliermondii* (Pfaller et al, 2006). A infecção não respondeu ao tratamento prolongado com fluconazol (400 mg / dia), tendo sido necessária a amputação dos dedos afectados (Pfaller et al, 2006).

Esses relatórios sugerem que, embora raramente isolada *C. guilliermondii* pode apresentar susceptibilidade diminuída a diversas classes de antifúngicos, podendo ser transmitida de paciente para paciente em ambiente hospitalar. Dados disponíveis sugerem que a *C. guilliermondii* apresenta sensibilidade diminuída para polienos, azóis, flucitosina e equinocandinas (Hitchcock et al, 1993; Pfaller et al, 2006).

Existe pouca informação relacionada com a epidemiologia, frequência de ocorrência, e perfil de susceptibilidade antifúngica desta espécie rara de *Candida* (Pfaller et al, 2006).

1.9 Candida rugosa

Embora sendo bastante rara como causa de infecções fúngicas invasivas, *C. rugosa* foi recentemente citada como um possível fungo patógeno emergente (Pfaller et al, 2006).

A fungemia devido a esta espécie de *Candida* só foi reconhecida em 1985 (Pfaller et al, 2006).

Posteriormente, Dube e colaboradores relataram 15 episódios de candidemia por *C. rugosa* em pacientes queimados que recebiam tratamento com nistatina tópica num hospital dos Estados Unidos da América (Dube et al, 1994; Pfaller et al, 2006).

Nenhuma fonte óbvia das infecções foi encontrada, porém, os isolados mostraram-se resistentes à Nistatina e apresentaram susceptibilidade reduzida à Anfotericina B e ao Fluconazol (Pfaller e Diekema, 2004; Pfaller et al, 2006).

Mais recentemente, um conjunto de seis episódios de candidemia causada por *C. rugosa* foi relatado no Brasil (Pfaller et al, 2006).

Em resumo, *C. rugosa* pode apresentar uma diminuição da susceptibilidade à Anfotericina B e ao Fluconazol, pode causar fungemia associada a cateteres em pacientes gravemente doentes, pode ser transmitida de paciente para paciente em ambiente hospitalar e pode ser endêmica nalgumas instituições (Pfaller e Diekema, 2004; Pfaller et al, 2006).

Tirando estas poucas observações, existe uma escassez de informações sobre a epidemiologia, a frequência de ocorrência, e o perfil de susceptibilidade antifúngica desta espécie de *Candida* (Pfaller et al, 2006).

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

Candidoses

As infecções provocadas por leveduras são as mais frequentes.

C.albicans sendo um comensal do tubo digestivo do homem, dos mamíferos e das aves, continua a ser a espécie responsável por maior número de infecções humanas. As infecções podem-se apresentar por afecções mucocutâneas ou por outras de localização profunda, tais como septicemias, endocardites, meningites e peritonites (Ferreira e Sousa, 2000).

Muitas formas de candidoses mucocutâneas respondem bem à terapêutica tópica ou sistémica com antifúngicos azóis.

Dentro das candidoses mucocutâneas elas podem ser consideradas agudas ou crónicas, sendo que dentro das agudas as mais frequentes são as bucais e peribucais.

As candidoses bucais (Fig.1) são caracterizadas pelo aparecimento de pequenas pápulas brancas, muito aderentes formando uma camada cremosa que pode cobrir a língua, o palato e a faringe. Pode também atingir os cantos da boca, dando origem às boqueiras ou queilite angular (Ferreira e Sousa, 2000; Sheenan et al, 1999).

A candidose esofágica é uma outra forma de candidose, normalmente observada em cancerosos e em indivíduos infectados pelo VIH.



Figura 2: Candidose oral. (Fonte: www.positivenation.co.uk/issue127/pics/ORAL (Consultado a 31 de Março de 2010))

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

As candidoses genitais podem ocorrer tanto nos homens como nas mulheres, aparecendo no entanto com maior frequência nas mulheres. As causas mais frequentes de vulvovaginites são o uso abusivo de antibióticos, a gravidez, a diabetes, o uso de contraceptivos orais e de outros medicamentos que alteram a flora vaginal normal nomeadamente a nível de pH, tornando-a num meio adequado para a proliferação de fungos (Ferreira e Sousa, 2000; Sheenan et al, 1999).

Estima-se que 75% das mulheres tenham durante a sua vida um episódio de candidose vaginal. Nas mulheres as candidoses manifestam-se pelo aparecimento de um corrimento esbranquiçado de aspecto leitoso, originando prurido mais ou menos intenso (Fig.2). Nas grávidas é necessário ter especial atenção às contaminações que podem ocorrer no momento do parto ou por via uterina ao feto (Ferreira e Sousa, 2000; Sheenan et al, 1999).

No homem estas afecções denominam-se de balanites, surgindo normalmente após o contacto sexual. São características pelo aparecimento de um eritema com prurido, seguido de pequenas pústulas no sulco balano-prepucial, e de corrimento mais ou menos abundante (Fig.3).

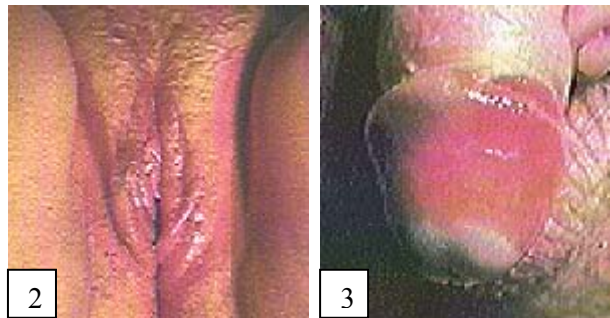


Figura 3 e 4: Vulvovaginite e Balanite. (Fonte: www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/candidiase (consultado em 31 de Março de 2010)).

A zona anal também pode estar sujeita a este tipo de afecção sendo caracterizada por prurido intenso com sensação de queimadura, ficando a pele macerada e com lesões circunscritas (Ferreira e Sousa, 2000).

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

A maioria das infecções nas unhas são causadas por fungos dermatófitos (Sheenan et al, 1999). As candidoses das unhas podem-se apresentar sob a forma de oníquia (Fig. 4A) e perioníquia (Fig. 4B).

Na perioníquia é característico o aparecimento de uma inflamação da pele periférica ungueal, apresentando-se vermelha, brilhante. Os factores que levam ao aparecimento das perioníquias são a manicure, as alterações hormonais, o sexo e a actividade profissional (Ferreira e Sousa, 2000).

A oníquia é a lesão na unha propriamente dita, aparecendo normalmente depois da perioníquia. Neste caso a unha apresenta estriação progressiva, discromia e opacificação da lâmina ungueal que acaba por se tornar friável. Pode dar origem ao descolamento da unha e passar para as outras unhas (Ferreira e Sousa, 2000).



Figura A e B: Oníquia (A) e Perioníquia (B). (Fonte: www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/onicomicos (Consultado em 31 de Março de 2010)).

O intertrigo interdigital é outro tipo de afecção provocado por *Candida spp.* e caracteriza-se por se localizar preferencialmente nas mãos e entre os dedos anelar e médio, embora possa aparecer noutros dedos. É normalmente associado com profissões em que existe um contacto muito frequente com a água (Ferreira e Sousa, 2000).

Podem afectar tanto os pés como as mãos, embora sejam menos frequentes nos pés. Pode ainda aparecer nas pregas submamárias (principalmente nas mulheres obesas), na prega suprapúbica, nas virilhas e no sulco interglúteo com formação de pequenas vesículas e pústulas, que por ruptura dão origem a pontos vermelhos exsudativos (Ferreira e Sousa, 2000).

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

IV – Infecções nosocomiais

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

A relevância das infecções de *Candida* em ambiente hospitalar passou a ganhar importância a partir da década de 1980, interligada ao avanço da tecnologia científica médica e do melhor conhecimento dos mecanismos desencadeadores de doenças, propiciando uma maior sobrevivência do Homem (Ribeiro et al, 2004).

Este facto fez com que as intervenções de procedimentos clínico-laboratoriais expusessem os pacientes a uma selectividade de microrganismos mais resistentes, favorecidos pelo uso indiscriminado ao longo do tempo dos fármacos disponíveis no mercado (Ribeiro et al, 2004). Deste modo, os relatos de espécies de *Candida* envolvidas em doenças humanas na condição de agente principal e/ou secundário tornaram-se mais frequentes, fazendo deste microrganismo um dos mais relevantes e intimamente associado às infecções nosocomiais (Mokaddas et al, 2007).

Mais uma vez, serve de reservatório básico de leveduras a condição endógena do fungo no Homem, pois encontra-se presente na pele dos profissionais de saúde participando na transmissão e indução de candidose, principalmente em pacientes debilitados ou submetidos a procedimentos terapêuticos em unidades de cuidados intensivos (UCIs) (Ribeiro et al, 2004).

Os antibióticos de largo espectro também podem tornar o paciente mais susceptível à infecção e colonização por parte dos fungos. O uso abusivo de antibióticos pode levar ao aumento da população de *Candida* a nível gastrointestinal e a colonização de espécies de *Candida* em vários locais da mucosa é um factor de risco para uma candidose invasiva. Por outro lado o uso de antifúngicos como medidas profiláticas pode reduzir tanto a colonização como a candidose invasiva (Nurozler et al, 2001).

A avaliação feita de contágio microbiológico dentro do ambiente hospitalar tem mostrado que factores como o contacto directo entre pacientes, contacto de pacientes com profissionais de saúde que levam os patógenos nas suas mãos, principalmente na dobra de dedos mal higienizados e nas unhas, em instrumentos cirúrgicos sem a devida assepsia e contacto com materiais hospitalares infectados, são de grande importância para a propagação da patologia fúngica dentro dos hospitais, nomeadamente no que se refere ao género *Candida* (Ribeiro et al, 2004).

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

Deste facto, se conclui que os profissionais que trabalham no hospital devem ser bem treinados quanto aos procedimentos de controlo das infecções nosocomiais.

Os farmacêuticos hospitalares podem contribuir treinando e o corpo de funcionários dos hospitais, quanto à adopção de medidas de higienização pessoal, de roupas e de materiais e da própria estrutura hospitalar. Também podem desenvolver pesquisas clínicas internas de estudo da susceptibilidade aos antifúngicos, consciencializando o corpo clínico-laboratorial do hospital para o uso racional dos medicamentos e a correcta administração dos mesmos (Ribeiro et al, 2004).

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

V – Classes de Antifúngicos

1. Polienos

Os antifúngicos poliênicos (Anfotericina B e Nistatina) alteram a função da membrana celular. Estes fármacos ligam-se à membrana celular dos fungos de forma irreversível, podendo combinar-se com os esteróis da membrana, rompendo-a ou alterando a sua permeabilidade. Nesses casos a susceptibilidade do fungo está relacionada com a presença de esteróis na membrana, de forma que, quanto menor a presença de esteróis, maior será a resistência do fungo ao antifúngico (Bagnato, 2008).

A anfotericina B é o antifúngico poliênico mais usado, pois tem um largo espectro sendo utilizada em infecções sistémicas graves (Bagnato, 2008).

1.1 Anfotericina B

A anfotericina B (AB) (Fig.6) é um antibiótico poliênico macrocíclico produzido naturalmente pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus* (Filipin e Souza, 2006). É um agente fungicida com actividade contra a maioria de fungos patogénicos e das leveduras, e é o padrão-ouro para o tratamento das infecções disseminadas causadas por vários microorganismos incluindo *Aspergillus* e *Candida* (Barker et al, 2004; Echevarria et al, 2006; Rang et al, 2008).

O nome Anfotericina deriva da característica anfotérica de sua estrutura molecular, formando tanto sais solúveis em meio ácido como em meio básico. A AB é pouco solúvel na maioria dos solventes. Com excepção do dimetilsulfóxido (DMSO) e da dimetilformamida, é praticamente insolúvel em soluções aquosas de pH neutro. A solubilidade de AB em água pode ser aumentada por adição de lauril sulfato de sódio (SLS) ou desoxicolato de sódio (DOC). A AB também se dissolve em vesículas de lecitina e colesterol e em esteróides constituintes de membranas naturais (Barker et al, 2004; Rang et al 2008).

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

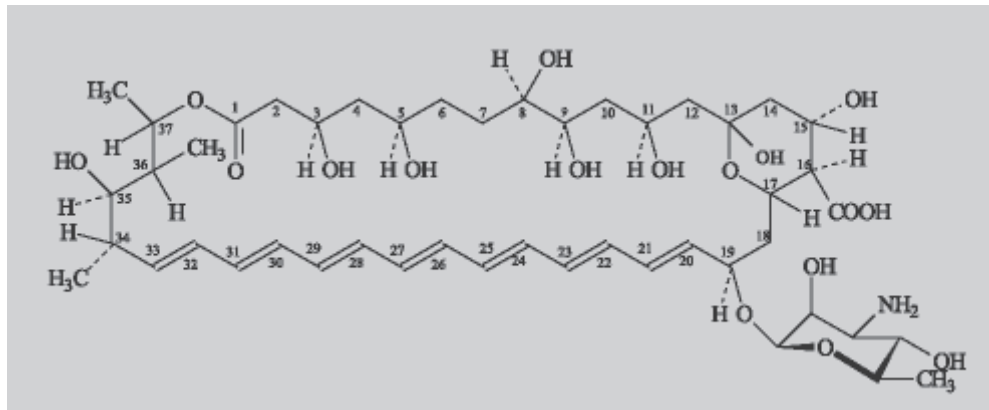


Figura 5: Estrutura química da Anfotericina B. (Fonte: Filippin et al, 2006)

O seu mecanismo de acção consiste na sua ligação ao ergosterol da membrana celular fúngica, levando à formação de poros através de membranas lipídicas, tendo como consequência a alteração da permeabilidade celular que permite a perda de iões (principalmente iões potássio) e metabolitos, podendo levar à morte celular (Rang et al 2008).

Mesmo com a sua elevada toxicidade e a introdução de antifúngicos azólicos sistémicos na década de 1980, a sua potência, o seu espectro de acção e os quase 50 anos de experiência clínica têm assegurado que a AB permaneça como fármaco de escolha no tratamento da maioria das micoses sistémicas em pacientes imunocomprometidos (Filippin e Souza, 2006).

A Anfotericina B é muito pouco absorvida quando administrada oralmente, sendo esta via apenas usada para o tratamento de infecções fúngicas do tracto gastrointestinal superior. Ela pode ser usada topicamente com sucesso, porém para as infecções sistémicas é geralmente administrada por injeção intravenosa lenta, formando complexos com lipossomas ou com outras preparações contendo lípidos. Isto melhora a farmacocinética e reduz o peso considerável dos efeitos secundários (Rang et al 2008).

A Anfotericina B tem uma extensa ligação às proteínas, penetra pouco nos tecidos e nas membranas, embora seja encontrada em concentrações bastante altas nos exsudados inflamatórios e possa atravessar mais rápido a barreira hematoencefálica quando as meninges estão inflamadas. Quando é administrada por via intravenosa é usada com a Flucitosina para tratar a meningite criptocócica. A Anfotericina B também reforça o efeito da Flucitosina,

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

oferecendo uma útil combinação sinérgica é eliminada muito lentamente através do rim, sendo encontrada na urina durante 2 meses ou mais após a administração (Rang et al 2008).

Pela necessidade de se alcançar níveis terapêuticos rapidamente, actualmente recomenda-se, que a Anfotericina B seja iniciada imediatamente na dose de 0,6 a 1 mg/kg/dia. A sua afinidade para a membrana torna-a quase insolúvel em água, de modo que formulações de Anfotericina B convencional são usadas com desoxicolato, um potente detergente que solubiliza a Anfotericina B em micelas para administração intravenosa (Bekersky et al, 1999; Moreira M., 2005).

Não há vantagens em tempos de perfusão prolongados. Tempos de perfusão mais curtos aumentam a disponibilidade da droga, por aumentar o gradiente sangue-tecido, e não elevam a frequência de reacções adversas. Não existe necessidade de proteger a Anfotericina B da luz fluorescente (Moreira M., 2005).

A afinidade da Anfotericina B pelo colesterol vem sendo há muito estudada, tanto em modelos celulares como em membranas lipossômicas. Assim, embora a AB possua maior afinidade pelo ergosterol, muitos dos efeitos tóxicos que lhe são atribuídos são resultado da sua capacidade em ligar-se ao colesterol e a outros constituintes da membrana celular de mamíferos (Filipin e Souza, 2006).

As reacções adversas agudas provocadas pela administração intravenosa da Anfotericina B incluem febre, calafrios, tremores, náuseas, vômitos e dor de cabeça e estão associados com a velocidade da perfusão. Podem ser impedidos pelo abrandamento da taxa de perfusão, adicionando um anti-inflamatório, ou utilizando hidrocortisona antes ou durante a perfusão (Echevarria et al, 2006; Filipin e Souza, 2006). Alterações cardiovasculares como hipotensão, hipertensão e arritmias cardíacas foram observadas com menor frequência. Administrações repetidas podem provocar hipocalemia, hipernatremia, diurese aumentada, hipomagnesemia, disfunção renal e efeitos tóxicos sobre a medula óssea (anemia, leucopenia e trombocitopenia) (Filipin e Souza, 2006). O fármaco é ainda irritante para o endotélio vascular, e a tromboflebite local é por vezes visível após injeção intravenosa. As injeções

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

intratecais podem causar neurotoxicidade, e as aplicações tópicas causam erupção cutânea (Rang et al 2008).

O efeito tóxico mais grave é a insuficiência renal aguda mediada por dois mecanismos independentes. Um destes mecanismos inclui um aumento da resistência da arteríola aferente e outro ocorre aquando do aumento da permeabilidade tubular (Mohan et al, 2007). O aumento agudo da resistência da arteríola aferente causado pela Anfotericina B reduz o fluxo renal sanguíneo e a taxa de filtração glomerular. Alguns estudos sugerem, que a superfície da mucosa (lado luminal) é o principal local de acção da Anfotericina B (Mohan et al, 2007). O aumento da permeabilidade da membrana tubular luminal a catiões monovalentes resulta na formação de poros intramembranosos que causam um aumento na circulação de iões K^+ e H^+ através da membrana luminal de acordo com os seus respectivos gradientes electroquímicos. Este movimento leva ao aumento da perda de potássio na urina. Monitorizações da ureia, creatinina, magnésio, potássio sérico, hematócrito e plaquetas são necessárias durante o tratamento (Mohan et al, 2007). Nos recém nascidos a toxicidade da Anfotericina B é menos severa do que nos adultos, pois estes apresentam uma tolerância maior a este fármaco (Leibovitz E., 2002; Moreira M., 2005).

A distinção mais importante entre os fungos e os mamíferos é o esterol presente na membrana celular. Os mamíferos apresentam colesterol, enquanto os fungos apresentam ergosterol. Como resultado, o ergosterol e a sua via biossintética servem como alvos para os agentes antifúngicos (Filipin e Souza, 2006).

A classe dos polienos é conhecida por actuar no ergosterol da membrana celular, criando poros e causando lise celular. A Anfotericina B é um dos antifúngicos mais eficazes, devido à sua actividade fungicida bem como pelo facto de os fungos não desenvolverem frequentemente resistência a este composto. Por estas razões AB continua a ser a primeira escolha para o tratamento de muitas infecções fúngicas sistémicas. No entanto apesar desta ser muito eficaz contra a maioria dos fungos patogénicos, existe um patógeno oportunista *Candida lusitanae* que exhibe anormalmente elevada resistência intrínseca ou adquirida ao fármaco (Filipin e Souza, 2006).

1.1.1 Novas formulações de Anfotericina B

De forma a reduzir os efeitos tóxicos, (especialmente a nefrotoxicidade), provocados pela Anfotericina B foram criadas formulações lipídicas de Anfotericina B. Estas novas formulações permitem utilizar doses mais elevadas do fármaco e uma maior concentração no sistema retículo endotelial associadas a uma menor nefrotoxicidade (Tabela 1). O complexo lipídico, o complexo lipossomal e o complexo de dispersão coloidal de Anfotericina B estão indicados quando há falência do tratamento com a Anfotericina B convencional, ou quando, devido à toxicidade não é possível a utilização das formulações convencionais, como é o caso dos pacientes com insuficiência renal prévia e de crianças que apresentem aumentos significativos da creatinina durante o tratamento (níveis acima de 1,5 mg por decilitro) (Moreira M., 2005).

AmBisome é uma preparação lipossômica de vesículas unilamelares pequenas, constituídas de fosfatidilcolina hidrogenada de soja, colesterol, diesteroilfosfatidilglicerol (DMPG) e AB. Estas vesículas unilamelares permitem uma melhor distribuição nos tecidos, níveis mais elevados no sangue, e menor toxicidade (Sulis et al, 2002). As únicas propriedades terapêuticas da Anfotericina lipossomal estão ligadas à sua capacidade em alterar a farmacocinética, a distribuição, e os perfis de excreção da Anfotericina no organismo. A Anfotericina B lipossomal produz altos níveis do fármaco no plasma e nos tecidos, enquanto diminui acentuadamente a excreção do fármaco inalterado na urina e nas fezes (Bekersky et al, 2002).

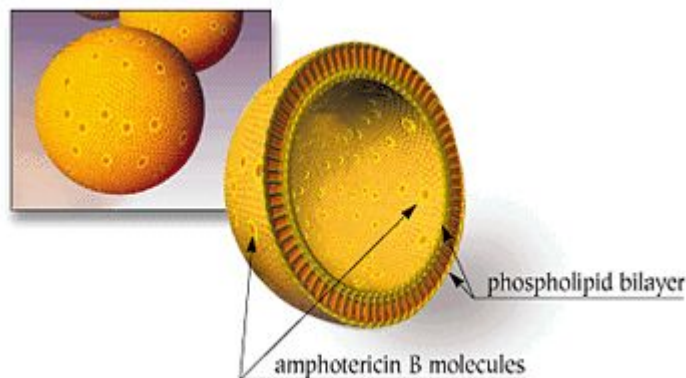


Figura 6: AmBisome. (Fonte: www.stephenwilliamson.com/studies/ampb.htm (Consultado em 28 de Julho de 2010)).

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

Amphocil é uma dispersão coloidal de Anfotericina B complexada com sulfato de colesterol com razão molar de 1:1, para formar pequenos discos lipídicos.

O complexo lipídico de Anfotericina B (Abelcet) consiste na Anfotericina B complexada com dois fosfolípidos (DMPC) e (DMPG). Abelcet reduz a toxicidade renal nas doses recomendadas (1,0-5,0 mg / kg por dia), mas com doses maiores mostra alguns dos efeitos tóxicos nos órgãos ricos em células fagocíticas (fígado, baço). De facto, esta formulação reduz a dose de Anfotericina B entregue aos rins, mas é rapidamente removida do sangue acumulando-se nos órgãos do sistema fagocítico mononuclear (Larabi et al, 2004).

Tabela 1 – Características dos lípidos de formulações de anfotericina B			
	Abelcet	Amphotec	AmBisome
Tipo	Complexada com 2 fosfolípidos	Complexo de discos lipídicos	Lipossoma unilamelar
Tamanho (nm)	1-10	0,12	<0,1
Composição lipídica	Fosfolípidos fluídos	Sulfato de colesterol	Fosfolípidos rígidos, colesterol
Anfotericina B (Peso %)	50	65	12,5
C_{máx} (µg/ml)	1,7	3,1	83

Adaptado de Bekersky et al, 1999

1.2. Outros polienos

A Nistatina é um antifúngico poliénico com estrutura similar à da Anfotericina B e com o mesmo mecanismo de acção. O seu uso é limitado principalmente às infecções por *Candida* da pele, das membranas mucosas e do tracto gastrointestinal. Após a sua administração podem ocorrer náuseas, vómitos e diarreia. O seu uso é contra-indicado na gravidez e amamentação (Rang et al 2008).

1.3. Resistência aos polienos

Os principais mecanismos envolvidos no desenvolvimento da resistência aos antifúngicos poliénicos compreendem a diminuição ou ausência de esteróis de membrana ou formação de ergosterol que leva ao aumento da actividade da enzima catalase no interior da célula fúngica, impedindo a formação de radicais livres responsáveis pela formação de “poros” na membrana fúngica.

O uso de diferentes antifúngicos também pode contribuir para alterar a fisiologia dos fungos, seleccionando os resistentes aos fármacos poliénicos. Verificaram ainda que duas nitrosouréias {1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea (CCNU) e a 1,3-bis-(2-chloroethyl)-1 nitrosourea(BCNU)} interferem na acção antifúngica da Anfotericina B, em decorrência de seus isocianatos promoverem o aumento da catalase intracelular em leveduras do género *Candida*, tornando-as resistentes ao dano lítico provocado pelos antifúngicos poliénicos (Filipin e Souza, 2006).

Um estudo encontrou também uma correlação entre a resistência à Anfotericina B e a composição consistente do esteroide com um defeito na $\Delta 8-7$ isomerase Erg2, o que pode também resultar na resistência à anfotericina B em *C. albicans* e *Cryptococcus neoformans*. Para testar a hipótese de que ERG6 desempenha um papel semelhante no desenvolvimento de resistência à Anfotericina B em *C.lusitaniae*, foi isolado, clonado e sequenciado um ERG6 mutante com defeito na biossíntese de ergosterol, na qual foi observada resistência *in vitro* à AB. Desta forma estirpes ERG6 mutantes são viáveis, mas apresentam um defeito grave do

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

crescimento, aumentam a resistência à Anfotericina B e aumentam a susceptibilidade a azóis e à terbinafina (Filipin e Souza, 2006; Young et al, 2003). Uma segunda possibilidade para a resistência à Anfotericina B seria a ocorrência de outras modificações fenotípicas com alterações na síntese de proteínas e enzimas, como por exemplo, a produção de uma enzima capaz de degradar o antifúngico. Assim, estirpes de *C. neoformans* que foram expostas a baixas concentrações de AB por 48 horas apresentaram modificações no metabolismo lipídico sendo de substancial importância a diminuição no conteúdo de ergosterol. A presença de ergosterol é essencial na actuação da Anfotericina B (Filipin e Souza, 2006).

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

VI – Susceptibilidade das *Candidas spp* à Anfotericina B

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

1. Objectivos do estudo

Foi realizado um estudo de susceptibilidade pelo método de microdiluição em caldo, conforme documento M27-A2 do NCCLS *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, actualmente chamado *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* com o objectivo de avaliar a susceptibilidade de várias espécies de *Candida* à Anfotericina B.

2. Material e métodos

2.1. Reagentes

O Sabouraud Dextrose agár (SDA) foi adquirido na BBL. Excepto quando indicado todos os reagentes foram adquiridos à Sigma.

2.2. Preparação da solução de Anfotericina B

A Anfotericina B foi pesada em balança analítica calibrada.

A concentração de Anfotericina B foi ajustada a 1600µg/ml em DMSO. A solução assim preparada foi armazenada a -20° C.

2.3. *Candida spp.*

As estirpes de *Candida* foram obtidas por isolamento a partir de amostras clínicas e identificadas, fazendo parte da colecção de *Candida* existentes no CEBIMED.

As estirpes de *Candida* foram cultivadas em SDA durante 16-24h antes de cada experiência.

2.4 Determinação da Concentração Mínima Inibitória

A CMI da anfotericina B foi calculada de acordo com a norma M27-A2 do CLSI (NCCLS, 2002).

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

Resumidamente a solução Stock de Anfotericina B foi diluída em RPMI, tamponado com MOPS (1:2) dentro de uma gama de concentrações de 16µg/ml a 0,0313µg/ml.

A CMI, definida como a menor concentração que inibe totalmente o crescimento das leveduras, foi determinada para cada uma das diferentes estirpes de *Candida* (conc. em CFU/ml) após incubação durante 48 a 35°C.

Em todas as experiências foram incluídas um controlo negativo (meio de cultura), um controlo positivo (estirpe em meio de cultura) e um branco do composto (Anfotericina B em meio de cultura).

Foram ainda introduzidas em todas as experiências estirpes de *Candida* controlo, como *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019, de acordo com as indicações constantes na norma M27-A2 do CLSI (NCCLS, 2002).

A classificação de estirpe sensível ou resistente foi feita de acordo com as indicações do CLSI na norma M27-A2 (Tabela 2).

Tabela 2: Directrizes de interpretação dos testes de susceptibilidade “in vitro” das espécies de *Candida*.

Antifúngico	Susceptível	Intermédio	Resistente
Anfotericina B	< 1,0 µg/ml	-	> 1,0 µg/ml

Tabela 3: Limites recomendados para CMI de 48 horas

Organismo	Varição	Antifúngico	Varição do CMI (µg/mL)	% de CMI dentro da variação
Candida parapsilosis ATCC 22019	QC	Anfotericina B	0,25-1,0	99,1
Candida krusei ATCC 6258	QC	Anfotericina B	0,25-2,0	99,5

3. Resultados

3.1 Origem da amostra

As leveduras do género *Candida* têm grande importância pela elevada frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano. Para tal este estudo engloba amostras quer a nível hospitalar quer a nível de ambulatório.

Num total foram estudadas 58 leveduras de *Candida* provenientes de diferentes isolados clínicos.

Tabela 4: Susceptibilidade das estirpes de *Candida* à Anfotericina B

Perfil de Susceptibilidade	Número de estirpes
Sensível	20
Resistente	38
	Total
	58

4. Discussão

De acordo com a tabela 3, a percentagem de resistências é de cerca de 65,5%. Esta percentagem é demasiado elevada, quando comparada com os estudos actualmente disponíveis que a situam entre 1% e 7% (Bourgeois et al, 2010; Diekema et al, 2009; Mokaddas et al, 2007; Zepelin et al, 2007;)

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

Grande parte da variação das CMI dos antifúngicos pode ser explicada em função de variações na metodologia. Tal como acontece com os testes de susceptibilidade antimicrobiana, a CMI depende da preparação do inóculo, da composição e do pH do meio e da duração e temperatura de incubação (Cormican e Pfaller, 1996).

A CLSI padronizou a susceptibilidade “*in vitro*” para a pesquisa de fungos.

O método de microdiluição especifica um meio de ensaio definido, bem como um inóculo padronizado, e recomenda a determinação visual do ponto final da CMI para *Candida spp.*, após incubação a 35°C durante 48 horas. Embora as técnicas sejam caracterizados pela sua alta confiabilidade e reprodutibilidade, a utilização de procedimentos CLSI tem algumas limitações. Um grande problema a ser resolvido é a leitura e determinação da concentração que corresponde à CMI. A leitura visual implica evidentemente erros inerentes ao operador. A determinação da CMI é ainda dificultada pela existência do “trailing”, que é definido como uma redução, mas um crescimento persistente sobre uma ampla gama de concentrações do antifúngico (Sabra et al, 2009).

Assim compreende-se que um investigador inexperiente tenha dificuldade em determinar com exactidão a CMI, e ser coerente nas sucessivas experiências. Alguns autores tentam obviar este problema fazendo a leitura em espectrofotómetros, ou incluindo na experiência compostos como o Alamar azul (Cormican e Pfaller, 1996; Estrella et al, 2001). Talvez por isso os resultados obtidos sejam tão discrepantes dos referidos na bibliografia. O possível erro de interpretação realizado foi colocado em várias experiências até pela discordância de valores para a estirpe controlo (*C. krusei*).

Apesar do considerável esforço que foi para definir e padronizar os parâmetros do teste M27-A2 muitos autores indicaram que para os testes com *Candida spp.* uma leitura com 24 horas pode melhorar a reprodutibilidade e ter melhores correlações com respostas “*in vivo*” do que com o tempo de leitura recomendado de 48 horas, pois por vezes isolados que aparecem sensíveis após 24 horas tornam-se resistentes após 48 horas de incubação (Pfaller et al, 2002; Rambali et al, 2001).

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

Este método é demorado, caro e tecnicamente difícil de executar. Além disso, foi recentemente demonstrado que o método de referência NCCLS tem uma capacidade limitada para detectar isolados resistentes à Anfotericina B (Wanger et al, 1995).

Quando o teste de susceptibilidade é feito de acordo com o método de referência NCCLS, é feita uma leitura um pouco subjectiva das placas através da formação de turvação que indica crescimento. Tal situação pode levar a erros de leitura, dado que as pessoas não fazem todas a mesma leitura, pois a visualização é difícil. Por outro lado, o facto de ser executado por diferentes pessoas também deve ser considerado, pois pessoas diferentes fazem leituras diferentes. Vários estudos demonstraram que a turvação pode às vezes ser muito leve, dependendo principalmente de variáveis como a concentração de glicose e tempo de incubação. A leitura deste teste feita através do espectrofotómetro revela-se mais confiável do que o exame das placas por olho (Rambali et al, 2001).

Enquanto muitos consideram que o método M27-A2 tem levado a um acordo entre laboratórios em relação às determinações do CMI em *Candida spp.*, há indícios que nem sempre é esse o caso. Há estudos que indicam, que o meio de crescimento, o pH, e até mesmo o solvente utilizado para preparar o antifúngico podem afectar a CMI (Rambali et al, 2001).

Além disso a evidência de correlação entre os progressos clínicos e os resultados de susceptibilidade à AB é limitada devido à falta de um meio confiável de detecção de resistência a esse antifúngico que emprega o método de referência (Estrella et al, 2001).

As CMI de Anfotericina B obtidas para as diferentes espécies de *Candida* são, em geral, distribuídas num intervalo muito estreito (0,25-1µg/ml), e o método CLSI actualmente não consegue distinguir com confiança isolados resistentes e sensíveis.

Isolados resistentes e sensíveis têm CMI diferentes quando são feitos vários testes.

Esta desvantagem dos testes de susceptibilidade à Anfotericina B aplica-se também a fungos filamentosos e não só a leveduras (Mayers et al, 2009).

A detecção da resistência a antifúngicos “*in vitro*” é potencialmente útil para seleccionar a melhor terapia para um determinado paciente. Infelizmente nem sempre é fácil demonstrar

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

uma clara correlação entre as medidas de susceptibilidade “*in vitro*” e uma resposta “*in vivo*”.

Em especial, a detecção de resistência à Anfotericina B tem provado ser tecnicamente difícil. Para isolados de *Candida*, o método M27-A2 do NCCLS é muitas vezes incapaz de identificar os isolados resistentes à Anfotericina B (Lozano-Chiu et al, 1998).

O objectivo dos testes de laboratório com agentes antifúngicos é de obter indicação reprodutível da susceptibilidade de microrganismos isolados de um agente “*in vitro*”. Se o teste for para ter qualquer valor clínico o resultado deve ter um valor razoável para determinar o resultado da terapia com agentes “*in vivo*”. Porém, na prática, a interpretação clínica dos resultados dos testes de sensibilidade não é fácil (Rambali et al, 2001).

Outros métodos tentam suprir estas dificuldades.

Por substituição do meio RPMI 1640 pelo antibiótico médio 3 tamponado a pH 5 ou 7, Rex et al. foram capazes de discriminar entre isolados de *Candida* susceptíveis à Anfotericina B e isolados de *Candida* resistentes à Anfotericina B, pois gera-se uma ampla gama de CMI, melhorando a detecção de isolados menos susceptíveis à Anfotericina B. No entanto, AM3 não é um meio definido, sendo que muitas variações no lote podem reduzir a reprodutibilidade dos resultados de CMI (Lozano-Chiu et al, 1998).

Alguns estudos indicam que o Etest proporciona melhor discriminação entre isolados de *Candida* resistentes e sensíveis à anfotericina B, relativamente ao método de referência CLSI. Sugeriram ainda que CMI obtidos por este teste são mais confiáveis para posterior tratamento. O Etest consiste numa uma tira de plástico com antifúngicos de um lado da tira e uma escala numérica do outro lado. Quando é aplicado numa placa de agár, um gradiente contínuo de antifúngicos é estabelecido à volta agár. Ocorre uma elipse de inibição de crescimento e ocorre a intersecção da elipse com a escala numérica da tira permitindo a leitura da CMI (Cormican, Pfaller, 1996). Além disso, o Etest foi capaz de identificar isolados resistentes à Anfotericina B (Sheehan et al, 1999).

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

Estudos anteriores também sugerem que a concentração fungicida mínima (CFM) pode ser uma medida mais precisa de susceptibilidade microbiana aos agentes fungicidas, tais como Anfotericina B (Park et al, 2006; Sheehan et al, 1999).

O uso do AM3 em combinação com o Etest demonstrou melhorar ainda mais a capacidade em detectar isolados resistentes. Infelizmente, a utilização deste meio não está isenta de dificuldades. Pelo facto dos seus componentes não estarem completamente definidos, o potencial para variações significativas de lote para lote está presente. Embora essa variação seja mínima, pelo menos para lotes de AM3 em curso, um estudo realizado por Nguyen e colaboradores enfatiza o potencial de variabilidade interlaboratorial quando este meio é usado (Lozano-Chiu et al, 1998).

Novos estudos para identificar um controle de qualidade adequado dos isolados e estabelecer uma reprodutibilidade interlaboratorial estão a ser feitos (Rambali et al, 2001; Sheehan et al, 1999).

5. Conclusão

No âmbito deste estudo conclui-se que a detecção da resistência a antifúngicos “*in vitro*” é potencialmente útil para seleccionar a melhor terapia para um determinado paciente. Infelizmente, nem sempre é fácil demonstrar uma clara correlação entre em medidas de susceptibilidade “*in vitro*” e uma resposta “*in vivo*”.

Para tal, e de forma a escolher a melhor terapêutica, é empírico a utilização de métodos que originem resultados fiáveis e exactos, pois um erro na detecção da susceptibilidade do antifúngico pode ter consequências graves na escolha da terapêutica e consequentemente na saúde do utente.

Os profissionais de saúde devem também ser consciencializados para a melhor escolha terapêutica de forma a não prescreverem indiscriminadamente antifúngicos, contribuindo assim para o aumento das resistências, bem como para o aumento da prevalência de leveduras do género *Candida*.

O Etest, bem como a substituição do meio RPMI 1640 pelo AM3 e a determinação da concentração fungicida mínima (CFM) fornecem uma boa alternativa ao método utilizado proporcionando melhor discriminação entre isolados de *Candida* resistentes e sensíveis à Anfotericina B.

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

VII – Bibliografia

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

Bagnato, V.S. (2008). *Novas Técnicas Ópticas para as áreas da saúde*, Livraria da Física.

Barchiesi, F. Calabrese, D. Sanglard, D. Francesco, L.F. Caselli, F. Giannini, D. Giacometti, A. Gavaudan, S. Scalise, G. (2000). Experimental Induction of Fluconazole Resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, (6), pp. 1578-1584.

Barker, S. K. Crisp, S. Wiederholds, N. Lewis, E. R. Bareither, B. Eckstein, J. Barbuch, R. Bard, M. Rogers, D.P. (2004). Genome-wide expression profiling reveals genes associated with amphotericin B and fluconazole resistance in experimentally induced antifungal resistant isolates of *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54, pp.376–385.

Bekersky, I. Fielding, R.M. Donald, B. Lawrence I. (1999). Lipid-based amphotericin B formulations: from animals to man. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 2 (6), pp. 230–236.

Bossche, H.V. Marichal, P. Odds, F.C. Jeune, L. Coene, M.C. (1992). Characterization of an Azole-Resistant *Candida glabrata* Isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36, (12), pp. 2602-2610.

Borman, A.M. Petch, R. Linton, C.J. Palmer, M.D. Bridge, P.D. Johnson, E.M. (2008). *Candida nivariensis*, an Emerging Pathogenic Fungus with Multidrug Resistance to Antifungal Agents. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, (3), pp.933-938.

Bourgeois, N. Dehandschoewerker, L. Bertout, S. Bousquet, P.J. Rispaill, P. Lachaud, L. (2010). Antifungal Susceptibility of 205 *Candida spp.* Isolated Primarily during Invasive Candidiasis and Comparison of the Vitek 2 System with the CLSI Broth Microdilution and Etest Methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, (1), pp.154-161.

Cannon, R.D. Chaffin, W.L. (1999) Oral Colonization By *Candida Albicans*. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*.

Cormican, M.G. Pfaller, M.A. (1996). Standardization of antifungal susceptibility testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 38, pp.561-578.

Dick, J. D., R. P. Rosengard, W. G. Merz, R. K. Stuart, G. M. Hutchins, and R. Saral. 1985. Fatal disseminated candidiasis due to amphotericin B-resistant *Candida guilliermondii*. *Ann. Intern. Med.* 102:67–68.

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

- Diekema, D.J. Messer, S.A. Boyken, L.B. Hollis, R.J. Kroeger, J. Tendolkar, S. Pfaller, M.A. (2009). In Vitro Activity of Seven Systemically Active Antifungal Agents against a Large Global Collection of Rare *Candida* Species as Determined by CLSI Broth Microdilution Methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 47, (10), pp.3170-3177.
- Dube, M. P., P. N. R. Heseltine, M. G. Rinaldi, S. Evans, and B. Zawachi. 1994. Fungemia and colonization with nystatin-resistant *Candida rugosa* in a burn unit. *Clin. Infect. Dis.* 18:77–82.
- Echevarria, J. Seas, C. Cruz, M. Chávez, E. Campos, M. Cieza, J. Gotuzzo, E. Llanos, A.(2006). Oral rehydration solution to prevent nephrotoxicity of Amphotericin B. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 75, (6), pp.1108-1112.
- Estrella, C. M. Guerra, D. M. T. Mellado, E. Tudela, R. L. J. (2001). Detection of Resistance to Amphotericin B in *Candida* Isolates by Using Iso-Sensitest Broth. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(7), pp. 2070-2074.
- Fernandes, R. Viegas, A. Cerqueira, F. (2009). *Candida* Species Distribution in Clinical Samples. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*. Porto. Edições Universidade Fernando Pessoa. pp. 264-271.
- Ferreira, W. Sousa, J.C. (2000). *Microbiologia Volume 2*, LIDEL.
- Fidel, P.L. Vazquez, J.A. Sobel, J.D. (1999). *Candida glabrata*: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans*. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, (1), pp. 80-96.
- Filippin, F.B. Souza, L.C. (2006). Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42, (2).
- Fromtling, R.A. Abruzzo, G.K. Giltinan, D.M.(1987). *Candida tropicalis* Infection in Normal, Diabetic, and Neutropenic Mice. *Journal of Clinical Microbiology*, 25, (8), pp.1416-1420.
- Gomez-Lopez, A. Alastruey-Izquierdo, A. Rodriguez, D. Almirante, B. Pahissa, A. Rodriguez-Tudela, J.L. Cuenca-Estrella, M. and the Barcelona Candidemia Project Study Group. (2008). Prevalence and Susceptibility Profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: Results from Population-Based Surveillance of Candidemia in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, (4), pp.1506-1509.

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

Hakki, M. Staab, J.F. Marr, K.A. (2006). Emergence of a *Candida krusei* Isolate with Reduced Susceptibility to Caspofungin during Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, (7), pp.2522-2524.

Hitchcock, C.A. Pye, G.W. Troke, P.F. Johnson, E.M. Warnock, D.W. (1993). Fluconazole Resistance in *Candida glabrata*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37, (9), pp.1962-1965.

Kirkpatrick, W.R. Revankar, S.G. Mcafee, R.K. Lopez-Ribot, J. Fothergill, A.W. McCarthy, D. I. Sanche, S.E. Cantu, R.A. Rinaldi, M.G. Paterson, T.F. (1998). 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, (10), pp.3007-3012.

Larabi, M. Pages, N. Pons, F. Appel, M. Gulik, A. Schlatter, J. Bouvet, S. Barratt, G. (2004). Study of the toxicity of a new lipid complex formulation of amphotericin B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53, pp.81-88.

Leibovitz, E. (2002). Neonatal candidosis: clinical Picture, management controversies and consensus, and new therapeutic options. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49, pp.69-73.

Londoño, P. Xiao, I. Gao, M. Bowe, F. McPheat, W.L. Booth, G. Dougan, G. (1998). Evaluation of the intranasal challenge route in mice as a mucosal model for *Candida albicans* infection. *Microbiology*, 144, pp. 2291-2298.

Lozano-Chiu, M. Paetznick, V.L. Ghannoum, M.A. Rex, J.H. (1998). Detection of Resistance to Amphotericin B among *Cryptococcus neoformans* Clinical Isolates: Performances of Three Different Media Assessed by Using E-Test and National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A Methodologies. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, (10), pp.2817-2822.

Mayers, D.L. Lerner, S.A. Ouellette, M. Sobel, J.D. (2009). Antimicrobial Drug Resistance. Volume 2.

Merz, W.G. (1984). *Candida lusitanae*: Frequency of Recovery, Colonization, Infection, and Amphotericin B Resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 20, (6), pp.1194-1195.

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

Mohan, S. Ahmed, S. Alimohammadi, B. Jaitly, M. Cheng, J. Pogue, V.A. (2007). Proteinuria lowers the risk of amphotericin B-associated hypokalaemia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60, pp.690-693.

Mokaddas, M. E. Al-Sweih, A. N. Khan, U. Z. (2007). Species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* bloodstream isolates in Kuwait: a 10-year Study. *Journal of Medical Microbiology*, 56, pp. 255-259.

Mora-Montes, H.M. Bates, S. Netea, M.G. Castillo, L. Brand, A. Buurman, E.T. Díaz-Jiménez, D.F. Kullberg, B.J. Brown, A.J.P. Odds, F.C. Gow, N.A.R. (2010) A multifunctional mannosyltransferase family *Candida albicans* determines cell wall mannan structure and host-fungus interactions. *JBC Papers in Press*.

Moreira, M.E.L. (2005). Controversies about the management of invasive fungal infections in very low birth weight infants. *Jornal de Pediatria*.

Moudgal, V. Little, T. Boikov, D. Vazquez, J. A. (2005). Multiechinocandin- and Multiazole-Resistant *Candida parapsilosis* Isolates Serially Obtained during Therapy for Prosthetic Valve Endocarditis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, (2), pp. 767-769.

NCLLS. (2002). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approved Standard- Second Edition.

Nguyen, M. H., C. J. Clancy, V. L. Yu, Y. C. Yu, A. J. Morris, D. R. Snyderman, D. A. Sutton, and M. G. Rinaldi. 1998. Do in vitro susceptibility data predict the microbiologic response to amphotericin B? Results of a prospective study of patients with *Candida* fungemia. *J. Infect. Dis.* 177:425–430.

Noel, T. François, F. Paumard, P. Chastin, C. Brèthes, D. Villard, J. (2003). Flucytosine-Fluconazole Cross-Resistance in Purine-Cytosine Permease-Deficient *Candida lusitanae* Clinical Isolates: Indirect Evidence of a Fluconazole Uptake Transporter. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, (4), pp.1275-1284.

Nurozler, F. Argenziano, M. Oz, M.C. Naka, Y. (2001). Fungal left ventricular assist device endocarditis. *Ann Thorac Surg*, 71, pp.614-618.

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

Odds, F.C. Rinaldi, M.G. Cooper, C.R. Fothergill, A. Pasarell, L. McGinnis, R. (1997). *Candida* and *Torulopsis*: a Blinded Evaluation of Use of Pseudohypha Formation as Basis for Identification of Medically Important Yeasts. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, (1), pp-313-316.

Orozco, A.S. Higginbotham, L.M. Hitchcock, C.A. Parkinson, T. Falconer, D. Ibrahim, A.S. Ghannoum, M.A. Filler, S.G. (1998). Mechanism of Fluconazole Resistance in *Candida krusei*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42, (10), pp.2645-2649.

Park, B.J. Arthington-Skaggs, B.A. Hajjeh, R.A. Iqbal, N. Ciblak, M.A. Lee-Yang, W. Hairstn, M.D. Phelan, M. Plikaytis, B.D. Sofair, A.N. Harrison, L.H. Fridkin, S.K. Warnock, D.W. (2006). Evaluation of Amphotericin B Interpretive Breakpoints for *Candida* Bloodstream Isolates by Correlation with Therapeutic Outcome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, (4), pp.1287-1292.

Perea, S. López-Ribot, J.L. Wickes, B.L. Kirkpatrick, W.R. Dib, O.P. Bachmann, S. P. Keller, S.M. Martinez, M. Patterson, T.F. (2002). Molecular Mechanisms of Fluconazole Resistance in *Candida dubliniensis* Isolates from Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients with Oropharyngeal Candidiasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, (6), pp.1695-1703.

Perumal, P. Mekala, S. Chaffin, W.L. (2007). Role for Cell Density in Antifungal Drug Resistance in *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, (7), pp.2454-2463.

Peyron, F. Favel, A. Nguyen, A.M. Gilly, M. Regly, P. Bolmstrom, A. (2001). Improved Detection of Amphotericin B-Resistant Isolates of *Candida lusitanae* by Etest. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, (1), pp-339-342.

Pfaller, M.A. Barry A.L. (1994). Evaluation of a Novel Colorimetric Broth Microdilution Method for Antifungal Susceptibility Testing of Yeast Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, (8), pp.1992-1996.

Pfaller, M. A. Diekema, D. J. (2004). Rare and Emerging Opportunistic Fungal Pathogens: Concern for Resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, (10), pp-4419-4431.

Pfaller, M. A. Diekema, D. J. Colombo, A.L. Kibbler, C. Ng, K.P. Gibbs, D. L. Newell, V. A. and the Global Antifungal Surveillance Group. (2006). *Candida rugosa*, an Emerging Fungal Pathogen with Resistance to Azoles: Geographic and Temporal Trends from the

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, (10), pp.3578-3582.

Pfaller, M. A. Diekema, D. J. Gibbs, D. L. Newell, V. A. Nagy, E. Dabiasova, S. Rinaldi, S. Barton, R. Veselov, A. and the Global Antifungal Surveillance Group. (2008). *Candida krusei*, a Multidrug-Resistant Opportunistic Fungal Pathogen: Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46(2), pp.515-521.

Pfaller, M. A. Diekema, D. J. Gibbs, D. L. Newell, V. A. Ng, K.P. Colombo, A. and the Global Antifungal Surveillance Group.(2008) Geographic and Temporal Trends in Isolation and Antifungal Susceptibility of *Candida parapsilosis*: a Global Assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *Journal of Clinical Microbiology*, 46,(3), pp.842-849.

Pfaller, M. A. Diekema, D. J. Mendez, M. Kibbler, C. Erzsbet, P. Chang, S.C. Gibbs, D. L. Newell, V. A. and the Global Antifungal Surveillance Group. (2006). *Candida guilliermondii*, an Opportunistic Fungal Pathogen with Decreased Susceptibility to Fluconazole: Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, (10), pp. 3551-3556.

Pinjon, E. Sullivan, D. Salkin, I. Shanley, D. Coleman, D. (1998). Simple, inexpensive, Reliable Method for Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, (7), pp. 2093-2095.

Ponton, J. Bikandi, J. Moragues, M.D. Arilla, M.C. Elosegui, R. Quindós, G. Fiscaro, P. Conti, S. Polonelli, L.(1996). Reactivity of *Candida albicans* Germ Tubes with Salivary Secretory IgA. *Journal of Dental Research*.

Rambali, B. Fernandez, J.A. Nuffel, L.V. Woestenborghs, F. Baert, L. Massart, D.L. Odds, F.C. (2001). Susceptibility testing of pathogenic fungi with itraconazole: a process analysis of test variables. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, pp.163-177.

Ribeiro, E.L. Guimarães, R.I. Inácio, M.C.C. Ferreira, W.M. Cardoso, C.G. Dias, S.M.S. Naves, P.L.F. (2004) Aspectos das Leveduras de *Candida* Vinculadas as Infecções Nasocomiais. *NewsLab ed.64*

Sabra, W. Tawfik, A.F. Shibl, A.M. (2009). Evaluation of a new method for antifungal susceptibility testing for azoles. *World J Microbiol Biotechnol*.

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

Sanguinetti, M. Posteraro, B. Fiori, B. Ranno, S. Torelli, R. Fadda, G. (2005) Mechanisms of Azole Resistance in Clinical Isolates of *Candida glabrata* Collected during a Hospital Survey of Antifungal Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, (2), pp.668-679.

Sheehan, D.J. Hitchcock, C.A. Sibley, C.M. (1999). Current and Emerging Azole Antifungal Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, (1), pp.40-79.

Silva, A.P. Miranda, I.M. Lisboa, C. Pina-Vaz, C. Rodrigues, A.G. (2009). Prevalence, Distribution, and Antifungal Susceptibility Profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a Tertiary Care Hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 47, (8), pp.2392-2397.

Sulis, M.L. Van de Ven, C. Henderson, T. Anderson, L. Cairo, M. C. (2002). Liposomal amphotericin B (AmBisome) compared with amphotericin B \pm FMLP induces significantly less in vitro neutrophil aggregation granulocyte-colony-stimulating factor/dexamethasone-mobilized allogeneic with donor neutrophils. *The American Society of Hematology*, 99, pp.384-386.

Sullivan, D. Haynes, K. Bille, J. Boerlin, P. Rodero, L. Lloyd, S. Henman, M. Coleman, D. (1997). Widespread Geographic Distribution of Oral *Candida dubliniensis* Strains in Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, (10), pp.960-964.

Vandeputte, P. Larcher, G. Thierry, B. Renier, G. Chabasse, D. Bouchara, J. P. (2005). Mechanisms of Azole Resistance in a Clinical Isolate of *Candida tropicalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, (11), pp.4608-4615.

Sanchez, V. Vasquez, J.A. Barth-Jones, D. Dembry, L. Sobel, J.D. Zervos, J. (1992). Epidemiology of Nosocomial Acquisition of *Candida lusitanae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, (11), pp.3005-3008.

Wanger, A. Mills, K. Nelson, W. P. Rex, H. J. (1995). Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards Broth Macrodilution Method for Antifungal Susceptibility Testing: Enhanced Ability To Detect Amphotericin B-Resistant *Candida* Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(11), pp. 2520-2522.

Young, Y. L. Hull, M. C. Heitman, J. (2003). Disruption of Ergosterol Biosynthesis Confers Resistance to Amphotericin B in *Candida lusitanae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(9), pp.2717-2724.

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição

Zepelin, B. M. Kunz, L. Rüchel, R. Reichard, U. Weig, M. Groß, U.(2007). Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida spp.* to six antifungal agents: results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August 2005. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60, pp. 424–428.

Determinação da susceptibilidade de *Candida spp.* à Anfotericina B pelo método de microdiluição