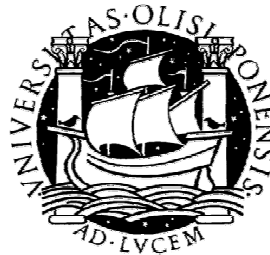


UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE E RESULTADOS  
DA ASSOCIAÇÃO DE ANTIFÚNGICOS:  
UM NOVO MÉTODO**

**Rita Daniela Teixeira dos Santos**

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

2010

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE E RESULTADOS  
DA ASSOCIAÇÃO DE ANTIFÚNGICOS:  
UM NOVO MÉTODO**

**Rita Daniela Teixeira dos Santos**

Dissertação orientada pela Prof. Doutora Cidália Pina Vaz  
(Faculdade de Medicina da Universidade do Porto)  
e pela Prof. Doutora Ana Tenreiro  
(Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa)

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

2010

Apoio financeiro da Pfizer no âmbito do projecto: "*In vitro* effect of antifungal combinations against *Candida* species", Pfizer Tracking Number W5718413.

# Agradecimentos

*À Professora Doutora Cidália Pina-Vaz, pela oportunidade oferecida, pela dedicação a este trabalho, por ouvir com interesse as minhas questões, dúvidas e problemas, pelo entusiasmo contagiante e pela confiança e carinho, Obrigada*

*Ao Professor Doutor Acácio Rodrigues, pela forma como me recebeu no Serviço de Microbiologia, pelos ensinamentos e tempo despendido na revisão desta dissertação, Obrigada*

*À Professora Doutora Ana Tenreiro, por ter aceitado ser minha orientadora interna, pela disponibilidade e prontidão, Obrigada*

*À grande “Família Microbiológica”, pelo carinho com que me receberam desde o primeiro dia, pela amizade, por tudo o que me ensinaram e pelos bons momentos partilhados que tornaram a execução deste trabalho tão especial, é um prazer trabalhar convosco, Obrigada*

*À Rute por ter despertado o meu interesse pela Microbiologia, Obrigada*

*Às minhas Mosqueteiras, pela amizade sincera que conquistámos, pelo apoio em todas as situações e missões, pela motivação e compreensão, chegou o momento de vos agradecer, Muito Obrigada*

*À Olga e ao João pela amizade e carinho, Obrigada*

*Ao Francisco por estar sempre presente, pela força e amizade, Obrigada*

*Ao João Sousa pela amizade de sempre, Obrigada*

*À “Família de Acolhimento”, D. Tina, Sr. Carlos e Diogo, pela forma como me receberam e cuidaram de mim e por fazerem da vossa casa a minha casa, Muito Obrigada*

*À minha avó e a ti Avô, que sei que acompanhas todos os meus passos, Obrigada*

*À minha Irmã e ao pequeno Tomás, pelo amor e inspiração, Obrigada*

*Aos meus Pais, a quem devo tudo aquilo que sou, pelo amor, apoio incondicional e confiança, dedico-vos esta dissertação. Muito Obrigada*

*E a todos os outros que durante este percurso me ajudaram com um voto de confiança, um sorriso ou uma palavra amiga, Obrigada.*

# Resumo

As infecções fúngicas invasivas provocadas por *Candida* spp. constituem uma importante causa de morbidade e mortalidade em doentes críticos. Apesar de actualmente estarem disponíveis novos fármacos, como as equinocandinas e os azoles de espectro alargado, que aumentaram as opções terapêuticas, a resistência em ambos os grupos tem sido reportada.

A associação de antifúngicos com diferentes mecanismos de acção tem sido utilizada como terapêutica de salvamento, mesmo sem a existência de suporte científico. Os estudos para avaliação destas associações são escassos, as metodologias propostas são trabalhosas e morosas e os resultados são por vezes contraditórios.

Neste trabalho, é proposto um protocolo citométrico para avaliar o efeito das associações equinocandinas/anfotericina B e equinocandinas/azoles, sobre espécies de *Candida*.

A susceptibilidade aos antifúngicos, isolados e em associação, foi determinada com recurso a dois marcadores fluorescentes: DiBAC<sub>4</sub>(3) (anidulafungina/anfotericina B) e FUN-1 (anidulafungina/fluconazole). A soma das razões entre a intensidade de fluorescência das células tratadas com os antifúngicos em associação e a intensidade de fluorescência das células tratadas com o antifúngico isolado, resultou num Índice de fluorescência ( $I_F$ ). Pela correlação com o método clássico foi possível classificar a associação como: antagonista quando  $I_F < 1$ , indiferente quando  $1 \leq I_F \leq 2$ , aditiva quando  $2 < I_F < 4$  e sinérgica quando  $I_F \geq 4$ .

Esta metodologia mostrou uma correlação estatisticamente significativa com os métodos clássicos: *checkerboard* e determinação de unidades formadoras de colónias. Adicionalmente, revelou ser uma técnica simples e rápida, de elevada sensibilidade e especificidade para detecção de efeitos sinérgicos e antagonistas, mostrando-se uma excelente alternativa no estudo de associações entre antifúngicos. Os casos de antagonismo foram raros, mas o facto de poderem ocorrer independentemente da espécie levam à recomendação da sua avaliação *in vitro*, previamente à sua prescrição clínica.

Assim, encontra-se disponível um novo método para avaliação das associações entre antifúngicos, representando um avanço significativo relativamente às metodologias existentes.

**Palavras chave:** Infecções fúngicas invasivas; *Candida* spp.; Associações de antifúngicos; Citometria de Fluxo.

# Abstract

Invasive fungal infections caused by *Candida* spp. represent an important cause of morbidity and mortality in critically ill patients. Although at present novel drugs, such as echinocandins and extended-spectrum azoles, have widened the range of available therapeutic options, resistance to both these groups has been reported.

The combination of drugs with different mechanisms of action emerged as a salvage therapy, even though the lack of scientific support. Studies validating such combinations are scarce, and the methods of assessment are laborious, time-consuming, and often provide contradictory results.

In the present study a flow cytometric protocol is proposed to evaluate the effect of the combination of echinocandins/amphotericin B and echinocandins/azoles, upon *Candida* species.

The susceptibility to either isolated or combined antifungals was determined by flow cytometry using two fluorescent markers: DiBAC<sub>4</sub>(3) (anidulafungin/amphotericin B) and FUN-1 (anidulafungin/fluconazole). An Index of fluorescence ( $I_F$ ) was calculated, as the sum of ratios between the fluorescence of treated cells with the association of antifungals and the fluorescence of cells treated with each individual antifungal. Comparing to classic method it was possible to categorize the association as antagonistic when  $I_F < 1$ , indifferent when  $1 \leq I_F \leq 2$ , additive when  $2 < I_F < 4$  and synergic when  $I_F \geq 4$ .

This methodology showed an excellent correlation with the classic methods namely, *checkerboard* assay and the determination of colony forming units. Furthermore, it is a simple and relatively fast assay, providing high sensitivity and specificity for the detection of synergic and antagonistic effects, representing an excellent alternative to assess the effect of antifungal associations. Although antagonism was rarely observed, it may occur independently of species. Therefore it is recommended that antifungal combinations should be evaluated before its clinical use.

In conclusion, a new approach is now available for evaluating antifungal combinations, which represents a considerable advance to the classic methodologies.

**Keywords:** Invasive fungal infections; *Candida* spp.; antifungal associations; Flow cytometry.

# Índice

Lista de Tabelas	ii
Lista de Figuras	iii
Abreviaturas	iv
<b>1. Introdução</b>	
1.1. Considerações gerais	1
1.2. Candidose invasiva	1
1.3. Agentes antifúngicos no tratamento da infecção fúngica invasiva	2
1.3.1. Mecanismos de acção dos principais agentes antifúngicos	3
1.3.2. Principais mecanismos de resistência	4
1.4. Terapêutica antifúngica combinada	6
1.5. Determinação da susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antifúngicos	7
1.5.1. Avaliação da interacção entre antifúngicos <i>in vitro</i>	8
1.6. Citometria de Fluxo	9
<b>2. Materiais e Métodos</b>	
2.1. Estirpes fúngicas	11
2.2. Fármacos e químicos	11
2.3. Avaliação da susceptibilidade aos antifúngicos pelos métodos clássicos	11
2.3.1. Método de microdiluição para avaliação de antifúngicos	11
2.3.2. Método de <i>checkerboard</i> para avaliação de associações entre antifúngicos	12
2.4. Avaliação da susceptibilidade aos antifúngicos por citometria de fluxo	13
2.4.1. Incubação com os antifúngicos	13
2.4.2. Incubação com os antifúngicos associados	13
2.4.3. Marcação das células com os marcadores fluorescentes	14
2.4.4. Análise citométrica	14
2.5. Determinação das Unidades Formadoras de Colónias nas condições da análise citométrica	15
2.6. Comparação entre metodologias	15
<b>3. Resultados</b>	
3.1. Avaliação da susceptibilidade aos antifúngicos pelos métodos clássicos	17
3.1.1. Método de microdiluição para avaliação da susceptibilidade a	17



antifúngicos	
3.1.2. Método de <i>checkerboard</i> para avaliação de associações entre antifúngicos	18
3.2. Avaliação da susceptibilidade aos antifúngicos por citometria de fluxo	18
3.2.1. Susceptibilidade a antifúngicos	18
3.2.2. Associações de antifúngicos	25
3.3. Comparação entre metodologias	27
	32
<b>4. Discussão</b>	
<b>5. Perspectivas futuras</b>	35
<b>6. Bibliografia</b>	36

# Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b>	— Padrão de susceptibilidade de 90 estirpes do género <i>Candida</i> à anfotericina B (Anf B), fluconazole (Flu), micafungina (Mica), anidulafungina (Ani) e caspofungina (Cas).	17
<b>Tabela 2a</b>	— Actividade antifúngica e efeito da associação anidulafungina (Ani) e anfotericina B (Anf B) nas estirpes clínicas de <i>Candida</i> spp. (n=39).	19
<b>Tabela 2b</b>	— Actividade antifúngica e efeito da associação anidulafungina (Ani) e fluconazole (Flu) nas estirpes clínicas de <i>Candida</i> spp. (n=36).	19
<b>Tabela 3</b>	— Actividade antifúngica e efeito da associação anidulafungina (Ani) e anfotericina B (Anf B) nas estirpes clínicas de <i>Candida</i> spp. (n=39), por citometria de fluxo (CF) e classificação da associação pela determinação de unidades formadoras de colónias (UFC/ml).	28
<b>Tabela 4</b>	— Actividade antifúngica e efeito da associação anidulafungina (Ani) e fluconazole (Flu) nas estirpes clínicas de <i>Candida</i> spp. (n=36), por citometria de fluxo (CF) e classificação da associação pela determinação de unidades formadoras de colónias (UFC/ml).	29
<b>Tabela 5</b>	— Comparação entre a classificação obtida pela citometria de fluxo e pelos métodos clássicos: <i>checkerboard</i> e determinação de unidades formadoras de colónias (UFCs), para as associações Anidulafungina (Ani)/Fluconazole (Flu) e para ambas as associações.	30
<b>Tabela 6</b>	— Valores de proporção de concordância (PC) e <i>kappa</i> (K) (com respectivos intervalos de confiança (IC) a 95%) relativos à avaliação de concordância entre a citometria de fluxo e os métodos clássicos, <i>checkerboard</i> e determinação de unidades formadoras de colónias (UFCs).	30
<b>Tabela 7</b>	— Valores das medidas de validade (com respectivos intervalos de confiança (IC) a 95%) para detecção das diferentes classificações obtidas por citometria de fluxo utilizando o <i>checkerboard</i> como método de referência.	31

# Lista de Figuras

- Figura 1** — Análise citométrica da estirpe *C. albicans* O207 susceptível (S) à Anidulafungina (Ani) (A-C) e da estirpe *C. parapsilosis* O136 não susceptível (NS) à Ani (D-F), após tratamento com 1 µg/ml de Ani durante 1 hora e marcação com DiBAC<sub>4</sub>(3). 20
- Figura 2** — Histograma representativo da estirpe *C. albicans* O207 sensível à Anidulafungina (Ani), após tratamento com 1 µg/ml de Ani durante 1 hora (d – laranja) e 2 horas (e – azul) e marcação com DiBAC<sub>4</sub>(3), analisada em FL1 (525nm). 21
- Figura 3** — Histograma representativo da estirpe *C. albicans* O207 sensível à Anidulafungina (Ani), após tratamento com 1 (d – laranja), 2 (e – azul) e 4 (f – roxo) µg/ml de Ani durante 1 hora e marcação com DiBAC<sub>4</sub>(3), analisada em FL1 (525nm). 21
- Figura 4** — Ensaio de viabilidade das estirpes *C. albicans* O207 sensível à Anidulafungina (Ani) e *C. parapsilosis* O136 não susceptível à Ani, expostas a diferentes concentrações de Ani (0, 1, 2 e 4 µg/ml) durante 1 e 2 horas. 21
- Figura 5** — Análise citométrica da estirpe *C. albicans* O207 susceptível (S) à Anfotericina B (Anf B) (A-C) e da estirpe *C. lusitanae* D51 resistente (R) à Anf B (D-F), após tratamento com 1 µg/ml de Anf B durante 1 hora e marcação com DiBAC<sub>4</sub>(3). 22
- Figura 6** — Histograma representativo da estirpe *C. albicans* O207 sensível à Anfotericina B (Anf B) após tratamento com 1 µg/ml de Anf B durante 1 hora (d – laranja) e 2 horas (e – azul) e marcação com DiBAC<sub>4</sub>(3), analisada em FL1 (525nm). 23
- Figura 7** — Histograma representativo da estirpe *C. albicans* O207 sensível à Anfotericina B (Anf B) após tratamento com 0,5 (d – laranja), 1 (e – azul) e 2 (f – roxo) µg/ml de Anf B durante 1 hora e marcação com DiBAC<sub>4</sub>(3), analisada em FL1 (525nm). 23
- Figura 8** — Ensaio de viabilidade das estirpes *C. albicans* O207 sensível à Anfotericina B (Anf B) e *C. lusitanae* D51 resistente à Anf B, expostas a diferentes concentrações de Anf B (0, 0,5, 1 e 2 µg/ml) durante 1 e 2 horas. 23

<b>Figura 9</b>	— Análise citométrica da estirpe <i>C. parapsilosis</i> O204 susceptível ao Fluconazole (Flu) (A-C) e da estirpe <i>C. albicans</i> O223 resistente ao Flu (D-F), após tratamento com 16 µg/ml de Flu durante 1 hora e marcação com DiBAC <sub>4</sub> (3).	24
<b>Figura 10</b>	— Ensaio de viabilidade das estirpes <i>C. parapsilosis</i> O204 sensível ao Fluconazole (Flu) e <i>C. albicans</i> O223 resistente ao Flu, expostas a diferentes concentrações de Flu (0, 8, 16 e 32 µg/ml) durante 1 e 2 horas.	25
<b>Figura 11</b>	— Histograma representativo da estirpe <i>C. albicans</i> O215, na qual a associação Anidulafungina/Anfotericina B apresentou um efeito sinérgico.	25
<b>Figura 12</b>	— Histograma representativo da estirpe <i>C. glabrata</i> O158, na qual a associação Anidulafungina/Fluconazole apresentou um efeito sinérgico.	26

# Abreviaturas

% - Percentagem

μl – Microlitros

μg – Microgramas

5-FC – 5-fluorocitosina

A – Antagonista

AD – Aditivo

Anf B – Anfotericina B

Ani – Anidulafungina

ATCC – *American Type Culture Collection*

Azo – Azoles

Cas – Caspofungina

CF – Citometria de Fluxo

CLSI – *Clinical Laboratory Standard Institute*

CIM – Concentração inibitória mínima

DiBAC<sub>4</sub>(3) – Bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol

DNA – *Deoxyribonucleic acid*

Ech – Equinocandinas

Esp – Especificidade

EUCAST – *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FIC – *Fractionary inhibitory concentration*

FICI – *Fractionary inhibitory concentration Index*

Flu – Fluconazole

FUN-1 – 2-chloro-4-(2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene)-1-phenylquinolinium iodide

h – Horas

I – Indiferente

IC – Intervalo de confiança

I<sub>F</sub> – Índice de fluorescência

IF – Intensidade de fluorescência

IFI – Infecção fúngica invasiva

IMF – Intensidade média de fluorescência

IMF<sub>C</sub> – Intensidade média de fluorescência final

*k - kappa*

LR- - *Likelihood ratio* negativo

LR+ - *Likelihood ratio* positivo

Mica – Micafungina

min – Minutos

ml – Mililitros

nm - Nanómetros

NS – Não susceptível

PBS – *Phosphate buffered saline*

PC – Proporção de concordância

Pos – Posaconazole

R – Resistente

RNA – *Ribonucleic acid*

rpm – Rotações por minuto

RPMI – Meio de cultura *Rosewell Park Memorial Institute*

SI – Sinérgico

S – Susceptível

S-DD – Susceptível dose-dependente

Sen – Sensibilidade

UFC – Unidade formadora de colónias

VIH – Vírus de Imunodeficiência Humana

Vor – Voriconazole

VPN – Valor preditivo negativo

VPP – Valor preditivo positivo

$\lambda$  – Comprimento de onda

# 1. Introdução

## 1.1. Considerações gerais

Nas últimas duas décadas as Infecções Fúngicas Invasivas (IFIs) emergiram consideravelmente constituindo um importante problema de saúde pública. A taxa de mortalidade associada a este tipo de infecções é elevada, podendo mesmo atingir os 90% (Richardson, 2005; Shao *et al.*, 2007). O aumento da incidência das IFIs deve-se, em grande parte, ao aumento significativo da população de doentes considerada de risco, a qual inclui doentes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (VIH), doentes neoplásicos ou transplantados, sujeitos a quimioterapia e/ou terapia imunossupressora (Clark and Hajjeh, 2002; Richardson, 2005). O recurso a uma medicina mais intervencionista e, em particular, o desenvolvimento de técnicas de suporte de vida, têm também contribuído para uma maior incidência das IFIs (Clark and Hajjeh, 2002; Shao *et al.*, 2007).

Acresce a estes factores, o aumento do uso generalizado de antifúngicos, para fins profiláticos ou para fins terapêuticos, o que inevitavelmente conduz à emergência de estirpes resistentes, muitas vezes ocultadas pela não execução de provas de susceptibilidade na rotina clínica (Pfaller and Diekema, 2007; Richardson, 2005; Sanglard and Odds, 2002).

Todos estes factores promoveram mudanças significativas na epidemiologia destas infecções, dificultando o seu diagnóstico e tratamento (Erjavec *et al.*, 2009).

Apesar de actualmente dispormos de um maior número de opções terapêuticas, a emergência de estirpes resistentes leva, por vezes os clínicos a prescreverem associações de antifúngicos, sem evidência de suporte científico (Baddley and Pappas, 2005).

Assim, torna-se necessário avaliar de modo eficaz e em tempo útil os padrões de susceptibilidade aos diferentes agentes antifúngicos e a sua actividade combinada *in vitro*.

## 1.2. Candidose Invasiva

A doença fúngica invasiva encontra-se vulgarmente associada a infecções por fungos pertencentes aos géneros *Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus* (Lass-Flörl, 2009; Pfaller and Diekema, 2007; Shao *et al.*, 2007; Tortorano *et al.*, 2006).

As leveduras pertencentes ao género *Candida* são fungos unicelulares, ubíquos, geralmente considerados patógenos oportunistas (Odds, 1987). Estes microrganismos são membros da população microbiana autóctone da pele e mucosas humanas (tracto respiratório

superior, tracto gastrointestinal, cavidade oral ou vaginal), podendo passar de colonizadores a patogénios nestes mesmos locais, ou invadir outros locais como o sangue ou o líquido cefalorraquidiano (locais normalmente estéreis). Apesar de muitos casos de candidose terem origem endógena, estas infecções podem também provir de fontes exógenas (Lass-Florl, 2009).

De entre as espécies de *Candida*, *C. albicans* é a espécie mais comum e responsável por cerca de metade dos casos de infecção, seguindo-se *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (Pfaller and Diekema, 2007; Shao *et al.*, 2007). A incidência de infecções por *Candida*, sobretudo espécies não *albicans*, tem aumentado significativamente nos últimos anos (Erjavec *et al.*, 2009; Tortorano *et al.*, 2006).

Estudos recentes demonstraram que as leveduras pertencentes ao género *Candida* representam a quarta causa de infecções invasivas nos EUA e a oitava na Europa, variando a taxa de mortalidade inerente entre 30 e 50% (Pfaller and Diekema, 2007; Shao *et al.*, 2007). Nos hospitais dos EUA a candidemia apresenta-se com uma incidência que varia entre 7 a 24 casos por 100 000 habitantes (Diekema *et al.*, 2002; Hajjeh *et al.*, 2004). Em Portugal, dados obtidos de um estudo sobre fungemia realizado no Hospital de S. João, Porto, mostraram uma incidência deste tipo de infecção de 3,17 casos por 1000 doentes/dia, tendo as leveduras sido o quarto agente mais frequentemente isolado em hemoculturas: *C. albicans* (35%), *C. parapsilosis* (25,6%) e *C. tropicalis* (12,8%) (Costa-de-Oliveira *et al.*, 2008).

### **1.3. Agentes antifúngicos no tratamento da infecção fúngica invasiva**

A incidência crescente das infecções fúngicas invasivas nas últimas duas décadas, conduziu a alterações importantes nas estratégias de terapêutica antifúngica (Odds *et al.*, 2003). Durante muitos anos, a anfotericina B (Anf B) e a 5-fluorocitosina (5-FC) foram os únicos agentes antifúngicos disponíveis para o tratamento de IFIs. Na década de 90, o desenvolvimento dos triazoles e a apresentação lipossómica da anfotericina B representaram um enorme progresso no tratamento destas infecções. Mais recentemente, foi introduzida uma nova classe de agentes antifúngicos - as equinocandinas (ech) (Bal, 2010).

A terapêutica antifúngica, apesar de mais diversificada, hoje em dia apresenta ainda algumas limitações no que respeita à toxicidade sobre as células humanas e à resistência, tanto intrínseca como adquirida, por parte dos fungos (Nishi *et al.*, 2009).



### 1.3.1. Mecanismos de acção dos principais agentes antifúngicos

Os antifúngicos podem ser agrupados em quatro classes de acordo com o seu modo de acção: a) os polienos, que actuam e promovem alterações ao nível da membrana fúngica, e de que fazem parte a Anf B e as suas formulações lípidicas; b) os derivados dos azoles (azo), imidazoles e triazoles, os quais inibem a síntese do ergosterol (principal componente da membrana celular fúngica), sendo exemplos o fluconazole (Flu), voriconazole (Vor) e mais recentemente o posaconazole (Pos); c) os análogos das pirimidinas que actuam por inibição da síntese de DNA e RNA, onde se encontra inserida a 5-fluorocitosina (5-FC); e d) as equinocandinas (Ech), de que fazem parte a caspofungina (Cas), anidulafungina (Ani) e micafungina (Mica), as quais inibem a síntese do 1,3- $\beta$ -D-glucano, principal componente da parede celular fúngica (Bal, 2010; Ghannoum and Rice, 1999).

De acordo com o âmbito deste trabalho apenas serão descritos os mecanismos de acção referentes aos seguintes antifúngicos: polienos, triazoles e equinocandinas.

Os polienos têm como principal mecanismo de acção a ligação ao ergosterol existente na membrana celular. Desta interacção resulta a formação de canais ou poros, que aumentam a permeabilidade da membrana e causam instabilidade osmótica, com consequente libertação do conteúdo celular (Odds *et al.*, 2003). O seu espectro de acção *in vitro* abrange leveduras, fungos dimórficos e a maioria dos fungos filamentosos oportunistas, sobre os quais exerce um efeito fungistático ou fungicida (Odds *et al.*, 2003; Wingard and Leather, 2004).

A Anf B, principal representante deste grupo, é considerada o fármaco padrão para tratamento da maioria das infecções fúngicas sistémicas. Uma das principais limitações ao uso deste fármaco reside na sua toxicidade renal, proporcional à concentração utilizada e duração do tratamento, a qual atinge mais de 80% dos doentes tratados (Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2003; Pfaller and Diekema, 2007; Wingard and Leather, 2004).

Recentemente, alguns estudos mostraram haver relação entre a pré-exposição aos azoles e a resistência *in vitro* à Anf B. Embora a resistência a este fármaco seja ainda rara e pouco relatada, esta questão tem sido abordada com alguma preocupação, dado que a profilaxia antifúngica é feita com Flu e o tratamento, em caso de infecção documentada, com Anf B (Mukherjee *et al.*, 2005).

Relativamente aos azoles, o seu mecanismo de acção envolve o bloqueio da síntese do ergosterol, através da inibição da enzima lanosterol 14 $\alpha$ -dismetilase (enzima ligada ao citocromo P-450), com consequente alteração da permeabilidade da membrana e inibição do crescimento das células fúngicas (Odds *et al.*, 2003; Sheehan *et al.*, 1999).

São fármacos que de modo geral apresentam um amplo espectro de acção, constituindo uma boa alternativa à Anf B e a outros antifúngicos cuja toxicidade é elevada, embora também manifestem efeitos adversos como a inibição da síntese de outras moléculas esteróis (cortisol, testosterona ou colesterol) (Walsh *et al.*, 2002). O Flu possui um amplo espectro de acção sobre leveduras, apresentando-se pouco eficaz sobre fungos filamentosos. É considerado o fármaco de eleição em terapêutica profiláctica. Os seus efeitos adversos são raros e de reduzida gravidade, o que aliado a uma boa absorção oral e penetração no sistema nervoso central, o tornam no antifúngico mais utilizado.

Devido ao seu uso frequente em profilaxia, este grupo de antifúngicos tem conduzido a uma maior incidência de espécies de *Candida* não *albicans* e ao aumento da resistência em espécies patogénicas. É ainda descrita resistência intrínseca ao Flu em algumas espécies de *Candida*, tais como *C. krusei* (Shao *et al.*, 2007).

Mais recentemente surgiram novos triazoles – o voriconazole e o posaconazole, cujo espectro de acção é bastante alargado. Estes fármacos mostraram-se eficazes sobre muitas espécies de *Candida*, incluindo *C. krusei*, *C. glabrata* e algumas estirpes resistente ao Flu (Shao *et al.*, 2007). O Pos apresenta maior actividade do que o Vor entre espécies de *Aspergillus* e mantém acção sobre espécies de *Candida*, cuja enzima lanosterol 14 $\alpha$ -dismetilase se encontrada mutada, conferindo resistência cruzada ao Flu e ao Vor (Munayyer *et al.*, 2004).

As equinocandinas, constituem o grupo mais recente de agentes antifúngicos. O seu mecanismo de acção passa pela inibição da enzima 1,3- $\beta$ -D-glucano sintase, a qual participa na síntese de um componente essencial da parede celular de vários fungos. Devido ao seu alvo molecular, esta classe de antifúngicos apresenta potenciais vantagens relativamente às classes já existentes. As Ech manifestam actividade fungicida contra muitas espécies de *Candida*, incluindo estirpes resistentes aos azoles, e demonstram também alguma actividade sobre *Aspergillus* e fungos dimórficos (Bal, 2010; Odds *et al.*, 2003).

Apesar de se tratar de uma classe de antifúngicos relativamente recente, já existem estudos que descrevem uma menor susceptibilidade a estes fármacos, por parte de espécies como *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* (Bal, 2010; Walker *et al.*, 2010).

### 1.3.2. Principais mecanismos de resistência

O termo “resistência clínica” é utilizado para descrever casos clínicos cuja infecção persiste ou progride apesar de instituída terapêutica adequada (Sanglard and Odds, 2002).

De um modo geral, alguns estudos têm reportado uma boa correlação entre a resistência clínica e a obtenção de valores elevados de concentração inibitória mínima (CIM)

(Cameron *et al.*, 1993). Contudo, valores baixos de CIM não garantem o sucesso da resposta clínica, sendo esta dissociação mais evidente em doentes imunocomprometidos (Sanglard and Odds, 2002).

São vários os mecanismos moleculares envolvidos na resistência aos antifúngicos. Estes podem incluir alterações do alvo molecular do fármaco, diminuição da concentração intracelular do fármaco (efluxo), sobreexpressão da molécula alvo e alterações na biossíntese de esteróis (Ghannoum and Rice, 1999).

Relativamente aos polienos, a resistência *in vitro* não tem constituído um importante problema clínico. Embora seja conhecido que espécies como *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. lusitanae* possuam uma maior propensão para apresentarem resistência à Anf B, a frequência com que esta se manifesta parece ser reduzida (Sanglard and Odds, 2002). A resistência a este fármaco em *Candida* spp. pode surgir como resultado da exposição prévia aos azoles, os quais provocam alterações dos componentes da membrana celular (Kelly *et al.*, 1996; Kelly *et al.*, 1997). Tal evidência é apoiada pelo facto da maioria das estirpes resistentes aos polienos apresentarem um teor reduzido de ergosterol na membrana, alvo deste fármaco (Vanden Bossche *et al.*, 1994).

Quanto aos azoles são quatro os mecanismos de resistência descritos em *Candida* spp.

1) *Alteração do alvo de acção.* Tem sido demonstrado que mutações no gene ERG11, gene que codifica para a enzima lanosterol 14 $\alpha$ -dismetilase, impedem a ligação dos azoles ao seu alvo de acção. Também a resistência intrínseca ao Flu em isolados de *C. krusei* tem sido atribuída à diminuição da afinidade entre o fármaco e o seu alvo de acção (Kanafani and Perfect, 2008; Sanglard *et al.*, 1995);

2) *Diminuição da concentração intracelular do fármaco.* A expressão de bombas de efluxo resulta no decréscimo da concentração do fármaco no seu local de acção. (Sanglard *et al.*, 2003); (Kanafani and Perfect, 2008);

3) *Aumento da expressão da enzima alvo.* Algumas estirpes de *Candida* com reduzida susceptibilidade aos azoles, manifestam um aumento da concentração intracelular da enzima lanosterol 14 $\alpha$ -dismetilase, relativamente às estirpes susceptíveis. Desta forma, o antifúngico não consegue inibir eficazmente a síntese do ergosterol. Contudo, existem poucas evidências da contribuição deste mecanismo para a resistência global aos azoles em *Candida* spp. (Kanafani and Perfect, 2008; Sanglard *et al.*, 1995).

4) *Modificação de outras enzimas envolvidas na biossíntese de esteróis.* A exposição aos azoles resulta na depleção do ergosterol da membrana fúngica e acumulação de produtos tóxicos, levando à inibição do crescimento celular. Mutações no gene ERG3 impedem a formação destes produtos, o que mantém as membranas funcionalmente activas e

anula a acção dos azoles na via de biossíntese do ergosterol (Kanafani and Perfect, 2008; Sanglard *et al.*, 2003; Sanglard and Odds, 2002).

Os diferentes mecanismos de resistência descritos podem actuar isoladamente ou em simultâneo nas células fúngicas, desempenhando no último caso um efeito aditivo.

Os mecanismos de resistência às equinocandinas encontram-se ainda em estudo, visto tratar-se de uma problemática relativamente recente. Contudo, alguns estudos reportam já casos de menor susceptibilidade (valores elevados de CIM), sobretudo em isolados de *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* (Walker *et al.*, 2010). A resistência encontra-se associada a mutações pontuais no gene FKS1, o qual codifica para uma subunidade da enzima 1,3 $\beta$ -D-glucano sintase. Existem ainda evidências de que em *C. glabrata* e *C. guilliermondii* a resistência também pode dever-se a mutações no gene FKS2 (Perlin, 2007; Walker *et al.*, 2010).

A quantificação da expressão destes genes em leveduras constitui um instrumento essencial para investigar os mecanismos moleculares envolvidos na resistência e monitorizar a sua indução (Frade *et al.*, 2004).

#### **1.4. Terapêutica antifúngica combinada**

A terapêutica antifúngica combinada de modo empírico é frequentemente utilizada no tratamento de IFIs em doentes críticos, na tentativa de melhorar o sucesso da resposta terapêutica (Chamilos and Kontoyiannis, 2006). Limitações como a elevada toxicidade e a baixa tolerância conduziram ao estudo da eficácia da terapêutica combinada no tratamento e controlo das infecções fúngicas invasivas. (Mukherjee *et al.*, 2005). O raciocínio envolvido baseia-se essencialmente nos mecanismos de acção e respectivos alvos terapêuticos dos fármacos em estudo. Assim, as combinações mais lógicas seriam aquelas que envolvem fármacos com diferentes mecanismos de acção (Nishi *et al.*, 2009).

A única combinação de antifúngicos que mostrou efeito sinérgico foi entre Anf B e 5-FC, relativamente a *Cryptococcus*, sendo frequentemente utilizada no tratamento da meningite criptocócica (Mukherjee *et al.*, 2005). Actualmente, existem vários estudos que avaliam o efeito da combinação de Anf B com Flu e Anf B com Ech sobre *Candida* spp. (Chamilos and Kontoyiannis, 2006; Jones *et al.*, 2010; Kiraz *et al.*, 2009; Nishi *et al.*, 2009; Rodriguez *et al.*, 2007; Serena *et al.*, 2008). No entanto, estas combinações necessitam de ser devidamente testadas e validadas, uma vez que alguns dos resultados apresentados são contraditórios.

A combinação de antifúngicos com diferentes mecanismos de acção poderá representar uma opção terapêutica válida e eficaz. Teoricamente, a interacção entre dois fármacos pode potenciar a actividade antifúngica de ambos, reduzindo a concentração dos mesmos, a duração do tratamento e consequentemente a emergência de resistências (Mukherjee *et al.*, 2005).

### 1.5. Determinação da susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos

O desenvolvimento e padronização de testes de susceptibilidade aos antifúngicos *in vitro* apresenta-se como um requisito importante na previsão e sucesso da resposta terapêutica. Apesar da sua importância, estes testes nem sempre são efectuados na rotina laboratorial, sendo a terapêutica antifúngica estabelecida de modo empírico na maioria dos casos. Os resultados dos testes de susceptibilidade são afectados por uma variedade de factores, tais como a concentração do inóculo, a composição e pH do meio de cultura, a temperatura e duração de incubação e as propriedades físico-químicas do agente antifúngico (Lass-Florl *et al.*, 2010; Ramani *et al.*, 1997). Tal complexidade levou ao desenvolvimento de um método de referência, padronizado pelo *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) nos EUA – protocolo M27-A3, para leveduras (CLSI, 2008). Este método baseia-se na macrodiluição e permite determinar as CIMs das principais espécies de leveduras oportunistas (*Candida* spp. e *Cryptococcus* spp.), demonstrando uma boa reprodutibilidade (Rex *et al.*, 2001).

Todavia, uma das suas principais dificuldades reside na definição do tempo de leitura do resultado (24 ou 48 horas), o que pode implicar alterações significativas nos CIMs. Simultaneamente, trata-se de um método trabalhoso e moroso e por isso impraticável na rotina (Rex *et al.*, 2001).

Apesar das suas limitações, este protocolo constitui uma excelente ferramenta para o desenvolvimento de novos métodos mais adequados à realidade clínica.

Posteriormente, o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), desenvolveu também um protocolo padrão para leveduras – Edef 7.1 (2008). Embora, os protocolos CLSI e EUCAST sejam equivalentes, verificam-se algumas diferenças importantes, como o tempo de incubação e a concentração do inóculo, o que pode comprometer a sua reprodutibilidade entre diferentes laboratórios (Arendrup *et al.*, 2010).

Surgiram entretanto, alguns testes alternativos que avaliam a susceptibilidade aos antifúngicos *in vitro*, tais como o método de difusão em agar e os métodos comerciais: *Etest*<sup>®</sup> (AB BIODISK, Solna, Suécia), *Sensitre*<sup>®</sup> (TREK Diagnostic Systems) e *Vitek2*<sup>®</sup> (Biomérieux) (Arikan, 2007; Pfaller *et al.*, 2007).

O método de difusão em agar utilizando discos impregnados com antifúngicos, apresenta algumas limitações no que respeita à subjectividade envolvida na leitura dos halos de inibição, sobretudo com fármacos fungistáticos.

Por sua vez, o método de difusão segundo um gradiente de concentração do fármaco, *Etest*<sup>®</sup>, é um método caro e apresenta para alguns fármacos uma fraca correlação relativamente ao método de referência (CLSI).

O método espectrofotométrico, *Vitek2*<sup>®</sup> e o método colorimétrico, *Sensitre*<sup>®</sup>, apesar da sua fácil execução e reprodutibilidade, avaliam um número limitado de fármacos e encontram-se ainda em fase de avaliação.

Todos estes métodos fornecem resultados num período de 24 a 72 horas (visto serem métodos baseados no crescimento microbiano) e nada esclarecem sobre o mecanismo de acção ou de resistência aos fármacos.

Encontram-se ainda disponíveis outros métodos para determinar a actividade dos antifúngicos *in vitro*, tais como a determinação da concentração fungicida mínima, a determinação de curvas de morte (*Time-kill assay*) e a quantificação do ergosterol, utilizados quase exclusivamente em investigação científica.

#### **1.5.1. Avaliação da interacção entre antifúngicos *in vitro***

Apesar da importância crescente desta temática, o CLSI não desenvolveu ainda um método de referência padronizado para avaliar *in vitro* o efeito resultante da interacção de antifúngicos com diferentes mecanismos de acção. Em estudos já publicados, os métodos mais utilizados são o *checkerboard assay*, o *time-kill assay* e mais recentemente o *Etest*<sup>®</sup> (Lewis *et al.*, 2002).

O método de *checkerboard* é baseado no protocolo de microdiluição (M27-A3) desenvolvido pelo CLSI, no qual são determinadas as CIMs de dois fármacos isoladamente e em associação. Este método avalia a evolução da CIM individual de cada fármaco na presença de um segundo fármaco.

Apesar de ser o método mais utilizado, o *checkerboard assay* é muito trabalhoso, de difícil interpretação e não fornece dados sobre a dinâmica de interacção dos fármacos.

O método do *time-kill assay* permite perceber melhor a interacção entre dois antifúngicos ao longo do tempo. A estirpe é exposta a diferentes concentrações de fármacos ao longo de um intervalo de tempo, sendo os resultados obtidos com base na determinação de

Unidades Formadoras de Colónias (UFCs). É um método de difícil execução e muito trabalhoso (Mukherjee *et al.*, 2005).

O *Etest*<sup>®</sup> pode ser utilizado de acordo com o protocolo descrito para determinação da susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos. Neste método uma fita de *Etest* correspondente a um dos fármacos da associação é colocada sobre a estirpe previamente inoculada na placa de agar. Após uma hora de incubação, a primeira fita é substituída pelo *Etest* correspondente ao segundo fármaco em estudo. Como controlo são utilizadas as fitas individuais de ambos os fármacos. As leituras para determinação das CIMs são realizadas às 24 e 48 horas. Trata-se de um método de simples execução, porém os resultados apresentam fraca correlação com o método de *checkerboard assay* (Lewis *et al.*, 2002).

Todos estes métodos necessitam de um período mínimo de 24 horas para a leitura e interpretação dos resultados.

### 1.6. Citometria de Fluxo

A Citometria de Fluxo (CF) tem-se revelado uma técnica com importantes aplicações nas áreas da Biologia e Medicina. Na Microbiologia, esta técnica tem mostrado várias potencialidades, nomeadamente no estudo da susceptibilidade a antimicrobianos (Pina-Vaz C, 2010; Ramani *et al.*, 1997; Rudensky *et al.*, 2005).

A CF permite a contagem, análise e classificação de células suspensas num fluido. Realiza, simultaneamente, uma análise multiparamétrica de características físicas e químicas célula a célula, através de aparelhos de detecção ópticos e/ou electrónicos (Bergquist *et al.*, 2009).

Genericamente o processo baseia-se na passagem de um grande número de partículas (cerca de 50 000), uma a uma, através de uma fonte de excitação (sensor iluminado) e medição da magnitude do impulso gerado pelo desvio dessa luz, utilizando filtros e detectores apropriados. Quando uma célula é interceptada pelo feixe laser, a luz transmitida (formada por dois componentes, a luz dispersa e a luz fluorescente) é recolhida por lentes ou espelhos que a transferem para fotomultiplicadores que, por sua vez, amplificam e convertem o sinal recebido. Estes sinais são avaliados electronicamente, permitindo quantificar células com características idênticas (tamanho e complexidade), construindo-se um histograma da população analisada. Com esta técnica é ainda possível inferir sobre a heterogenicidade da população em estudo (Bergquist *et al.*, 2009).

A CF mostrou ser uma importante ferramenta na redefinição do conceito microbiológico de viabilidade, alargando as hipóteses de estudo da microbiologia clássica.

Algumas células podem estar metabolicamente activas e capazes de se replicar, enquanto outras mostram actividade metabólica com membranas intactas, mas são incapazes de replicar. A capacidade para distinguir diferentes estados fisiológicos é especialmente importante na avaliação da sobrevivência de microrganismos patogénicos (Czechowska *et al.*, 2008).

É possível pela utilização da CF com recurso a marcadores fluorescentes que permitem medir parâmetros biológicos como o conteúdo em ácidos nucleicos, a taxa de respiração, a actividade enzimática intracelular e a integridade da membrana citoplasmática ou da parede, avaliar a os diferentes estados de viabilidade (Czechowska *et al.*, 2008).

Para além de ser uma metodologia automatizada, apresenta a vantagem adicional de fornecer uma resposta em tempo útil, tão importante em microbiologia clínica.

Alguns citómetros (*cell sorters*) são ainda capazes de separar fisicamente as células com base em determinadas características definidas (Davey, 2002).

Muitos estudos têm apresentado a CF como uma técnica rápida, sensível e reprodutível na determinação da susceptibilidade aos antifúngicos em *Candida* spp. (Pina-Vaz *et al.*, 2005; Pina-Vaz *et al.*, 2001a; Pina-Vaz *et al.*, 2001b; Rudensky *et al.*, 2005). Em apenas 1 hora é possível avaliar a susceptibilidade das estirpes (*versus* as 48-72 horas do método de referência) e ainda inferir sobre alguns mecanismos de acção e resistência aos antifúngicos a que foram expostos (Chaturvedi *et al.*, 2004; Pina-Vaz C, 2010; Pina-Vaz *et al.*, 2001b).

O objectivo do presente trabalho consiste no desenvolvimento de um protocolo citométrico que permita, de forma simples e rápida, avaliar *in vitro* o efeito das associações entre anfotericina B e equinocandinas e equinocandinas e azoles, sobre *Candida* spp., e estabelecer correlação com os métodos existentes no sentido de definir os critérios citométricos necessários para caracterizar estas associações como sinérgicas, aditivas, indiferentes ou antagonistas.



## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Estirpes fúngicas

Noventa estirpes de *Candida* spp., compreendendo 41 *C. albicans*, 20 *C. glabrata*, 17 *C. parapsilosis*, 7 *C. tropicalis*, 1 *C. guilliermondii*, 3 *C. krusei* e 1 *C. lusitanae*, provenientes de hemoculturas de doentes do Hospital de São João, Porto, foram incluídas neste estudo. As estirpes foram identificadas no sistema semi-automático Vitek2® (BioMérieux, Paris, França), com as cartas de identificação “YBC”.

Após a identificação, as estirpes foram congeladas a -80 °C, em caldo de Yeast Peptone Dextrose (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) com 20% de glicerol, antes de proceder aos ensaios, foram sub-cultivadas em Sabouraud dextrose agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) e incubadas a 35 °C, durante 48 horas.

Como controlo das provas de susceptibilidade aos antifúngicos foi incluída no estudo a estirpe *C. albicans* 90028 pertencente à *American Type Culture Collection* (ATCC).

### 2.2. Fármacos e químicos

Os antifúngicos anfotericina B (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany), fluconazole (Pfizer, Karlsruhe, Germany), caspofungina (Merck, New Jersey), anidulafungina (Pfizer) e micafungina (Astellas Pharma, USA), utilizados neste estudo, foram preparados de acordo com as recomendações do CLSI (CLSI, 2008), e mantidos em soluções stock a -80 °C. Os marcadores fluorescentes, FUN-1 (2-chloro-4-(2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene)-1) e DiBAC<sub>4</sub>(3) (Bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol) (ambos adquiridos à Molecular Probes, Europe BV, Leiden, Holanda) foram preparados em tampão fosfato (PBS) (Sigma) e conservados a -20 °C.

### 2.3. Avaliação da susceptibilidade aos antifúngicos pelos métodos clássicos

#### 2.3.1. Método de microdiluição para avaliação de antifúngicos

A avaliação da susceptibilidade de *Candida* spp. foi efectuada por microdiluição, de acordo com o protocolo M27-A3 do CLSI (CLSI, 2008). Foram determinadas as concentrações mínimas inibitórias (CIM) para os seguintes antifúngicos: Anfotericina B, Fluconazole, e Equinocandinas, variando a amplitude das concentrações estudadas de 0,03 a 16 µg/ml; 0,125

a 64 µg/ml; e 0,015 a 8 µg/ml, respectivamente. Os padrões de susceptibilidade para o Flu foram definidos segundo o protocolo M27-A3: as estirpes são classificadas como susceptíveis (S) para valores de CIM ≤ 8 µg/ml, como susceptíveis dose-dependente (S-DD) para CIM entre 16-32 µg/ml e resistentes (R) para CIM ≥ 64 µg/ml. Para as Ech, valores de CIM ≤ 2 µg/ml foram considerados S, e CIM > 2 µg/ml NS (não susceptíveis) (CLSI, 2008). Quanto à Anf B, os *breakpoints* ainda não se encontram definidos, sendo aceite pela maioria dos autores: CIM ≤ 1 µg/ml como S, e CIM > 1 µg/ml como R (Sabatelli *et al.*, 2006). A leitura das microplacas para a determinação da CIM foi efectuada, visualmente, às 24 horas para as Ech e às 24 e 48 horas para a Anf B e Flu, tal como recomendado no referido protocolo. Considerou-se como CIM a menor concentração de antifúngico capaz de reduzir o crescimento em 50%, no caso do Flu, e em 100%, no caso da Anf B e Ech.

### 2.3.2. Método de *checkerboard* para avaliação de associações entre antifúngicos

O efeito da associação entre equinocandinas e anfotericina B (Ech/Anf B) foi avaliado em trinta e nove estirpes, e a associação entre equinocandinas e azoles (Ech/Azo) em trinta e seis estirpes. Nestes ensaios, apenas foram utilizados três antifúngicos: a anidulafungina, como fármaco representante das equinocandinas, o fluconazole, como fármaco representante dos azoles, e a anfotericina B. As concentrações testadas para cada agente antifúngico foram de 0,06 a 32 µg/ml para o Flu; 0,06 a 2 µg/ml para a Ani e de 0,015 a 8 µg/ml para a Anf B. As soluções dos fármacos foram preparadas em meio de cultura líquido *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI) (Sigma, EUA). O primeiro antifúngico da combinação foi diluído ao longo do eixo das abcissas da microplaca (fármaco 1), enquanto o segundo antifúngico foi diluído ao longo do eixo das ordenadas (fármaco 2). O inóculo de leveduras foi preparado em RPMI, de acordo com o protocolo descrito para a determinação da susceptibilidade por microdiluição.

Após inoculação, as microplacas foram incubadas a 35 °C; as leituras foram efectuadas visualmente às 24 e 48 horas. Os *endpoints* foram estabelecidos em concordância com os valores definidos para o método de microdiluição M27-A3.

A avaliação da interacção entre os antifúngicos foi determinada através do cálculo da *Fractionary Inhibitory Concentration* (FIC) para cada um dos fármacos em estudo, cuja soma origina o *Fractionary Inhibitory Concentration Index* (FICI) (Kontoyiannis and Lewis, 2003). Os resultados obtidos foram classificados, de acordo com o FICI, em sinérgicos (FICI ≤ 0,5), aditivos (0,5 < FICI < 1), indiferentes (1 ≤ FICI < 4) ou antagonistas (FICI ≥ 4) (Lewis *et al.*, 2002; White *et al.*, 1996).

## 2.4. Avaliação da susceptibilidade aos antifúngicos por citometria de fluxo

### 2.4.1. Incubação com os antifúngicos

Com base nos resultados da microdiluição seleccionaram-se 6 estirpes susceptíveis e 6 não susceptíveis às Ech; 6 estirpes susceptíveis e 1 não susceptível à Anf B; e 4 estirpes susceptíveis e 1 não susceptível ao Flu. As estirpes foram cultivadas em caldo de Sabouraud e incubadas a 35 °C, com agitação (180 rpm), até atingirem a fase exponencial tardia (a qual corresponde a uma densidade óptica igual a 0,4, determinada pela leitura de absorvância a um  $\lambda = 600$  nm). Posteriormente, as células foram centrifugadas (10 min, 2500 rpm), o sobrenadante rejeitado e os inóculos foram padronizados (0,5 McFarland) em PBS. As suspensões celulares, contendo  $10^6$  células/ml, foram incubadas com os antifúngicos durante 1 e 2 horas a 35 °C, com agitação (180 rpm). Sendo o objectivo categorizar as estirpes e não determinar as suas CIMs, as concentrações avaliadas foram seleccionadas de acordo com os *breakpoints* de cada fármaco. Assim, para as Ech foram testadas as concentrações de 1, 2 e 4  $\mu\text{g/ml}$ ; para Anf B as concentrações avaliadas foram 0,5, 1 e 2  $\mu\text{g/ml}$  e para o Flu 8, 16 e 64  $\mu\text{g/ml}$ . Como controlo de morte utilizou-se uma suspensão celular tratada com etanol a 70% (Merck) e como controlo de viabilidade uma suspensão celular não submetida a qualquer tratamento. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

### 2.4.2 Incubação com os antifúngicos associados

As estirpes que previamente tinham sido estudadas pelo método de *checkerboard*, foram inoculadas em caldo de Sabouraud e incubadas a 35 °C, com agitação (180 rpm), até atingirem a fase de crescimento exponencial. Posteriormente, as células foram centrifugadas (10 min, 2500 rpm), o sobrenadante rejeitado e os inóculos foram padronizados (0,5 McFarland) em PBS. As leveduras, foram incubadas com os antifúngicos durante 1 hora a 35 °C, com agitação (180 rpm). As concentrações testadas foram seleccionadas tendo em consideração a CIM previamente determinada para cada estirpe, correspondendo esta a uma diluição abaixo da CIM ( $\frac{1}{2} \times \text{CIM}$ ). Relativamente a cada estirpe, foram preparadas cinco suspensões celulares distintas: células viáveis, células mortas (tratadas com etanol a 70%), células tratadas com  $\frac{1}{2} \times \text{CIM}$  do fármaco 1, células tratadas com  $\frac{1}{2} \times \text{CIM}$  do fármaco 2, e células tratadas com  $\frac{1}{2} \times \text{CIM}$  do fármaco 1 +  $\frac{1}{2} \times \text{CIM}$  do fármaco 2.

### 2.4.3. Marcação das células com os marcadores fluorescentes

A marcação das células foi realizada com recurso a dois marcadores fluorescentes: DiBAC<sub>4</sub>(3), um indicador do potencial de membrana (penetra em células despolarizadas e liga-se a proteínas intracelulares ou membranares, despoletando um aumento de fluorescência); FUN-1, um fluorocromo indicador da actividade metabólica (permite distinguir células viáveis de células não viáveis) (Pina-Vaz C, 2010).

Após o tratamento com os antifúngicos, as suspensões celulares foram centrifugadas (10 min, 2500 rpm), o sobrenadante foi removido e as células foram ressuscendidas em PBS (este passo foi repetido 3 vezes). Para a avaliação da susceptibilidade de antifúngicos isolados, procedeu-se à marcação das células com DiBAC<sub>4</sub>(3) 0,5 µg/ml, durante 30 min, à temperatura ambiente e na ausência de luz. A optimização das condições de marcação foi previamente realizada.

Na avaliação da associação entre antifúngicos, procedeu-se à marcação das células com DiBAC<sub>4</sub>(3) 0,5 µg/ml, para a associação Ech/Anf B, e FUN-1 0,5 µg/ml, para a associação Ech/Azo, durante 30 min, à temperatura ambiente e na ausência de luz (Pina-Vaz et al., 2001b).

Para cada estirpe foi utilizado como controlo: 1) a auto-fluorescência (emitida por células não submetidas a qualquer tratamento e não marcadas); 2) a fluorescência de células viáveis (emitida por células não tratadas, mas marcadas com um marcador fluorescente) e 3) a fluorescência de células mortas (emitida por células incubadas com etanol a 70% e marcadas com um marcador fluorescente).

### 2.4.4. Análise citométrica

Após a marcação, cerca de 30 000 células foram analisadas no citómetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, Sydney, Australia). A intensidade de fluorescência das células tratadas com antifúngico foi avaliada com o detector de fluorescência FL1 (fluorescência verde, 525 nm) para o DiBAC<sub>4</sub>(3), e FL2 (fluorescência amarelo-esverdeado, 575 nm) para o FUN-1, e comparada com os controlos. Os resultados foram expressos através da percentagem de células que revelou fluorescência elevada em FL1 (idêntica à fluorescência apresentada pelas células mortas) no caso do DiBAC<sub>4</sub>(3), e pela intensidade média de fluorescência das células tratadas, relativamente à intensidade média de fluorescência das células viáveis (não submetidas a qualquer tratamento), em FL2, no caso do FUN-1. As amostras foram analisadas em triplicado.

## 2.5. Determinação das Unidades Formadoras de Colónias nas condições da análise citométrica

O número de células viáveis nas suspensões celulares tratadas e não tratadas com antifúngico, foi determinado através da contagem do número de unidades formadoras de colónias (UFC)/ml, em placas de Sabouraud agar. Para cada amostra e ao fim de 1 e 2 horas de tratamento, foram realizadas diluições seriadas de 1:10, até à diluição  $10^{-3}$ . Em seguida, inocularam-se 100  $\mu$ l de cada suspensão e respectivas diluições nas placas de agar, e incubaram-se a 35 °C. A contagem do número de UFC foi realizada 24 horas após a inoculação. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

Relativamente à associação entre antifúngicos, esta foi avaliada de acordo com os critérios estabelecidos para o método do *time-kill assay*. Assim, considerou-se como sinérgico, quando se verifica um aumento  $\geq 2 \log_{10}$  na morte das células tratadas com os dois fármacos em relação às células tratadas com apenas um fármaco (sendo esta contabilizada pela determinação da UFC/ml); efeito aditivo, quando se verifica um aumento  $> 1$  mas  $< 2 \log_{10}$  UFC/ml; indiferente, quando há uma redução na morte  $< 2 \log_{10}$  UFC/ml; e antagonista, quando há uma redução  $> 2 \log_{10}$  UFC/ml (Lewis *et al.*, 2002).

## 2.6. Comparação entre metodologias

Para a avaliação da concordância entre os métodos citometria de fluxo/*checkerboard* e citometria de fluxo/determinação de UFCs, resultando em variáveis categóricas as medidas mais adequadas são a proporção de concordância (PC) e o valor de *kappa* (*k*), sendo que estas duas medidas complementam-se (Sabin, 2002).

A PC corresponde à proporção de casos em que ambas as técnicas concordam relativamente ao número total de casos. Esta pode variar entre 0 e 1. Sendo que 0 corresponde a uma discordância total e 1 a uma concordância total (Sabin, 2002).

O valor de *k*, que corresponde à proporção de concordância corrigindo o acaso, varia entre -1 e 1, sendo que 1 corresponde à concordância total, 0 à concordância que esperaríamos obter caso as classificações fossem feitas ao acaso e -1 à discordância total. É de salientar que este é afectado pela prevalência e número de categorias, o que nem sempre permite uma comparação directa com estudos desenvolvidos noutras populações (Sabin, 2002).

Relativamente à avaliação da validade diagnóstica da citometria de fluxo na detecção das diferentes classificações foram calculadas a sensibilidade, especificidade, valores

preditivos, *likelihood* ratios e validade (com os respectivos intervalos de confiança a 95%) para cada um dos parâmetros. Estas medidas foram calculadas para a totalidade dos casos e parcialmente para os casos em que foi utilizada as associações Ani/Anf B e Ani/Flu, e utilizando o método *checkerboard* como método de referência.

Os valores calculados foram comparados de forma a detectar diferenças entre os diferentes grupos de classificação, os diferentes ambientes de análise e os dois métodos avaliados.

Para todas as medidas foi utilizado o SPSS (versão 17.0) como instrumento de auxílio no cálculo das mesmas.

## 3. Resultados

### 3.1. Avaliação da susceptibilidade aos antifúngicos pelos métodos clássicos

#### 3.1.1. Método de microdiluição para avaliação da susceptibilidade a antifúngicos

Os padrões de susceptibilidade das estirpes clínicas de *Candida* spp. (n = 90), aos antifúngicos anfotericina B, fluconazole, micafungina, anidulafungina e caspofungina, determinados pelo método de microdiluição (protocolo M27-A3) (CLSI, 2008), encontram-se descritos na tabela 1.

**Tabela 1 – Padrão de susceptibilidade de 90 estirpes do género *Candida* à anfotericina B (Anf B), fluconazole (Flu), micafungina (Mica), anidulafungina (Ani) e caspofungina (Cas).**

Espécie	N	Fármaco	Limites CIM	MG	% Estirpes S
<i>C. albicans</i>	41	Anf B	0,06-0,5	0,24	100
		Flu	0,25-64	27	45
		Mica	0,015-0,03	0,05	100
		Ani	0,015-0,25	0,2	100
		Cas	0,25-2	0,6	100
<i>C. glabrata</i>	20	Anf B	0,125-0,5	0,2	100
		Flu	0,5-8	6,3	74
		Mica	0,015-8	0,08	94
		Ani	0,016-4	0,43	88
		Cas	0,5-8	0,95	88
<i>C. parapsilosis</i>	17	Anf B	0,06-0,5	0,21	100
		Flu	0,5-64	12	81
		Mica	0,25-8	1,4	87
		Ani	0,5-8	2,09	67
		Cas	1-8	2	73
<i>C. tropicalis</i>	7	Anf B	0,06-0,25	0,17	100
		Flu	0,05-32	8	92
		Mica	0,015-0,03	0,07	100
		Ani	0,015-0,25	0,12	100
		Cas	0,125-4	0,45	85
<i>C. guilliermondii</i>	1	Anf B	0,125	-	100
		Flu	4	-	100
		Mica	0,5	-	100
		Ani	1	-	100
		Cas	2	-	100
<i>C. krusei</i>	3	Anf B	0,06-0,125	0,08	100
		Flu	16-64	31,3	0
		Mica	0,06-0,5	0,17	100
		Ani	0,015-0,25	0,25	100
		Cas	1-2	1,4	100
<i>C. lusitaniae</i>	1	Anf B	2	-	0
		Flu	16	-	0
		Mica	0,06	-	100
		Ani	0,015	-	100
		Cas	1	-	100

N – número de estirpes; CIM – concentração inibitória mínima; MG - média geométrica; S - susceptível.

Todas as estirpes clínicas demonstraram ser susceptíveis à Anf B (CIM  $\leq$  1  $\mu\text{g/ml}$ ), com excepção de *C. lusitaniae* (CIM de 2  $\mu\text{g/ml}$ ).

Valores elevados de CIM para o Flu, foram encontrados principalmente em estirpes de *C. albicans* e *C. krusei* (CIM  $\geq$  64  $\mu\text{g/ml}$ ).

Relativamente às equinocandinas, na maioria das estirpes não se verificaram CIM elevadas (CIM  $>$  2  $\mu\text{g/ml}$ ). No entanto, em algumas estirpes de *C. parapsilosis* e *C. glabrata* observaram-se valores de CIM  $>$  2  $\mu\text{g/ml}$ . Constatou-se também que o antifúngico Cas apresenta CIM mais elevadas do que as restantes equinocandinas.

### 3.1.2. Método de *checkerboard* para avaliação de associações entre antifúngicos

Os resultados do método de *checkerboard* que traduzem os efeitos *in vitro* das associações entre anidulafungina e anfotericina B (Ani/Anf B), e anidulafungina e fluconazole (Ani/Flu), em estirpes clínicas de *Candida* spp. encontram-se apresentados nas tabelas 2a e 2b, respectivamente.

A associação Ani/Anf B exerceu um efeito sinérgico em 43% das estirpes estudadas (17 em 39), aditivo em 36% (14 em 39), indiferente em 13% (5 em 39) e antagonista em 8% (3 em 39). Nas estirpes de *C. parapsilosis*, esta associação actuou de modo sinérgico (44%) ou aditivo (56%), reduzindo significativamente a CIM da Ani (8 para 2  $\mu\text{g/ml}$ ), sem evidências de indiferença ou antagonismo. Nas restantes espécies em estudo, a percentagem conjunta de indiferença e antagonismo não excedeu os 50% das estirpes.

A associação Ani/Flu apresentou efeito sinérgico em 44% das estirpes (16 em 36), aditivo em 25% (9 em 36), indiferente em 28% (10 em 36) e antagonista em 3% (1 em 36). Apenas numa estirpe de *C. parapsilosis*, esta associação demonstra um efeito antagonista, não se verificando também redução da CIM do Flu nas restantes estirpes da mesma espécie. Em relação às demais espécies em estudo, assiste-se a um sinergismo significativo, acompanhado de redução das CIM de ambos os fármacos em estudo.

## 3.2. Avaliação da susceptibilidade aos antifúngicos por citometria de fluxo

### 3.2.1 Susceptibilidade a antifúngicos isolados

#### - Equinocandinas

Os resultados da avaliação da susceptibilidade a equinocandinas por citometria de fluxo com DiBAC<sub>4</sub>(3) encontram-se representados na figura 1.



**Tabela 2a – Actividade antifúngica e efeito da associação anidulafungina (Ani) e anfotericina B (Anf B) nas estirpes clínicas de *Candida* spp. (n=39).**

	Ani (µg/ml)				Anf B (µg/ml)				Efeito da associação (%)				
	N	Isolado		Associação		Limite CIM	MG	Associação		Sinérgico	Aditivo	Indiferente	Antagonista
		Limite CIM	MG	Limite CIM	MG			Limite CIM	MG				
<i>C. albicans</i>	14	0,015-1	0,09	0,06-0,125	0,06	0,06-1	0,19	0,015-0,03	0,01	43	21	7	29
<i>C. glabrata</i>	8	0,015-4	0,19	0,06-1	0,07	0,06-0,25	0,17	0,015-0,125	0,02	25	38	25	12
<i>C. guilliermondii</i>	1	1	-	0,25	-	0,125	-	0,03	-	100	-	-	-
<i>C. krusei</i>	2	0,125-0,25	0,18	0,06-0,125	0,08	0,125-0,25	0,17	0,015	0,015	50	-	50	-
<i>C. lusitanae</i>	1	0,5	-	0,25	-	2	-	0,25	-	-	100	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	9	1-8	2,9	0,06-2	0,5	0,125-0,25	0,16	0,03-0,06	0,04	44	56	-	-
<i>C. tropicalis</i>	4	0,015-1	0,12	0,06-0,5	0,07	0,06-0,5	0,2	0,015-0,03	0,01	50	-	25	25

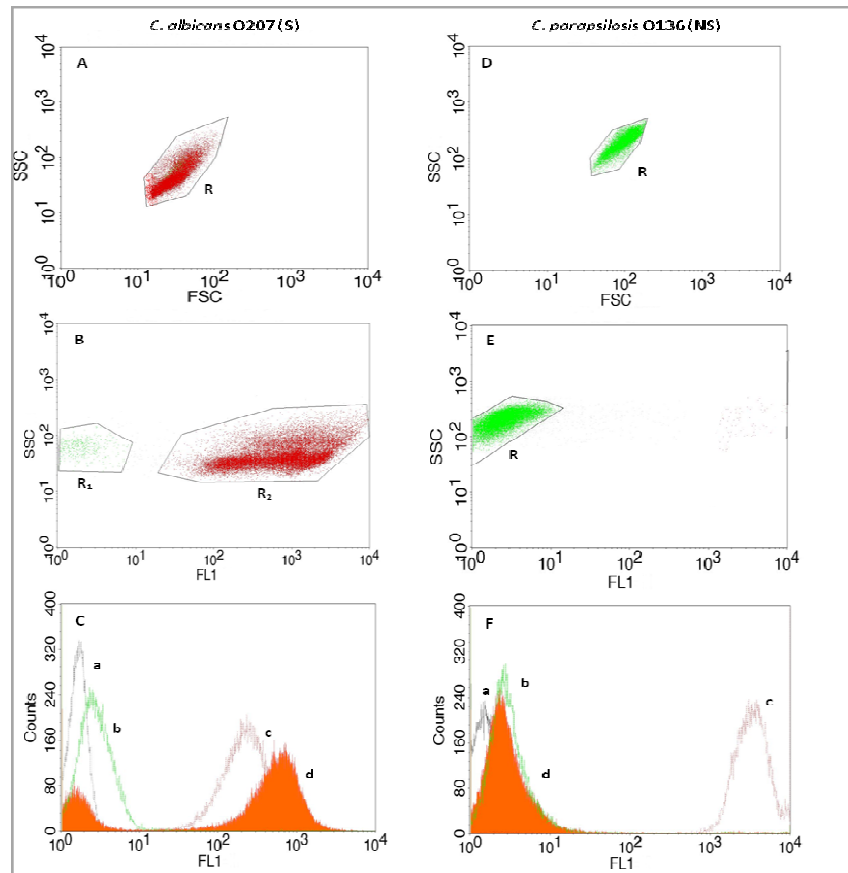
N – número de estirpes; CIM – concentração inibitória mínima; MG - média geométrica.

**Tabela 2b – Actividade antifúngica e efeito da associação anidulafungina (Ani) e fluconazole (Flu) nas estirpes clínicas de *Candida* spp. (n=36).**

	Ani (µg/ml)				Flu (µg/ml)				Efeito da associação (%)				
	N	Isolado		Associação		Limite CIM	MG	Associação		Sinérgico	Aditivo	Indiferente	Antagonista
		Limite CIM	MG	Limite CIM	MG			Limite CIM	MG				
<i>C. albicans</i>	16	0,015-0,25	0,05	0,06-0,125	0,03	0,125-64	7,66	0,06-0,125	0,08	38	6	56	-
<i>C. glabrata</i>	9	0,015-4	0,53	0,06-0,25	0,08	4-16	9,33	0,06-4	0,15	78	11	11	-
<i>C. krusei</i>	1	0,25	-	0,06	-	64	-	0,06	-	100	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	7	2-8	3,17	0,25-2	0,25	0,125-2	0,79	0,25-2	0,63	29	29	29	13
<i>C. tropicalis</i>	3	0,015-0,25	0,03	0,06	0,06	2	2	0,06	0,06	33	-	67	-

N – número de estirpes; CIM – concentração inibitória mínima; MG - média geométrica.

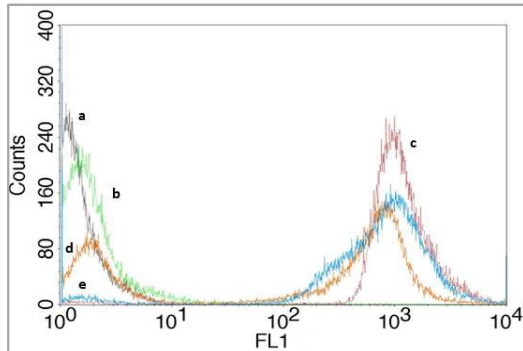
Como as diferentes Ech apresentam padrões de actividade antifúngica semelhante em *Candida* spp., seleccionou-se a anidulafungina como fármaco representado desta classe de antifúngicos (Pfaller *et al.*, 2008; Pound *et al.*, 2010).



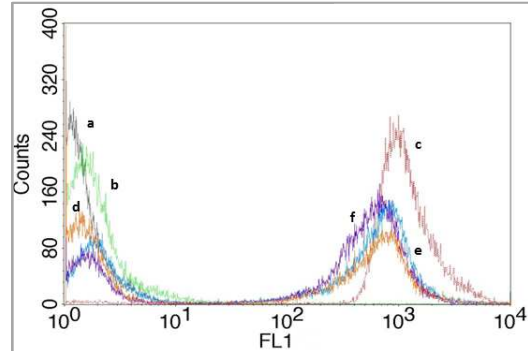
**Figura 1 – Análise citométrica da estirpe *C. albicans* O207 susceptível (S) à Anidulafungina (Ani) (A-C) e da estirpe *C. parapsilosis* O136 não susceptível (NS) à Ani (D-F), após tratamento com 1 µg/ml de Ani durante 1 hora e marcação com DiBAC<sub>4</sub>(3). A e D: “scattergram” complexidade (SSC) versus tamanho (FSC), onde se encontram representadas as populações de células (R). B e E: “scattergram” complexidade (SSC) versus fluorescência (FL1 – 525 nm), onde se encontram representadas as populações de células (R) – verificar a presença de duas subpopulações na estirpe S: R<sub>1</sub> (verde) representa a subpopulação de células viáveis e R<sub>2</sub> (vermelho) a subpopulação de células não viáveis. C e F: sobreposição de histogramas representativos de diferentes populações celulares: a – auto-fluorescência; b – fluorescência de células não tratadas marcadas com DiBAC<sub>4</sub>(3) (controlo de viabilidade); c – fluorescência de células tratadas com etanol 70% e marcadas com DiBAC<sub>4</sub>(3) (controlo de morte); d – fluorescência de células tratadas com 1 µg/ml de Ani, durante 1h e marcadas com DiBAC<sub>4</sub>(3) (correspondendo à população R de cada estirpe).**

Pela análise da figura 1, verifica-se que a população de células de *C. albicans* susceptível (S) à Ani (CIM 0,06 µg/ml) (A) após 1 hora de incubação com 1 µg/ml deste fármaco, apresenta duas subpopulações (B) – R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> com diferentes intensidades de fluorescência (IF), sendo a IF de R<sub>2</sub> superior à de R<sub>1</sub>. Na população de células de *C. parapsilosis* não susceptível (NS) à Ani (CIM 4 µg/ml) (D), quando sujeita ao tratamento nas mesmas condições, encontra-se quase totalmente uma população com IF reduzida. Os histogramas

demonstram que em C a população de células tratadas com antifúngico (d) apresenta dois picos distintos de fluorescência, um (laranja, à direita) que corresponde a cerca de 25% da população, com IF semelhante à IF do controlo de viabilidade (b) e outro (laranja, à esquerda) que corresponde a cerca de 75% da população, cuja IF se mostrou ligeiramente superior à IF do controlo de morte (c); em F a população de células tratadas emite uma IF muito semelhante à do controlo de viabilidade, parecendo não haver entrada de DiBAC<sub>4</sub>(3) nas células em análise.



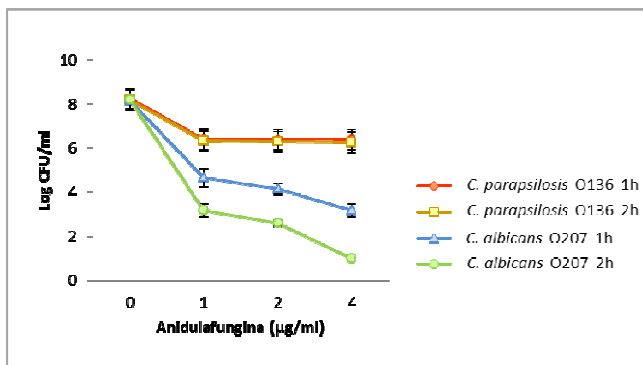
**Figura 2** – Histograma representativo da estirpe *C. albicans* O207 sensível à Anidulafungina (Ani), após tratamento com 1 µg/ml de Ani durante 1 hora (d – laranja) e 2 horas (e – azul) e marcação com DiBAC<sub>4</sub>(3), analisada em FL1 (525 nm). a – auto-fluorescência; b – fluorescência de células não tratadas marcadas com DiBAC<sub>4</sub>(3) (controlo de viabilidade); c – fluorescência de células tratadas com etanol 70% e marcadas com DiBAC<sub>4</sub>(3) (controlo de morte).



**Figura 3** – Histograma representativo da estirpe *C. albicans* O207 sensível à Anidulafungina (Ani), após tratamento com 1 (d – laranja), 2 (e – azul) e 4 (f – roxo) µg/ml de Ani durante 1 hora e marcação com DiBAC<sub>4</sub>(3), analisada em FL1 (525 nm). a – auto-fluorescência; b – fluorescência de células não tratadas marcadas com DiBAC<sub>4</sub>(3) (controlo de viabilidade); c – fluorescência de células tratadas com etanol 70% e marcadas com DiBAC<sub>4</sub>(3) (controlo de morte).

A figura 2 demonstra que a IF das células tratadas aumenta ligeiramente com o aumento do tempo de incubação com o fármaco. Contudo, após 1 hora de incubação há uma diferença notória entre a IF das células tratadas (d) e a IF do controlo de viabilidade (b).

Observa-se ainda que o efeito da Ani aumenta quando a sua concentração aumenta, o que é representado por um aumento subtil (5-10%) da IF nas células tratadas com 1, 2 e 4 µg/ml de Ani (d, e, f, respectivamente) (figura 3).

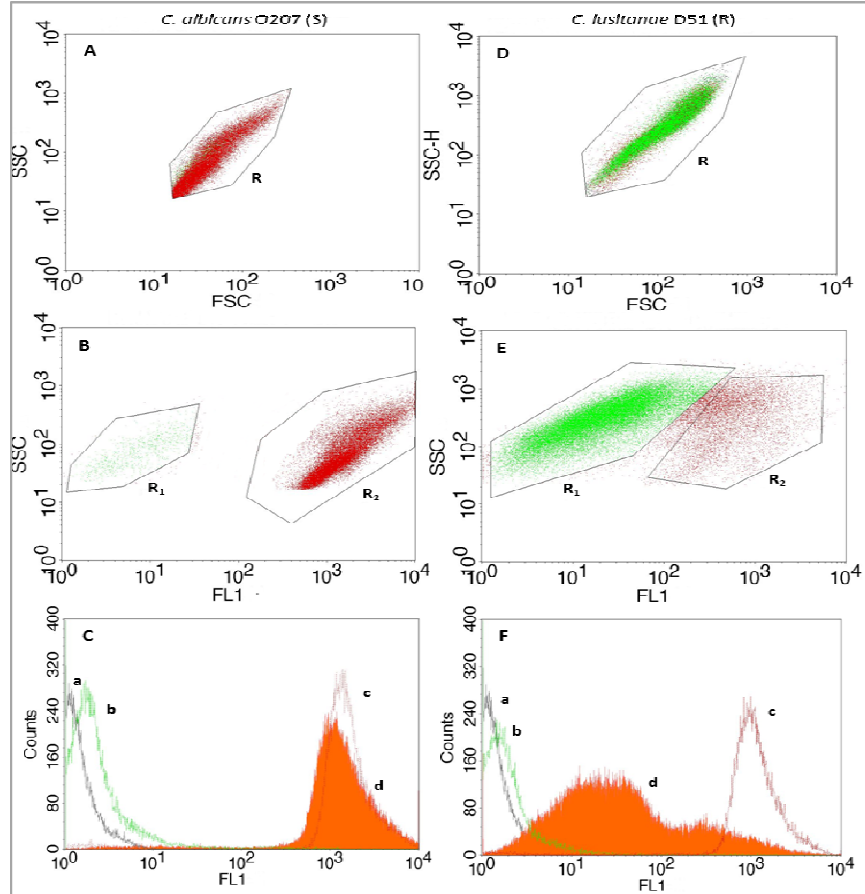


**Figura 4** – Ensaio de viabilidade das estirpes *C. albicans* O207 sensível à Anidulafungina (Ani) e *C. parapsilosis* O136 não susceptível à Ani, expostas a diferentes concentrações de Ani (0, 1, 2 e 4 µg/ml) durante 1 e 2 horas.

Os resultados do estudo da actividade da Ani por CF, confirmam-se pelo ensaio de viabilidade (determinação de UFC) das duas estirpes S e NS, submetidas a iguais condições de tratamento com Ani (representado na figura 4).

**- Anfotericina B**

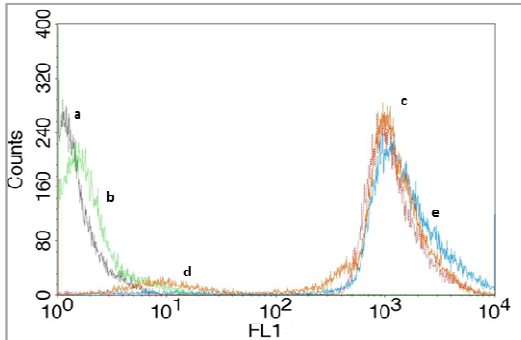
Os resultados da avaliação da susceptibilidade a Anf B por CF com DiBAC<sub>4</sub>(3) encontram-se representados na figura 5.



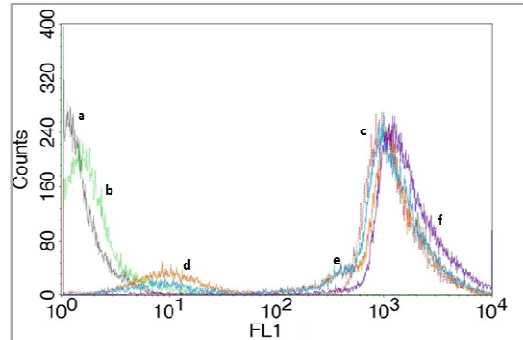
**Figura 5 – Análise citométrica da estirpe *C. albicans* O207 susceptível (S) à Anfotericina B (Anf B) (A-C) e da estirpe *C. lusitanae* D51 resistente (R) à Anf B (D-F), após tratamento com 1 µg/ml de Anf B durante 1 hora e marcação com DiBAC<sub>4</sub>(3). A e D: “scattergram” complexidade (SSC) versus tamanho (FSC), onde se encontram representadas as populações de células (R). B e E: “scattergram” complexidade (SSC) versus fluorescência (FL1 – 525 nm), onde se encontram representadas as populações de células (R) – verificar a presença de duas subpopulações: R<sub>1</sub> (verde) representa a subpopulação de células viáveis e R<sub>2</sub> (vermelho) a subpopulação de células não viáveis. C e F: sobreposição de histogramas representativos de diferentes populações celulares: a – auto-fluorescência; b – fluorescência de células não tratadas marcadas com DiBAC<sub>4</sub>(3) (controlo de viabilidade); c – fluorescência de células tratadas com etanol 70% e marcadas com DiBAC<sub>4</sub>(3) (controlo de morte); d – fluorescência de células tratadas com 1 µg/ml de Anf B, durante 1h e marcadas com DiBAC<sub>4</sub>(3) (correspondendo à população R de cada estirpe).**

As populações de células A, susceptíveis (S) (CIM 0,25 µg/ml) e D, resistentes (R) (CIM 2 µg/ml) à Anf B, após 1 hora de incubação com 1 µg/ml do fármaco em estudo, apresentam duas subpopulações – R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> com IF distintas, sendo a IF de R<sub>2</sub> superior à de R<sub>1</sub>. Através da análise do histograma C verifica-se que a estirpe S após 1 hora de incubação com o

fármaco (d) apresenta uma IF muito idêntica à IF do controlo de morte (c); a estirpe resistente, representada no histograma F, apresenta dois picos diferentes, onde 82% da população demonstra uma IF superior à do controlo de viabilidade (b) e inferior à do controlo de morte (c).



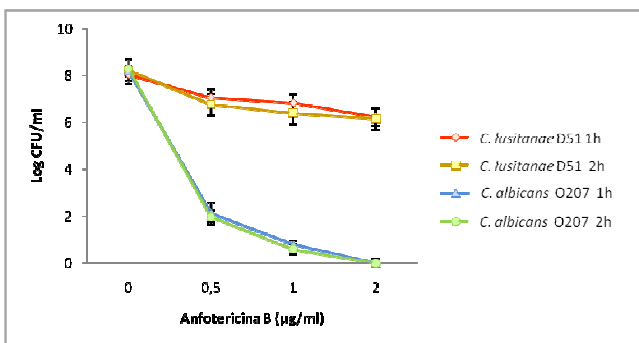
**Figura 6** – Histograma representativo da estirpe *C. albicans* O207 sensível à Anfotericina B (Anf B) após tratamento com 1 µg/ml de Anf B durante 1 hora (d – laranja) e 2 horas (e – azul) e marcação com DiBAC<sub>4</sub>(3), analisada em FL1 (525 nm). a – auto-fluorescência; b – fluorescência de células não tratadas marcadas com DiBAC<sub>4</sub>(3) (controlo de viabilidade); c – fluorescência de células tratadas com etanol 70% e marcadas com DiBAC<sub>4</sub>(3) (controlo de morte).



**Figura 7** – Histograma representativo da estirpe *C. albicans* O207 sensível à Anfotericina B (Anf B) após tratamento com 0,5 (d – laranja), 1 (e – azul) e 2 (f – roxo) µg/ml de Anf B durante 1 hora e marcação com DiBAC<sub>4</sub>(3), analisada em FL1 (525 nm). a – auto-fluorescência; b – fluorescência de células não tratadas marcadas com DiBAC<sub>4</sub>(3) (controlo de viabilidade); c – fluorescência de células tratadas com etanol 70% e marcadas com DiBAC<sub>4</sub>(3) (controlo de morte).

A população de células da estirpe S à Anf B tratada com 1 µg/ml deste fármaco, apresenta uma IF idêntica após 1 (d) e 2 (e) horas de incubação (92,41% e 96,73%, respectivamente), por sua vez semelhante à apresentada pelas células mortas (figura 6).

Na figura 7, verifica-se que o aumento da concentração de Anf B leva a um ligeiro aumento na IF das células tratadas com 0,5, 1 e 2 µg/ml (d, e, f respectivamente) ao fim de 1 hora de incubação (figura 7).

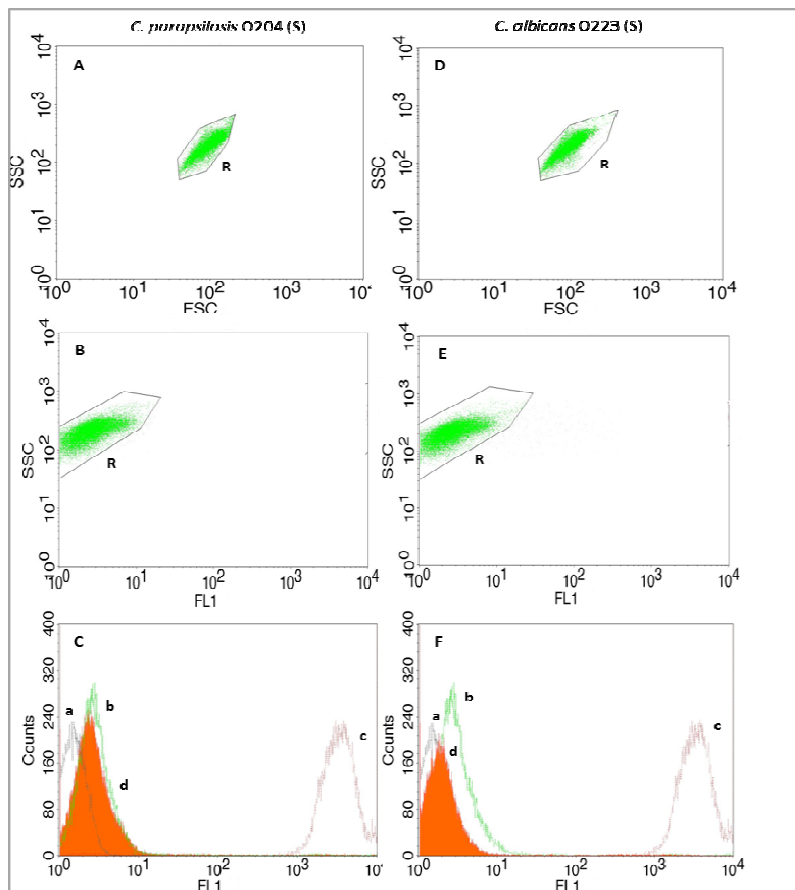


**Figura 8** – Ensaio de viabilidade das estirpes *C. albicans* O207 sensível à Anfotericina B (Anf B) e *C. lusitanae* D51 resistente à Anf B, expostas a diferentes concentrações de Anf B (0, 0,5, 1 e 2 µg/ml) durante 1 e 2 horas.

Os resultados obtidos pela CF são apoiados pelo estudo de viabilidade (determinação de UFC), observando-se um efeito dose-dependente na estirpe susceptível, semelhante após 1 ou 2 horas de incubação com o fármaco (figura 8).

## - Fluconazole

Os resultados da avaliação da susceptibilidade ao Flu por CF com DiBAC<sub>4</sub>(3) encontram-se representados na figura 9.



**Figura 9 – Análise citométrica da estirpe *C. parapsilosis* O204 susceptível ao Fluconazole (Flu) (A-C) e da estirpe *C. albicans* O223 resistente ao Flu (D-F), após tratamento com 16 µg/ml de Flu durante 1 hora e marcação com DiBAC<sub>4</sub>(3). A e D: “scattergram” complexidade (SSC) versus tamanho (FSC), onde se encontram representadas as populações de células (R). B e E: “scattergram” complexidade (SSC) versus fluorescência (FL1 – 525 nm), onde se encontram representadas as populações de células (R). C e F: sobreposição de histogramas representativos de diferentes populações celulares: a – auto-fluorescência; b – fluorescência de células não tratadas marcadas com DiBAC<sub>4</sub>(3) (controlo de viabilidade); c – fluorescência de células tratadas com etanol 70% e marcadas com DiBAC<sub>4</sub>(3) (controlo de morte); d – fluorescência de células tratadas com 16 µg/ml de Flu, durante 1h e marcadas com DiBAC<sub>4</sub>(3) (correspondendo à população R de cada estirpe).**

Ambas as populações de células S (CIM 1 µg/ml) e R (CIM 64 µg/ml) ao Flu, tratadas com 16 µg/ml do fármaco em estudo, emitem uma IF próxima da IF apresentada pelo controlo de viabilidade. Este resultado sugere que o marcador utilizado, DiBAC<sub>4</sub>(3), não marca células tratadas com Flu, o que é corroborado com o ensaio de viabilidade das estirpes em estudo (Figura 10).

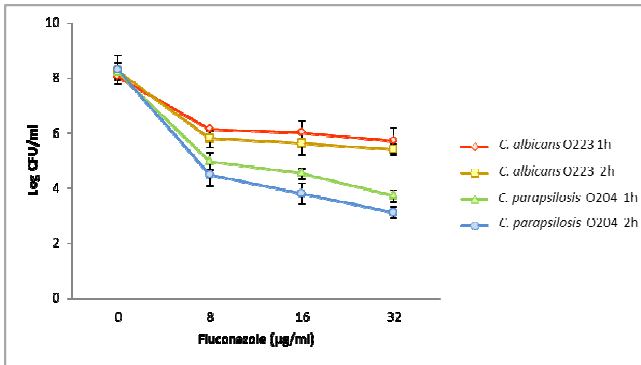


Figura 10 – Ensaio de viabilidade das estirpes *C. parapsilosis* O204 sensível ao Fluconazole (Flu) e *C. albicans* O223 resistente ao Flu, expostas a diferentes concentrações de Flu (0, 8, 16 e 32 µg/ml) durante 1 e 2 horas.

Da análise da Figura 10, verifica-se que a actividade fungistática do Flu é dose-dependente, observando-se um ligeiro aumento desta ao fim de 2 horas de incubação versus 1 hora.

### 3.2.2 Associações de antifúngicos

Os resultados da associação Ani/Anf B sobre a estirpe *C. albicans* O215, cujas CIM são de 0,25 µg/ml para a Ani e 0,06 para a Anf B, encontram-se representados na Figura 11. Os três tratamentos, C1, C2 e C3, resultam em dois picos distintos de fluorescência. Em C1, cerca de 68% da população de células (M) tratadas com Ani numa concentração de uma diluição abaixo da CIM, durante 1 hora, emite uma IF semelhante à do controlo de morte (b). Em C2, aproximadamente 13% das células tratadas (M) com Anf B numa concentração de uma diluição abaixo da CIM, durante 1 hora, emite uma IF ligeiramente inferior à do controlo de morte (b). Em C3, cerca de 75% da população (M) tratada com ambos os fármacos em associação durante 1 hora, emite uma IF próxima da do controlo de morte (b). Os histogramas representam assim um exemplo típico de uma estirpe em que associação Ani/Anf B exerceu um efeito sinérgico.

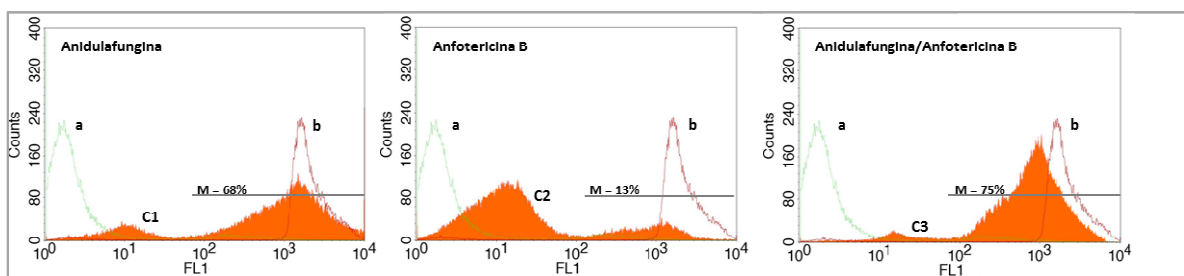
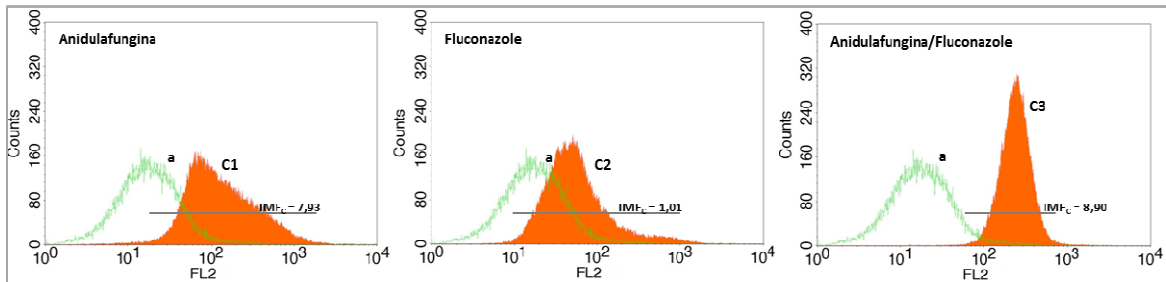


Figura 11 – Histograma representativo da estirpe *C. albicans* O215, na qual a associação Anidulafungina/Anfotericina B apresentou um efeito sinérgico. Análise efectuada em FL1 - 525 nm. a – fluorescência de células não tratadas marcadas com DiBAC<sub>4</sub>(3) (controlo de viabilidade); b – fluorescência de células tratadas com etanol 70% e marcadas com DiBAC<sub>4</sub>(3) (controlo de morte); C1 – fluorescência de células tratadas com uma concentração sub-inibitória de Ani (½ x CIM) e marcadas com DiBAC<sub>4</sub>(3); C2 – fluorescência de células tratadas com uma concentração sub-inibitória de Anf B (½ x CIM) e marcadas com DiBAC<sub>4</sub>(3); C3 – fluorescência de células tratadas com Ani associada com Anf B (½ x CIM Ani + ½ x CIM Anf B) e marcadas com DiBAC<sub>4</sub>(3). M – % de células despolarizadas.

Na figura 12, encontra-se representado o resultado da avaliação da associação Anidulafungina/Fluconazole sobre a estirpe *C. glabrata* O158, com valores de CIM de 4 µg/ml para ambos os fármacos testados.

Para a interpretação dos resultados com FUN-1 determina-se a razão entre a intensidade média de fluorescência (IMF) das células tratadas com o antifúngico e a IMF das células não tratadas (controlo de viabilidade), sendo esta razão representada por  $IMF_C$ .

C3 apresenta um  $IMF_C$  (8,90) superior às  $IMF_C$  dos tratamentos C1 e C2 (7,93 e 1,01, respectivamente), o que evidencia que na estirpe em estudo a associação Ani/Flu exerceu um efeito sinérgico.



**Figura 12 – Histograma representativo da estirpe *C. glabrata* O158, na qual a associação Anidulafungina/Fluconazole apresentou um efeito sinérgico.** Análise efectuada em FL2 - 575 nm. a – fluorescência de células não tratadas marcadas com FUN-1 (controlo de viabilidade); C1 – fluorescência de células tratadas com uma concentração sub-inibitória de Ani ( $\frac{1}{2}$  x CIM) e marcadas com FUN-1; C2 – fluorescência de células tratadas com uma concentração sub-inibitória de Flu ( $\frac{1}{2}$  x CIM) e marcadas com FUN-1; C3 – fluorescência de células tratadas com Ani associada com FLU ( $\frac{1}{2}$  x CIM Ani +  $\frac{1}{2}$  x CIM Anf B) e marcadas com FUN-1.  $IMF_C$  – Intensidade média de fluorescência final.

A partir da análise dos histogramas e com base na classificação proposta para o método de *checkerboard*, determinou-se um Índice de fluorescência ( $I_f$ ) com o objectivo de classificar o resultado da avaliação das associações por CF como sinérgica (SI), aditiva (AD), indiferente (I) ou antagonista (A).

Para a associação anidulafungina/anfotericina B o Índice de fluorescência ( $I_f$ ) determinou-se da seguinte forma:

$$\text{Índice de fluorescência} = \frac{M \text{ Ani}/\text{Anf B}}{M \text{ Ani}} + \frac{M \text{ Ani}/\text{Anf B}}{M \text{ Anf B}}$$

Onde M corresponde à percentagem de células despolarizadas (marcadas com DiBAC<sub>4</sub>(3)) resultante dos tratamentos.

Para a associação anidulafungina/fluconazole o  $I_f$  determinou-se de igual forma, substituindo-se M por  $IMF_C$  (Intensidade média de fluorescência final):



$$\text{Índice de fluorescência} = \frac{IMFc \text{ Ani/Flu}}{IMFc \text{ Ani}} + \frac{IMFc \text{ Ani/Flu}}{IMFc \text{ Flu}}$$

De acordo com o  $I_f$  os resultados obtidos são classificados em: antagonistas para  $I_f < 1$ , indiferentes para  $1 \leq I_f \leq 2$ , aditivos  $2 < I_f < 4$  e sinérgicos  $I_f \geq 4$ .

Nas tabelas 3 e 4, encontram-se descritos os resultados da análise citométrica para as associações Ani/Anf B e Ani/Flu (respectivamente) e a classificação dos mesmos segundo os ensaios de viabilidade (determinação de UFCs).

A CF avalia a associação Ani/Anf B como sinérgica em 46% (18 em 39) das estirpes, aditiva em 39% (15 em 39), indiferente em 10% (4 em 39) e antagonista em 5% (2 em 39). Esta associação parece ser mais activa sobre as espécies *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, no entanto os dados obtidos não são suficientes para estabelecer uma correlação com as diferentes espécies.

Relativamente à associação Ani/Flu, esta é avaliada como sinérgica em 36% (13 em 36) das estirpes, aditiva em 39% (14 em 36%), indiferente em 22% (8 em 36) e antagonista em 3% (1 em 36). Tal como na associação Ani/Anf B, os resultados da avaliação desta associação não permitem estabelecer uma correlação com as espécies em estudo.

### 3.3. Comparação entre metodologias

A comparação entre a classificação das associações Ani/Anf B e Ani/Flu obtida por citometria de fluxo e pelos métodos clássicos, *checkerboard assay* e determinação de UFC, encontra-se representada na tabela 5.

Com o objectivo de avaliar a concordância entre os métodos em estudo, procedeu-se ao cálculo das proporções de concordância (PC) e do *kappa* (*k*) (e respectivos intervalos de confiança a 95%) (representados na tabela 6).

Relativamente à PC entre os métodos CF e *checkerboard*, verifica-se que apenas na associação Ani/Anf B ocorreu uma concordância estatisticamente inferior na classificação de indiferente em relação às restantes classificações. Relativamente ao valor de *k* não se verificam diferenças entre os grupos.

Quanto à PC entre os métodos CF e determinação de UFCs, verifica-se que na avaliação global a classificação de antagonista apresenta uma concordância inferior quando comparada com a classificação de sinérgico e aditivo. Na associação Ani/Anf B observa-se uma concordância estatisticamente inferior na classificação de indiferente e antagonista em relação a sinérgico e aditivo. Relativamente ao valor de *k* não se verificam diferenças entre os grupos.

As medidas de validade (com os respectivos intervalos de confiança a 95%) para a detecção das diferentes classificações (SI, AD, I e A) obtidas pela citometria de fluxo considerando o *checkerboard assay* como método de referência, encontram-se apresentadas na tabela 7.

**Tabela 3 –Atividade antifúngica e efeito da associação anidulafungina (Ani) e anfotericina B (Anf B) nas estirpes clínicas de *Candida* spp. (n=39), por citometria de fluxo (CF) e classificação da associação pela determinação de unidades formadoras de colónias (UFC/ml).**

Estirpe	Associação Ani/Anf B				UFC/ml	
	CF (% células mortas)		Ani/Anf	Classificação <sup>a</sup>		Classificação <sup>b</sup>
	Ani	Anf				
<i>C. albicans</i> O236	45,04	13,53	22,42	2,15 (AD)	3,78 (AD)	
<i>C. albicans</i> O223	71,23	14,58	69,08	5,71 (SI)	6,73 (SI)	
<i>C. albicans</i> O216	49,68	8,24	25,17	3,56 (AD)	2,84 (AD)	
<i>C. albicans</i> O189	26,33	1,78	24,77	14,86 (SI)	4,70 (SI)	
<i>C. albicans</i> OL196	83,45	27,89	33,56	1,61 (I)	1,97 (I)	
<i>C. albicans</i> O207	48,96	10,05	8,13	0,98 (A)	0,98 (A)	
<i>C. albicans</i> O245	48,13	37,13	20,01	0,95 (A)	1,32 (I)	
<i>C. albicans</i> O237	42,59	1,57	44,53	29,41 (SI)	9,12 (SI)	
<i>C. albicans</i> O183	22,69	10,41	13,2	1,85 (I)	1,88 (I)	
<i>C. albicans</i> O222	37,4	8,78	32,65	4,59 (SI)	16,37 (SI)	
<i>C. albicans</i> O215*	68,42	13,05	75,04	6,93 (SI)	9,48 (SI)	
<i>C. albicans</i> O190	19,34	11,08	17,57	2,49 (AD)	2,90 (AD)	
<i>C. albicans</i> ATCC	61,34	37,12	53,11	2,30 (AD)	3,76 (AD)	
<i>C. albicans</i> O195	53,12	12,98	17,89	1,72 (I)	2,95 (AD)	
<i>C. glabrata</i> OL158	79,44	19,36	75,85	4,87 (SI)	4,94 (SI)	
<i>C. glabrata</i> O206	35,48	70,21	50,81	2,16 (AD)	3,95 (AD)	
<i>C. glabrata</i> O188	82,83	3,95	58,39	15,49 (SI)	5,31 (SI)	
<i>C. glabrata</i> OL163	73,94	15,09	57,93	4,62 (SI)	9,85 (SI)	
<i>C. glabrata</i> OL149	75,39	36,95	58,23	2,35 (AD)	3,80 (AD)	
<i>C. glabrata</i> O175	66,85	10,44	63,11	6,99 (SI)	14,44 (SI)	
<i>C. glabrata</i> O180	78,27	3,01	73,13	25,23 (SI)	8,04 (SI)	
<i>C. glabrata</i> O181	59,89	5,66	37,48	7,25 (SI)	5,47 (SI)	
<i>C. guilliermondii</i> 33	23,28	2,46	21,11	9,49 (SI)	19,94 (SI)	
<i>C. krusei</i> OL16	29,72	4,81	27,58	6,66 (SI)	7,65 (SI)	
<i>C. krusei</i> O234	14,92	2,11	10,53	5,70 (SI)	7,64 (SI)	
<i>C. lusitanae</i> D51	79,93	49,79	69,93	2,28 (AD)	3,72 (AD)	
<i>C. parapsilosis</i> OL143	72,14	23,71	55,46	3,11 (AD)	3,53 (AD)	
<i>C. parapsilosis</i> O246	67,93	48,06	58,03	2,06 (AD)	3,78 (AD)	
<i>C. parapsilosis</i> ATO17	2,94	0,34	0,78	2,56 (AD)	3,44 (AD)	
<i>C. parapsilosis</i> OL144	21,15	0,63	16,1	26,32 (SI)	14,01 (SI)	
<i>C. parapsilosis</i> O204	82,33	31,18	80,53	3,56 (AD)	3,26 (AD)	
<i>C. parapsilosis</i> O136	15,58	14,5	16,98	2,26 (AD)	3,88 (AD)	
<i>C. parapsilosis</i> Cpo41	8,87	5,98	15,06	4,22 (SI)	8,62 (SI)	
<i>C. parapsilosis</i> O158	45,08	4,92	21,61	4,87 (SI)	12,77 (SI)	
<i>C. parapsilosis</i> O56	21,72	11,53	18,67	2,48 (AD)	3,83 (AD)	
<i>C. tropicalis</i> OL202	90,22	3,45	89,79	27,02 (SI)	4,65 (SI)	
<i>C. tropicalis</i> OL205	70,98	23,04	53,85	3,10 (AD)	14,77 (SI)	
<i>C. tropicalis</i> OL193	42,01	11,21	11,01	1,24 (I)	2,00 (I)	
<i>C. tropicalis</i> 1304	11,54	1,98	3,96	2,34 (AD)	3,96 (AD)	

a -  $\frac{M_{Ani/AnfB}}{M_{Ani}} + \frac{M_{Ani/AnfB}}{M_{AnfB}}$ ; b - Lewis et al (2002).

SI- sinérgico; AD - Aditivo; I - Indiferente; A - Antagonista.

\*exemplo representado na figura 11.

**Tabela 4 – Actividade antifúngica e efeito da associação anidulafungina (Ani) e fluconazole (Flu) nas estirpes clínicas de *Candida* spp. (n=36), por citometria de fluxo (CF) e classificação da associação pela determinação de unidades formadoras de colónias (UFC/ml).**

Estirpe	Associação Anidulafungina/Fluconazole				UFC/ml
	CF (IMF <sub>c</sub> )		Ani/Flu	Classificação <sup>a</sup>	
	Ani	Flu			
<i>C. albicans</i> O189	1,10	1,26	2,60	4,44 (SI)	5,05 (SI)
<i>C. albicans</i> O190	0,48	0,48	1,24	5,13 (SI)	4,40 (SI)
<i>C. albicans</i> O195	2,70	1,62	2,34	2,31 (AD)	3,59 (AD)
<i>C. albicans</i> O205	1,68	0,93	0,82	1,36 (I)	1,99 (I)
<i>C. albicans</i> O207	2,30	1,74	1,55	1,57 (I)	1,97 (I)
<i>C. albicans</i> O216	4,77	3,16	7,72	4,06 (SI)	11,43 (SI)
<i>C. albicans</i> O223	1,75	1,39	4,37	5,65 (SI)	14,41 (SI)
<i>C. albicans</i> O236	1,10	1,03	2,17	4,08 (SI)	6,03 (SI)
<i>C. albicans</i> O237	2,67	1,29	3,50	4,03 (SI)	15,57 (SI)
<i>C. albicans</i> O245	1,41	1,27	1,34	2,00 (I)	2,00 (I)
<i>C. albicans</i> OL122	8,00	4,79	5,69	1,90 (I)	1,73 (I)
<i>C. albicans</i> OL160	0,38	0,38	0,59	3,09 (AD)	3,64 (AD)
<i>C. albicans</i> OL171	0,48	0,49	0,48	2,00 (I)	1,97 (I)
<i>C. albicans</i> OL172	1,26	0,91	1,68	3,19 (AD)	3,64 (AD)
<i>C. albicans</i> OL196	1,28	1,41	1,28	1,91 (I)	2,00 (I)
<i>C. albicans</i> ATCC	1,69	1,40	1,79	2,33 (AD)	3,06 (AD)
<i>C. glabrata</i> O158*	7,93	1,01	8,90	9,93 (SI)	14,94 (SI)
<i>C. glabrata</i> O181	2,48	0,51	2,83	6,72 (SI)	9,78 (SI)
<i>C. glabrata</i> O188	3,77	2,81	7,15	4,44 (SI)	5,32 (SI)
<i>C. glabrata</i> O180	0,46	1,02	1,30	4,09 (SI)	2,96 (AD)
<i>C. glabrata</i> O206	1,88	1,80	2,04	2,22 (AD)	3,71 (AD)
<i>C. glabrata</i> OL149	2,08	1,22	3,24	4,20 (SI)	5,98 (SI)
<i>C. glabrata</i> OL158	1,27	1,01	1,14	2,03 (AD)	2,62 (AD)
<i>C. glabrata</i> OL163	1,78	1,57	1,96	2,35 (AD)	1,87 (I)
<i>C. glabrata</i> OL164	0,96	0,62	1,61	4,29 (SI)	16,80 (SI)
<i>C. krusei</i> OL16	1,10	1,06	1,15	2,13 (AD)	1,97 (I)
<i>C. parapsilosis</i> ATO16	3,10	3,53	4,31	2,61 (AD)	3,63 (AD)
<i>C. parapsilosis</i> Cpo41	1,34	1,11	0,59	0,97 (A)	0,91 (A)
<i>C. parapsilosis</i> O136	1,64	0,91	0,92	1,57 (I)	1,98 (I)
<i>C. parapsilosis</i> O246	1,53	1,72	1,66	2,05 (AD)	3,84 (AD)
<i>C. parapsilosis</i> O56	2,33	4,06	3,07	2,07 (AD)	3,10 (AD)
<i>C. parapsilosis</i> OL143	3,37	4,37	4,96	2,61 (AD)	18,20 (SI)
<i>C. parapsilosis</i> OL144	1,95	1,18	1,94	2,65 (AD)	2,41 (AD)
<i>C. tropicalis</i> OL193	1,12	1,68	1,53	2,27 (AD)	3,02 (AD)
<i>C. tropicalis</i> OL202	0,47	0,75	0,46	1,60 (I)	1,91 (I)
<i>C. tropicalis</i> OL295	1,43	0,98	2,57	4,42 (SI)	3,30 (AD)

a -  $\frac{IMF\ c\ Ani/Flu}{IMF\ c\ Ani} + \frac{IMF\ c\ Ani/Flu}{IMF\ c\ Flu}$ ; b - Lewis et al (2002).

SI - sinérgico; AD - Aditivo; I - Indiferente; A - Antagonista.

\*exemplo representado na figura 12.

Tabela 5 – Comparação entre a classificação obtida pela citometria de fluxo e pelos métodos clássicos: *checkerboard* e determinação de unidades formadoras de colónias (UFCs), para as associações Anidulafungina (Ani)/Fluconazole (Flu) e para ambas as associações.

	<i>Checkerboard</i>															UFCs															
	Global					Ani/Anf B					Ani/Flu					Global					Ani/Anf B					Ani/Flu					
	SI	AD	I	A	Total	SI	AD	I	A	Total	SI	AD	I	A	Total	SI	AD	I	A	Total	SI	AD	I	A	Total	SI	AD	I	A	Total	
Citometria de fluxo	S	29	2	0	0	31	16	2	0	0	18	13	0	0	0	13	29	2	0	0	31	18	0	0	0	18	11	2	0	0	13
	AD	4	21	4	0	29	1	12	2	0	15	3	9	2	0	14	2	25	2	0	29	1	14	0	0	15	1	11	1	0	14
	I	0	0	11	1	12	0	0	3	1	4	0	0	8	0	8	0	1	11	0	12	0	1	3	0	4	0	0	8	0	8
	A	0	0	0	3	3	0	0	0	2	2	0	0	0	1	1	0	0	1	2	3	0	0	1	1	2	0	0	0	1	1
	Total	33	23	15	4	75	17	14	5	3	39	16	9	10	1	36	31	28	14	2	75	19	15	4	1	39	12	13	10	1	36

SI – sinérgico; AD – aditivo; I – indiferente; A – antagonista.

Tabela 6 – Valores de proporção de concordância (PC) e *kappa* (K) (com respectivos intervalos de confiança (IC) a 95%) relativos à avaliação de concordância entre a citometria de fluxo e os métodos clássicos, *checkerboard* e determinação de unidades formadoras de colónias (UFCs).

	<i>Checkerboard</i> vs citometria de fluxo						UFCs vs citometria de fluxo					
	Global		Ani/Anf B		Ani/Flu		Global		Ani/Anf B		Ani/Flu	
	Valor	IC 95%	Valor	IC 95%	Valor	IC 95%	Valor	IC 95%	Valor	IC 95%	Valor	IC 95%
PC de SI	0.83	0.75-0.92	0.84	0.72-0.96	0.81	0.68-0.94	0.88	0.81-1	0.95	0.88-1	0.79	0.66-0.92
PC de AD	0.68	0.57-0.79	0.71	0.57-0.85	0.64	0.48-0.80	0.81	0.72-0.90	0.88	0.78-0.98	0.69	0.54-0.84
PC de I	0.69	0.58-0.80	0.50	0.34-0.66	0.80	0.67-0.93	0.73	0.63-0.83	0.60	0.45-0.75	0.80	0.67-0.93
PC de A	0.75	0.65-0.85	0.67	0.52-0.82	1	---	0.67	0.56-0.68	0.50	0.34-0.66	1	---
PC total	0.85	0.77-0.93	0.85	0.73-0.97	0.86	0.75-0.97	0.89	0.82-1	0.92	0.83-1	0.86	0.75-0.97
K total	0.78	0.69-0.87	0.76	0.63-0.89	0.79	0.66-0.92	0.83	0.75-0.91	0.87	0.76-0.98	0.79	0.66-0.92

SI - sinérgico; AD - aditivo; I - indiferente; A - antagonista. Ani - anidulafungina; Anf B - anfotericina B; Flu - fluconazole

**Tabela 7 – Valores das medidas de validade (com respectivos intervalos de confiança (IC) a 95%) para detecção das diferentes classificações obtidas por citometria de fluxo utilizando o *checkerboard* como método de referência.**

	<i>Global</i>							<i>Anidulafungina + anfotericina</i>							<i>Anidulafungina + fluconazol</i>						
	Sens (%)	Esp (%)	VPP (%)	VPN (%)	LR+	LR-	Valid (%)	Sens (%)	Esp (%)	VPP (%)	VPN (%)	LR+	LR-	Valid (%)	Sens (%)	Esp (%)	VPP (%)	VPN (%)	LR+	LR-	Valid (%)
<b>SI</b>	88	95	94	91	18.5	0.1	92	94	91	89	95	10.4	0.06	92	81	100	100	87	NC	0.2	92
	81-95	90-100	89-99	85-97	4.7-71.8	0.05-0.3	86-98	87-100	82-100	79-99	88-100	2.7-39.0	0.01-0.4	83-100	68-94	----	----	76-88	----	0.07-0.5	83-100
<b>AD</b>	91	85	72	96	5.9	0.1	87	86	88	80	92	7.1	0.2	87	100	81	64	100	5.4	NC	86
	85-97	77-93	62-82	92-100	3.1-11.4	0.03-0.4	79-95	75-97	78-98	67-93	83-100	2.4-21.1	0.04-0.6	76-98	----	68-94	48-80	----	2.4-11.9	----	75-97
<b>I</b>	73	98	92	94	44.0	0.3	93	60	97	75	94	20.4	0.4	92	80	100	100	93	NC	0.2	94
	63-83	95-100	86-98	89-99	6.2-314.7	0.1-0.6	87-99	45-75	92-100	68-82	87-100	2.6-159.9	0.1-1.2	83-100	67-93	----	----	85-100	----	0.06-0.7	86-100
<b>A</b>	75	100	100	99	NC	0.3	99	67	100	100	97	NC	0.3	97	100	100	100	100	NC	NC	100
	65-85	----	----	97-100	----	0.05-0.1	97-100	52-82	----	----	92-100	----	0.07-1.7	92-100	----	----	----	----	----	----	----

A – Antagónico, AD – Aditivo, I - Indiferente, SI - Sinérgico / Esp: especificidade, LR+: *likelihood* ratio positivo, LR-: *likelihood* ratio negativo, NC: não calculável, Sens: sensibilidade, Valid: validade, VPN: valor preditivo negativo, VPP: valor preditivo positivo.

Através da análise da tabela 7, verificam-se diferenças estatisticamente significativas na sensibilidade de detecção de efeito I e A na associação Ani/Anf B, a qual é inferior quando comparada com a detecção de efeito SI; o valor preditivo positivo de detecção de efeito indiferente na associação Ani/Anf B é inferior ao da associação Ani/Flu. Também a sensibilidade de detecção de efeito I na avaliação global é inferior quando comparada com a detecção de efeito AD e A.

## 4. Discussão

O tratamento das infecções fúngicas invasivas representa ainda um verdadeiro desafio clínico. A emergência da resistência ao Flu, sobretudo em *C. albicans*, e a diminuição da susceptibilidade às Ech em algumas espécies, tais como *C. parapsilosis* e *C. glabrata* colocam seriamente em causa a terapêutica empírica e tornam necessária a avaliação da susceptibilidade, que nem sempre é efectuada nos laboratórios de rotina (Casalinuovo *et al.*, 2004; Perlin, 2007). A associação entre antifúngicos é por vezes utilizada como terapêutica de salvamento, mesmo sem a existência de suporte científico válido que a suporte.

Apesar de existirem métodos padronizados para avaliação da susceptibilidade aos antifúngicos *in vitro*, a existência de métodos para avaliação da actividade de antifúngicos associados é ainda escassa (Lewis *et al.*, 2002). O método do *checkerboard*, apesar de todas as dificuldades inerentes à sua prática, continua a ser o método mais utilizado para avaliação de associações entre antifúngicos. Existem alguns estudos que avaliam ainda a correlação entre este método e os métodos *time-kill* e *Etest* (Kiraz *et al.*, 2009). No entanto, todos estes métodos requerem um tempo mínimo de resposta que ultrapassa as 24 horas (Lewis *et al.*, 2002).

A citometria de fluxo com recurso a marcadores fluorescentes já demonstrou ser uma excelente ferramenta para avaliação da susceptibilidade aos diferentes antifúngicos em tempo útil (Pina-Vaz C, 2010; Pina-Vaz *et al.*, 2001b; Ramani *et al.*, 1997; Rudensky *et al.*, 2005).

Neste estudo, a avaliação da susceptibilidade às equinocandinas, anfotericina B e fluconazole, foi individualmente efectuada pela utilização do marcador DiBAC<sub>4</sub>(3). Este marcador é um indicador do potencial de membrana, que cora células despolarizadas e por ligação a proteínas intracelulares ou membranares, despoleta um aumento da intensidade de fluorescência (Lee and Kwak, 1999). As estirpes susceptíveis à Ani e Anf B, quando tratadas com estes fármacos e marcadas com DiBAC<sub>4</sub>(3), manifestaram um aumento da percentagem de células com elevada intensidade de fluorescência, ou seja, despolarizadas. A estirpe não susceptível à Ani e a estirpe resistente à Anf B, quando sujeitas ao mesmo tratamento, não apresentaram um aumento da percentagem de células despolarizadas relativamente ao controlo de viabilidade. Estes resultados indicam que o DiBAC<sub>4</sub>(3) é um bom marcador para avaliar a susceptibilidade de *Candida* spp. a Ech e a Anf B. Relativamente às estirpes S e R ao Flu, quando tratadas com este fármaco e marcadas com DiBAC<sub>4</sub>(3), apresentaram uma percentagem de células não despolarizadas semelhante ao controlo de viabilidade, não

havendo pois evidência de despolarização da membrana. Este resultado indica que a susceptibilidade ao Flu não pode ser correctamente avaliada com recurso a este marcador de fluorescência.

Estes resultados levaram-nos a estudar a associação Ani/Flu com o marcador de fluorescência FUN-1, previamente descrito como um marcador eficaz para avaliar a susceptibilidade a cada um dos fármacos isoladamente (Pina-Vaz C, 2010).

O FUN-1 é um marcador de actividade metabólica, que penetra nas células por difusão passiva. Nas células viáveis e metabolicamente activas este marcador é convertido em estruturas cilíndricas e intravacuolares de coloração vermelha. Em contraste, nas células metabolicamente inactivas este marcador permanece no citoplasma, o que se traduz por um aumento da intensidade de fluorescência verde (575 nm) (Pina-Vaz et al., 2005; Pina-Vaz C, 2010; Pina-Vaz et al., 2001a). Assim, o FUN-1 permite avaliar a susceptibilidade ao Flu e à Ani.

Em estudos anteriores verificou-se que a susceptibilidade à Anf B não pode ser avaliada com o FUN-1, apesar das células se encontrarem mortas ao fim de 1 hora. Assim para a associação Ani/Anf B foi utilizado o DiBAC<sub>4</sub>(3), visto ter sido possível avaliar correctamente o efeito de ambos os fármacos quando isolados.

A escolha de um marcador fluorescente adequado é extremamente importante na avaliação do perfil de susceptibilidade aos fármacos por citometria de fluxo.

A selecção dos fármacos para associação foi feita com base no seu mecanismo de acção.

A associação anidulafungina/anfotericina B exerceu um efeito sinérgico ou aditivo na maioria das estirpes estudadas. A Ani actua nas células fúngicas por inibição da síntese do 1,3-β-D-glucano. Este mecanismo é diferente do mecanismo de acção da Anf B, a qual se liga ao ergosterol existente na membrana celular formando canais ou poros. Assim, é possível que a Ani ao inibir a síntese da parede celular, potencie o acesso da Anf B à membrana das células fúngicas (Karlowsky JA, 2006; Kiraz *et al.*, 2009; Nishi *et al.*, 2009).

Relativamente à associação anidulafungina/fluconazole, encontrou-se efeitos aditivos em grande parte das estirpes estudadas. O fluconazole actua por inibição da síntese do ergosterol. Assim, a Ani poderá facilitar o acesso do Flu ao seu alvo de acção (Karlowsky JA, 2006; Nishi *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2005).

Estes resultados são concordantes com o conceito de que a associação de dois fármacos com diferentes mecanismos de acção potencia a actividade de ambos os fármacos, permitindo reduzir as suas concentrações (Karlowsky JA, 2006).

A partir da análise citométrica, foi possível determinar um Índice de fluorescência que combina as intensidades de fluorescência das células tratadas com ambos os antifúngicos isoladamente e em associação.

Quanto à classificação das associações, obtida pela aplicação da fórmula do Índice de fluorescência, verificou-se que os efeitos sinérgico, aditivo, indiferente e antagonista variam de estirpe para estirpe, não existindo uma correlação entre os fármacos associados e a espécie em estudo. Estes resultados são indicativos de que é necessário avaliar o efeito dos fármacos associados para cada estirpe, sendo para isso necessário a existência de um método de avaliação rápido e prático, que possa ser aplicado na rotina laboratorial.

Os resultados obtidos no cálculo da proporção de concordância e valores de  $k$ , entre o *checkerboard* e a citometria de fluxo, para ambas as associações Ani/Anf B e Ani/Flu, sugerem que a citometria de fluxo representa uma excelente alternativa ao método de *checkerboard*, o que é também corroborado pelos valores da PC e  $k$  obtidos entre a CF e os ensaios de determinação de UFC.

Relativamente às medidas de validade, estas são indicativas de que a citometria de fluxo constitui uma ferramenta de elevada sensibilidade e especificidade para detecção de efeitos sinérgico e antagonista, em ambas as associações em estudo.

Simultaneamente, a citometria de fluxo é uma técnica simples e de rápida execução, que fornece resultados muito reprodutíveis e de fácil interpretação, num tempo máximo de 2 horas e que permite ainda inferir sobre o mecanismo de acção/resistência aos fármacos em estudo. Em contraste, o *checkerboard assay* mostrou-se impraticável na rotina laboratorial, por constituir um método muito trabalhoso e moroso (tempo mínimo de execução 24h), cujos resultados são de difícil interpretação.

Deste modo, encontra-se disponível um novo método para avaliação do efeito das associações entre antifúngicos, representando um importante avanço relativamente à metodologia clássica.



## 5. Perspectivas futuras

O aumento exponencial do número de doentes imunocomprometidos e em estado crítico, a medicina mais intervencionista e o recurso progressivamente maior à terapêutica antifúngica empírica, tem conduzido ao aumento do número de infecções fúngicas invasivas, com prognóstico reservado.

O protocolo citométrico desenvolvido poderá ter uma aplicação prática nos casos mais graves de IFIs, sendo uma mais-valia ao tratamento destas infecções por fornecer resultados válidos e em tempo útil. Pretende-se agora, aplicar este protocolo em casos clínicos onde se pondere a associação de antifúngicos no sentido de suportar tal opção clínica.

Tencionamos ainda alargar o estudo da associação de antifúngicos a outros fármacos e a outros microrganismos, nomeadamente ao estudo da associação anfotericina B e 5-fluorocitosina em *Cryptococcus* spp., agentes importantes de meningite e septicemia, particularmente em doentes imunocomprometidos pelo vírus da Sida.

## 6. Bibliografia

(2008). EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect* 14, 398-405.

Arendrup, M.C., Garcia-Effron, G., Lass-Flörl, C., Lopez, A.G., Rodriguez-Tudela, J.L., Cuenca-Estrella, M., and Perlin, D.S. (2010). Echinocandin susceptibility testing of *Candida* species: comparison of EUCAST EDef 7.1, CLSI M27-A3, Etest, disk diffusion, and agar dilution methods with RPMI and isosensitest media. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 426-439.

Arikan, S. (2007). Current status of antifungal susceptibility testing methods. *Med Mycol* 45, 569-587.

Baddley, J.W., and Pappas, P.G. (2005). Antifungal combination therapy: clinical potential. *Drugs* 65, 1461-1480.

Bal, A.M. (2010). The echinocandins: three useful choices or three too many? *Int J Antimicrob Agents* 35, 13-18.

Bergquist, P.L., Hardiman, E.M., Ferrari, B.C., and Winsley, T. (2009). Applications of flow cytometry in environmental microbiology and biotechnology. *Extremophiles* 13, 389-401.

Cameron, M.L., Schell, W.A., Bruch, S., Bartlett, J.A., Waskin, H.A., and Perfect, J.R. (1993). Correlation of in vitro fluconazole resistance of *Candida* isolates in relation to therapy and symptoms of individuals seropositive for human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother* 37, 2449-2453.

Casalnuovo, I.A., Di Francesco, P., and Garaci, E. (2004). Fluconazole resistance in *Candida albicans*: a review of mechanisms. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 8, 69-77.

Chamilos, G., and Kontoyiannis, D.P. (2006). The rationale of combination antifungal therapy in severely immunocompromised patients: empiricism versus evidence-based medicine. *Curr Opin Infect Dis* 19, 380-385.

Chaturvedi, V., Ramani, R., and Pfaller, M.A. (2004). Collaborative study of the NCCLS and flow cytometry methods for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 42, 2249-2251.

Clark, T.A., and Hajjeh, R.A. (2002). Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses. *Curr Opin Infect Dis* 15, 569-574.

CLSI (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A. A National Committee for Clinical Laboratory Standards.

Costa-de-Oliveira, S., Pina-Vaz, C., Mendonca, D., and Goncalves Rodrigues, A. (2008). A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27, 365-374.

Czechowska, K., Johnson, D.R., and van der Meer, J.R. (2008). Use of flow cytometric methods for single-cell analysis in environmental microbiology. *Curr Opin Microbiol* 11, 205-212.

Davey, H.M. (2002). Flow cytometric techniques for the detection of microorganisms. *Methods Cell Sci* 24, 91-97.

Diekema, D.J., Messer, S.A., Brueggemann, A.B., Coffman, S.L., Doern, G.V., Herwaldt, L.A., and Pfaller, M.A. (2002). Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. *J Clin Microbiol* 40, 1298-1302.

Erjavec, Z., Kluin-Nelemans, H., and Verweij, P.E. (2009). Trends in invasive fungal infections, with emphasis on invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* 15, 625-633.

Frade, J.P., Warnock, D.W., and Arthington-Skaggs, B.A. (2004). Rapid quantification of drug resistance gene expression in *Candida albicans* by reverse transcriptase LightCycler PCR and fluorescent probe hybridization. *J Clin Microbiol* 42, 2085-2093.

Ghannoum, M.A., and Rice, L.B. (1999). Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* 12, 501-517.

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., *et al.* (2004). Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J Clin Microbiol* 42, 1519-1527.

Jones, R.N., Castanheira, M., and Pfaller, M.A. (2010). Fixed-Ratio Combination Testing of an Echinocandin, Anidulafungin, and an Azole, Voriconazole, against 1,467 *Candida* Species Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 4041-4043.

Kanafani, Z.A., and Perfect, J.R. (2008). Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis* 46, 120-128.

Karlowsky JA, H.D., Zhanel GG, Goldstein BP. (2006). In vitro interactions of anidulafungin with azole antifungals, amphotericin B and 5-fluorocytosine against *Candida* species. *Int J Antimicrob Agents* 27(2), 174-177.

Kelly, S.L., Lamb, D.C., Kelly, D.E., Loeffler, J., and Einsele, H. (1996). Resistance to fluconazole and amphotericin in *Candida albicans* from AIDS patients. *Lancet* 348, 1523-1524.

Kelly, S.L., Lamb, D.C., Kelly, D.E., Manning, N.J., Loeffler, J., Hebart, H., Schumacher, U., and Einsele, H. (1997). Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol delta5,6-desaturation. *FEBS Lett* 400, 80-82.

Kiraz, N., Dag, I., Yamac, M., Kiremitci, A., Kasifoglu, N., and Akgun, Y. (2009). Antifungal activity of caspofungin in combination with amphotericin B against *Candida glabrata*: comparison of disk diffusion, Etest, and time-kill methods. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 788-790.

Kontoyiannis, D.P., and Lewis, R.E. (2003). Combination chemotherapy for invasive fungal infections: what laboratory and clinical studies tell us so far. *Drug Resist Updat* 6, 257-269.

Lass-Flörl, C. (2009). The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses* 52, 197-205.

Lass-Flörl, C., Perkhofer, S., and Mayr, A. (2010). In vitro susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods. *Mycoses* 53, 1-11.

Lee, W., and Kwak, Y. (1999). Antifungal susceptibility testing of *Candida* species by flow cytometry. *J Korean Med Sci* 14, 21-26.

Lewis, R.E., Diekema, D.J., Messer, S.A., Pfaller, M.A., and Klepser, M.E. (2002). Comparison of Etest, checkerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. *J Antimicrob Chemother* 49, 345-351.

Mukherjee, P.K., Sheehan, D.J., Hitchcock, C.A., and Ghannoum, M.A. (2005). Combination treatment of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 18, 163-194.

Munayyer, H.K., Mann, P.A., Chau, A.S., Yarosh-Tomaine, T., Greene, J.R., Hare, R.S., Heimark, L., Palermo, R.E., Loebenberg, D., and McNicholas, P.M. (2004). Posaconazole is a potent inhibitor of sterol 14 $\alpha$ -demethylation in yeasts and molds. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 3690-3696.

Nishi, I., Sunada, A., Toyokawa, M., Asari, S., and Iwatani, Y. (2009). In vitro antifungal combination effects of micafungin with fluconazole, voriconazole, amphotericin B, and flucytosine against clinical isolates of *Candida* species. *J Infect Chemother* 15, 1-5.

Odds, F.C. (1987). *Candida* infections: an overview. *Crit Rev Microbiol* 15, 1-5.

Odds, F.C., Brown, A.J., and Gow, N.A. (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* 11, 272-279.

Oliveira, E.R., Fothergill, A.W., Kirkpatrick, W.R., Coco, B.J., Patterson, T.F., and Redding, S.W. (2005). In vitro interaction of posaconazole and caspofungin against clinical isolates of *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 3544-3545.

Ostrosky-Zeichner, L., Marr, K.A., Rex, J.H., and Cohen, S.H. (2003). Amphotericin B: time for a new "gold standard". *Clin Infect Dis* 37, 415-425.

Perlin, D.S. (2007). Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist Updat* 10, 121-130.

Pfaller, M.A., and Diekema, D.J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 20, 133-163.

Pfaller, M.A., Boyken, L., Hollis, R.J., Kroeger, J., Messer, S.A., Tendolkar, S., and Diekema, D.J. (2008). In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. *J Clin Microbiol* 46, 150-156.

Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Procop, G.W., and Rinaldi, M.G. (2007). Multicenter comparison of the VITEK 2 antifungal susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing amphotericin B, flucytosine, and voriconazole against *Candida* spp. *J Clin Microbiol* 45, 3522-3528.

Pina-Vaz C, R.A. (2010). Evaluation of Antifungal Susceptibility Using Flow Cytometry Methods *Mol Biol* 9, 638:281.

Pina-Vaz, C., Costa-de-Oliveira, S., Rodrigues, A.G., and Espinel-Ingroff, A. (2005). Comparison of two probes for testing susceptibilities of pathogenic yeasts to voriconazole, itraconazole, and caspofungin by flow cytometry. *J Clin Microbiol* 43, 4674-4679.

Pina-Vaz, C., Sansonetty, F., Rodrigues, A.G., Costa-de-Oliveira, S., Martinez-de-Oliveira, J., and Fonseca, A.F. (2001a). Susceptibility to fluconazole of *Candida* clinical isolates determined by FUN-1 staining with flow cytometry and epifluorescence microscopy. *J Med Microbiol* 50, 375-382.

Pina-Vaz, C., Sansonetty, F., Rodrigues, A.G., Costa-Oliveira, S., Tavares, C., and Martinez-de-Oliveira, J. (2001b). Cytometric approach for a rapid evaluation of susceptibility of *Candida* strains to antifungals. *Clin Microbiol Infect* 7, 609-618.

Pina-Vaz, C., Sansonetty, F., Rodrigues, A.G., Costa-Oliveira, S., Tavares, C., and Martinez-de-Oliveira, J. (2001). Cytometric approach for a rapid evaluation of susceptibility of *Candida* strains to antifungals. *Clin Microbiol Infect* 7, 609-618.

Pound, M.W., Townsend, M.L., and Drew, R.H. (2010). Echinocandin pharmacodynamics: review and clinical implications. *J Antimicrob Chemother* 65, 1108-1118.

Ramani, R., Ramani, A., and Wong, S.J. (1997). Rapid flow cytometric susceptibility testing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 35, 2320-2324.

Ramani, R., Ramani, A., and Wong, S.J. (1997). Rapid flow cytometric susceptibility testing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 35, 2320-2324.

Rex, J.H., Pfaller, M.A., Walsh, T.J., Chaturvedi, V., Espinel-Ingroff, A., Ghannoum, M.A., Gosey, L.L., Odds, F.C., Rinaldi, M.G., Sheehan, D.J., *et al.* (2001). Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev* 14, 643-658, table of contents.

- Richardson, M.D. (2005). Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *J Antimicrob Chemother* *56 Suppl 1*, i5-i11.
- Rodriguez, M.M., Ruiz, M., Pastor, F.J., Quindos, G., Carrillo, A., and Guarro, J. (2007). In vitro interaction of micafungin and fluconazole against *Candida*. *J Antimicrob Chemother* *60*, 188-190.
- Rudensky, B., Broidie, E., Yinnon, A.M., Weitzman, T., Paz, E., Keller, N., and Raveh, D. (2005). Rapid flow-cytometric susceptibility testing of *Candida* species. *J Antimicrob Chemother* *55*, 106-109.
- Sabatelli, F., Patel, R., Mann, P.A., Mendrick, C.A., Norris, C.C., Hare, R., Loebenberg, D., Black, T.A., and McNicholas, P.M. (2006). In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* *50*, 2009-2015.
- Sabin, P.a. (2002). *Medical Statistics at a glance*. Blackwell Science.
- Sanglard, D., and Odds, F.C. (2002). Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* *2*, 73-85.
- Sanglard, D., Ischer, F., Parkinson, T., Falconer, D., and Bille, J. (2003). *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* *47*, 2404-2412.
- Sanglard, D., Kuchler, K., Ischer, F., Pagani, J.L., Monod, M., and Bille, J. (1995). Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother* *39*, 2378-2386.
- Serena, C., Marine, M., Quindos, G., Carrillo, A.J., Cano, J.F., Pastor, F.J., and Guarro, J. (2008). In vitro interactions of micafungin with amphotericin B against clinical isolates of *Candida* spp. *Antimicrob Agents Chemother* *52*, 1529-1532.
- Shao, P.L., Huang, L.M., and Hsueh, P.R. (2007). Recent advances and challenges in the treatment of invasive fungal infections. *Int J Antimicrob Agents* *30*, 487-495.
- Sheehan, D.J., Hitchcock, C.A., and Sibley, C.M. (1999). Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev* *12*, 40-79.
- Tortorano, A.M., Kibbler, C., Peman, J., Bernhardt, H., Klingspor, L., and Grillot, R. (2006). *Candidaemia* in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents* *27*, 359-366.
- Vanden Bossche, H., Warnock, D.W., Dupont, B., Kerridge, D., Sen Gupta, S., Improvisi, L., Marichal, P., Odds, F.C., Provost, F., and Ronin, O. (1994). Mechanisms and clinical impact of antifungal drug resistance. *J Med Vet Mycol* *32 Suppl 1*, 189-202.
- Walker, L.A., Gow, N.A., and Munro, C.A. (2010). Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genet Biol* *47*, 117-126.

Walsh, T.J., Pappas, P., Winston, D.J., Lazarus, H.M., Petersen, F., Raffalli, J., Yanovich, S., Stiff, P., Greenberg, R., Donowitz, G., *et al.* (2002). Voriconazole compared with liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with neutropenia and persistent fever. *N Engl J Med* 346, 225-234.

White, R.L., Burgess, D.S., Manduru, M., and Bosso, J.A. (1996). Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 1914-1918.

Wingard, J.R., and Leather, H. (2004). A new era of antifungal therapy. *Biol Blood Marrow Transplant* 10, 73-90.