

RICARDO ANDREOTTI SIQUEIRA

**Resistência às equinocandinas em
pacientes com candidemia persistente**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo, para obtenção do Título
de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

RICARDO ANDREOTTI SIQUEIRA

**Resistência às equinocandinas em
pacientes com candidemia persistente**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, Departamento de Medicina – Programa de medicina translacional, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo

Co-orientador: Dr. Fernando César Bizerra

São Paulo
2013

Siqueira, Ricardo Andreotti

Resistência às equinocandinas em pacientes com candidemia persistente. Ricardo Andreotti Siqueira – São Paulo, 2013.

xvi 98f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Medicina Translacional.

Título em inglês: *Resistance to echinocandins in patients with persistent candidaemia.*

1. Candidemia persistente. 2. Equinocandinas 3. Susceptibilidade. 4. Mecanismos de resistência. 5. Antifúngicos.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

Chefe do Departamento de Medicina:
Prof. Dr. Álvaro Nagib Atallah

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em medicina translacional:
Profa. Dra. Dulce Elena Casarini

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório Especial de Micologia, da Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina. Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP número 196899).

Dedico este trabalho às pessoas mais importante de minha vida....

*Aos meus pais Marco e Rosângela, a quem simplesmente devo tudo
que conquistei na vida, obrigado por estarem sempre presentes e
serem meus alicerces nessa jornada.*

Amo vocês!

Agradecimentos

À minha família, meu pai Marco Antônio Siqueira Machado, minha mãe Rosângela Elídia Andreotti Siqueira, meus irmãos Cristiane Vivian Andreotti Siqueira e Eduardo Andreotti Siqueira, por toda dedicação, apoio e amor incondicional.

Aos meus cunhados Paulo e Nívia, obrigado por sempre estarem presentes e dispostos a me socorrer em qualquer momento.

Ao querido Bruno Andreotti (in memoriam), o principal responsável pelo início da minha trajetória na UNIFESP. Obrigado pelos momentos que passamos juntos, sei que um dia iremos nos encontrar novamente e nos divertir muito ainda!!! Eternamente em meu coração!!!!

À minha madrinha (segunda mãe) Rosana Andreotti, por sempre, mas sempre, sempre mesmo demonstrar um carinho imenso, se dedicar e cuidar de mim como um filho.

À minha grande amiga Ana Carol, mais conhecida como grande amor da minha vida (hehe), obrigado por estar sempre do meu lado me livrando das enrascadas e por principalmente dividir comigo nossos sonhos. Amo tudo em você!!!

Ao meu ilustre chefe, professor Arnaldo Colombo. Para mim é uma honra e orgulho tê-lo como orientador por mais de seis anos, desde a minha primeira iniciação científica. Não esqueço seus eternos ensinamentos e sua inestimável confiança. Obrigado pela diligência! Meus respeitosos agradecimentos.

Ao meu co-orientador Fernando César Bizerra, além de um profissional brilhante é uma pessoa com um caráter ímpar, obrigado por aceitar a trilhar este caminho comigo!!!

À minha eterna amiga Sarah, que desde o primeiro dia se fez presente em minha vida, demonstrando ser uma pessoa especial que guardarei para sempre em meu coração!!!

Às Marias (1, 2 e 3), obrigado pelos momentos alegres todas as manhãs, com toda certeza serviram de combustível para o dia a dia.

À minha querida amiga Vivi, sua sinceridade e lealdade me admiram muito. Obrigado por me ouvir e me aconselhar nos momentos mais tensos, Adoro você!!!

A todos os colegas do LEMI: Aline, Ângela, Analy, Carol Padovan, Clara, Danielzinho, Elaine, Gianina, Hemílio, Karina, Mariane, Marcel, Priscilla, Toti, Vinícius, Jorge e Wendy, valeu pelos belos momentos que passamos juntos!!!!

*A todos da velha geração do LEMI: Edméa, Lílica, Débora, Leila, Patrício e Da
Matta, por me ensinarem muito do que sei sobre micologia e amizade.*

*A todos os colegas do Central: Dra. Antônia, Vivian, Cynthia, Thomas, Clarice,
Mirela, Fernandinho, Vivi, Laíde, Erivan, Elzinha, Adriano, Katiane, Eliete,
Lurdinha, Elza, agradeço pela convivência maravilhosa e pelas manhãs divertidas que
passamos juntos, juro que fui surpreendido por tanto carinho comigo!!!*

*A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para minha formação e me
ajudaram a vencer mais uma etapa em minha vida!!!!*

Muito obrigado!!!

“Nunca olhe para trás e lamente o passado por não existir mais e não fique tão aflito com o futuro que esta por vir, viva o presente e torne tão bonito que valerá a pena ser lembrado”

Ida Taylor Scott

Sumário

Dedicatória.....	v
Agradecimentos.....	vi
Lista de abreviaturas e símbolos	xii
Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Tabelas.....	xiv
Lista de Quadros.....	xv
Resumo.....	xvi
Abstract	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Infecções de corrente sanguínea (ICS) por <i>Candida</i> spp.: impacto em saúde pública.....	2
1.2. Candidemia persistente.....	5
1.2.1. Conceito e implicação clínica.....	5
1.2.2. Condições predisponentes.....	7
1.3. Equinocandinas e seu uso no tratamento da candidemia.....	10
1.3.1. Classe terapêutica.....	10
1.3.2. Mecanismo de ação.....	12
1.3.3. Mecanismo de resistência.....	13
1.3.3.1. Epidemiologia da resistência às equinocandinas.....	15
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Seleção de casos de candidemia persistente.....	21
3.2. Seleção de amostras de <i>Candida</i> spp. de pacientes com candidemia persistente.....	23
3.3. Identificação dos microrganismos selecionados.....	23
3.3.1. Verificação da viabilidade e pureza das leveduras.....	23
3.3.2. Identificação dos microrganismos através da amplificação e sequenciamento da região ITS do rDNA.....	23
3.3.2.1. Extração do DNA genômico das leveduras.....	25
3.3.2.2. Tratamento do DNA com RNase A.....	26
3.3.2.3. Quantificação do DNA.....	26
3.3.2.4. Amplificação da região ITS do rDNA.....	27
3.3.2.5. Eletroforese e purificação dos produtos da PCR.....	27
3.3.2.6. Sequenciamento da região ITS do rDNA.....	28
3.3.2.7. Montagem e análise dos contigs.....	29
3.4. Teste de susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antifúngicos.....	31
3.4.1. Leitura e interpretação dos resultados de microdiluição em caldo.....	32
3.5. Análise dos mecanismos de resistência às equinocandinas expressos por isolados de <i>Candida</i> spp.....	33
3.5.1. Análise de mutações nas regiões HS1 e HS2 do gene <i>FKS1</i>	34
3.5.2. Análise do perfil de mutação nas regiões que flanqueiam as regiões HS1 e HS2 do gene <i>FKS1</i>	35
4. RESULTADOS	36
4.1. Identificação dos microrganismos selecionados.....	37
4.1.1. Seleção dos pacientes com candidemia.....	37
4.1.2. Seleção, viabilidade e pureza das amostras.....	37
4.1.3. Identificação dos microrganismos através da amplificação e sequenciamento da região	40

ITS do rDNA.....	43
4.2. Teste de susceptibilidade <i>in vitro</i> de <i>Candida</i> spp. aos antifúngicos.....	47
4.3. Análises do mecanismos de resistência às equinocandinas expressos por isolados de <i>Candida</i> spp.....	47
4.3.1. Análise de mutações nas regiões HS1 e HS2 do gene <i>FKS1</i>	51
4.3.2. Análise do perfil de mutação nas regiões que flanqueiam HS1 e HS2 do gene <i>FKS1</i>	56
<u>5. DISCUSSÃO.....</u>	<u>66</u>
<u>6. CONCLUSÕES E COMENTÁRIOS.....</u>	<u>69</u>
<u>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u>	<u>69</u>

Lista de abreviaturas e símbolos

cm: Centímetro	ng/μL: Nanograma por microlitro
DNA: Ácido desoxirribonucléico	pmol: Picomol
dNTP: Desoxinucleosídeo	P: Probabilidade de um evento ocorrer ao acaso
ddNTP: Didesoxirribonucleosídeo trifosfatado	pb: pares de bases
os	pH: Potencial hidrogeniônico
DO: Densidade óptica	q.s.p: Quantidade suficiente para
EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético	®: marca registrada.
<i>et al</i> : Colaboradores	rDNA: Ácido desoxirribonucléico ribossomal
g: Gramas	RNA: Ácido ribonucleico
HCl: Ácido clorídrico	RNAse: Ribonuclease
Kb: Kilobases	rpm: rotações por minuto
M: Molar	TAE: Tris/acetato/EDTA
mA: mili Amperagem	TBE: Tris/borato/EDTA
mm: milímetro	Volts: unidade de corrente elétrica
mM: Milimolar	X: Vezes
μg/mL: micrograma por mililitro.	x: Versus
mg: Miligrama	%: Por cento
mg/mL: Miligrama por mililitro	=: igual
mg/L: Miligrama por litro	°C: Graus <i>Celsius</i>
μL: Microlitro	>: Maior
mL: Mililitro	<: Menor
MOPS: morpholino <i>propanesulfonic acid</i>	≥: Maior ou igual
NaCl: Cloreto de sódio	≤: Menor ou igual
NaOH: Hidróxido de sódio	
ng: Nanograma	

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura química molecular da caspofungina, micafungina e anidulafungina.....	11
Figura 2. Fluxograma de trabalho seguido durante o desenvolvimento deste estudo.....	22
Figura 3. Esquema do gene <i>FKS1</i>	34

Lista de Tabelas

Tabela 1. Porção do gene <i>FKS1</i> correspondente às regiões HS1 e HS2.....	15
Tabela 2. Amostras de <i>Candida</i> spp. utilizadas no presente estudo.....	24
Tabela 3. Listagem de todos os oligonucleotídeos utilizados neste estudo.....	30
Tabela 4. Valores de ponto de corte sugeridos para interpretação dos testes de susceptibilidade de <i>Candida</i> spp.....	33
Tabela 5. Variáveis clínicas dos pacientes incluídos no presente estudo.....	38
Tabela 6. Identificações fenotípica e molecular obtidas para os 53 isolados de <i>Candida</i> spp. utilizadas no presente estudo.....	41
Tabela 7. Padrão de susceptibilidade dos isolados de <i>Candida</i> aos quatro antifúngicos testados.....	45
Tabela 8. Sequências nucleotídica e de aminoácido correspondentes às regiões HS1 e HS2 do gene <i>FKS1</i> de <i>Candida</i> spp.....	48
Tabela 9. Mutações detectadas em regiões próximas aos HS1 e HS2 do gene <i>FKS1</i> de <i>Candida</i> spp.....	54

Lista de Quadros

Quadro 1. Fatores de risco associados ao desenvolvimento de candidemia.....	3
Quadro 2. Sugestões de condições associadas, condutas laboratoriais e terapêuticas em casos de candidemia persistente.....	10

Resumo

Candidemia persistente tem sido descrita como uma complicação do quadro de candidemia, caracterizada pelo isolamento de *Candida* spp. em amostras sequenciais de hemocultura após o diagnóstico inicial, mesmo em pacientes expostos ao tratamento antifúngico adequado. Embora fatores predisponentes relacionados ao hospedeiro já estejam bem estabelecidos, poucos estudos têm analisado os atributos do patógeno envolvidos no desenvolvimento dessa complicação. O objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência de resistência às equinocandinas em isolados de *Candida* spp. provenientes de pacientes com candidemia persistente submetidos a terapia antifúngica com esta classe de fármaco. As amostras foram identificadas através de sequenciamento da região ITS do rDNA. O perfil de susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos foi realizado utilizando metodologia de microdiluição em caldo (CLSI, documento M27-S4). Além disso, nós avaliamos a ocorrência de resistência a partir do sequenciamento do gene *FKS1*. Dentre 436 pacientes com candidemia, 63 (14,4%) apresentaram quadros de candidemia persistente, desses, 13 atenderam aos critérios de inclusão estabelecidos no presente estudo. Através das identificações fenotípica e molecular, foi observado 5 dos 13 pacientes (38,5%) foram infectados por isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*), 3 (23%) por isolados de *C. albicans*, 2 (15,4%) por isolados de *C. krusei*, 1 (7,7%) por isolado de *C. tropicalis* e 1 (7,7%) teve como agente etiológico da candidemia isolados de *C. orthopsilosis*. Além disso, um paciente (7,7%) apresentou episódio de infecção mista com alternância de isolamento de duas diferentes espécies, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (*sensu stricto*). Em relação ao perfil de susceptibilidade aos antifúngicos, a grande maioria dos isolados foi classificada como sensível a todos os antifúngicos testados, com exceção dos cinco isolados de *C. krusei* provenientes dos pacientes 2 (dois isolados) e 10 (três isolados), os quais apresentaram resistência ao fluconazol e à caspofungina, sendo que dois deles foram intermediários à anidulafungina. Não foi verificado aumento de valores de CIM entre os isolados sequenciais de um mesmo paciente a despeito do tratamento antifúngico utilizado. Nenhum dos isolados apresentou mutação nas regiões dos HS1 e HS2 do gene *FKS1*, sendo classificados como selvagens em relação aos genótipos de resistência já descritos. Por outro lado, os isolados de *C. krusei* apresentaram mutação não sinônima em região muito próxima ao HS1, o que poderia, ao menos em parte, explicar o desfecho clínico negativo durante tratamento com equinocandinas e os elevados valores de CIM observados para estes isolados. Os dados obtidos no presente estudo mostram que a ocorrência de resistência às equinocandinas ainda permanece rara em nosso meio, mesmo quando analisada em coorte de pacientes com risco elevado à ocorrência de tal fenômeno. Por fim, conclui-se que as características clínicas do paciente parecem ter maior relevância que os mecanismos de resistência às equinocandinas no que se refere à ocorrência de candidemia persistente.

Palavras chave: *Candida*, candidemia, persistência, resistência, antifúngicos, equinocandinas.

Abstract

Persistent candidemia refers to the continued isolation of the same *Candida* species in the blood of a candidemic patient despite appropriate therapy. Although a number of studies have described host risk factors which predispose to development of persistent candidemia, none have specifically identified the properties of the pathogen associated with the development of this complication. The aim of this study was to investigate the occurrence of echinocandin resistance in *Candida* spp. isolated from patients with persistent candidemia who received echinocandin at some point during the treatment. Microorganisms were identified to the species level by sequencing of the *ITS* region. Antifungal susceptibilities profile of strains was performed using the CLSI broth microdilution method. In addition, in order to investigate the echinocandin resistance, we assessed the presence of *FKS* mutations. Among 436 patients with candidemia, 63 (14.4%) developed a persistent candidemia and 13 of them were included in this study. Five patients (38.5%) were infected with *C. parapsilosis* (*sensu stricto*), three (23%) with *C. albicans*, two (15.4%) with *C. krusei*, one (7.7%) with *C. tropicalis* and one (7.7%) with *C. orthopsilosis*. Moreover, one (7.7%) patient have mixed infection due to *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* (*sensu stricto*). Most isolates were susceptible to all the antifungal drugs, with the exception of five *C. krusei* isolates recovered from patient 2 (two isolates) and patient 10 (three isolates). These isolates were resistant to fluconazole and caspofungin and two of them were intermediate to anidulafungin. No increase was observed in MIC values between sequential isolates from the same patient despite antifungal treatment. No mutations were detected in *FKS1* of either hot spot1 or hotspot2. On the other hand, *C. krusei* isolates showed nucleotide and amino acid differences near HS1 region. This may explain, at least in part, the negative clinical outcome during treatment with echinocandins as well as the high MIC values against these drugs. Our findings suggest that echinocandin resistance in *Candida* spp. is still uncommon, even when evaluated in a cohort of patients with high risk of the occurrence of this phenomenon. Finally, the clinical features of the patient seem to have more relevance than the mechanisms of resistance to echinocandins concerning the occurrence of persistent candidemia.

Keywords: *Candida*, candidemia, persistent, resistance, antifungals, echinocandins.

1.0. INTRODUÇÃO

1.1 Infecções de corrente sanguínea (ICS) por *Candida* spp.: impacto em saúde pública.

Entre os agentes oportunistas, os fungos são aqueles que apresentam maior distribuição na natureza. Estão presentes no ar, nas superfícies inanimadas de hospitais e dos domicílios, nas plantas, no solo, na água, nos alimentos e nos animais domésticos (**Fisher et al. 2012**).

Geralmente são encontrados como colonizantes da pele, mucosas do trato gastrointestinal e também do trato respiratório superior no hospedeiro humano (**Calderone, 2009**). Durante a transição da forma colonizante para infecciosa, os fungos oportunistas requerem alterações nas barreiras anatômicas e presença de alguma disfunção imunológica do hospedeiro para o estabelecimento de infecções fúngicas invasivas (IFIs). Sendo assim, pacientes submetidos a procedimentos médicos invasivos e/ou imunocomprometidos apresentam risco mais elevado para o desenvolvimento das IFIs (**Pfaller and Diekema, 2007; Warnock et al. 2007; Fisher et al. 2012**).

Entre os fungos oportunistas, *Candida* spp. é o agente mais comum de IFIs em pacientes hospitalizados, responsável por quadros infecciosos que vão desde doenças mucocutâneas e infecções oro-esofágicas até quadros de infecção urinária, peritonite e candidíase hematogênica (**Calderone, 2009; Evans, 2010; Giri and Kindo, 2012; Sardi et al. 2013**).

As infecções da corrente sanguínea (ICS) causadas por *Candida* spp. (candidemias) têm se tornado importante problema de saúde pública em hospitais terciários de todo o mundo. Apesar dos avanços dos métodos diagnósticos e da disponibilidade de novas alternativas terapêuticas para tratamento dessas infecções, a mortalidade por candidemia tem-se mantido alta, da ordem de 50% (**Eggimann et al. 2003; Morgan et al. 2005; Colombo et al. 2008; Sardi et al. 2013**).

Os fatores de risco associados à candidemia estão bem estabelecidos e não apresentaram grandes mudanças desde os anos 80 (**Pfaller and Diekema, 2007**). Com base em estudos caso-controle foram determinados fatores de risco independentes para desenvolvimento de ICS por *Candida* spp., o que

inclui antibioticoterapia de amplo espectro, colonização por *Candida* spp., uso de cateteres vasculares, especialmente cateter venoso em posição central (CVC), nutrição parenteral total, neutropenia, cirurgias de grande porte, insuficiência renal e hemodiálise (**Brito et al. 2006; Colombo et al. 2008; Kett et al. 2011**). O Quadro 1 apresenta alguns dos principais fatores de risco e seu possível papel na patogênese da ICS por *Candida* spp.

Quadro 1. Fatores de risco associados ao desenvolvimento de candidemia.

Fatores de Risco	Possível Papel na Patogênese da ICS por <i>Candida</i> spp.
Antibioticoterapia	Favorece a colonização fúngica
Quimioterapia	Imunossupressão e injúria em mucosas
Colonização prévia	Translocação através de mucosa
Supressão do ácido gástrico	Colonização e translocação através de mucosa
Nutrição parenteral total	Acesso vascular direto e contaminação da solução infundida
Neutropenia	Imunossupressão
Cateter venoso em posição central (CVC)	Contaminação do dispositivo e acesso vascular direto

Fonte: Pfaller and Diekema (2007) com modificações.
ICS: Infecção por corrente sanguínea.

As ICS por *Candida* spp. representam a quarta causa mais frequente de infecções nosocomiais nos Estados Unidos (EUA), respondendo por cerca de 10% de todas as infecções deste sítio (**Wisplinghoff et al. 2004**). Estudos têm mostrado que as taxas de incidência de candidemia variam substancialmente nas diferentes regiões geográficas do globo, sendo que em hospitais na América Latina e Ásia, encontram-se as maiores taxas de incidência do mundo (**Nishikaku et al. 2010; Sardi et al. 2013**).

Em estudo conduzido por Nucci e colaboradores (2013), realizado no período de novembro de 2008 a outubro de 2010, em 21 hospitais terciários de sete países da América Latina, foram reportados 672 episódios de candidemia, com taxa de incidência de 1,19 casos por 1.000 admissões hospitalares. Esta taxa é superior àquelas registradas no Hemisfério Norte (**Poikonen et al. 2003; Wisplinghoff et al. 2004; Hajjeh et al. 2004**), porém menor quando comparada com estudos brasileiros. De fato, estudos recentes têm mostrado que as taxas

de incidência de candidemia no Brasil têm variado de 1,35 a 6,0 casos por 1.000 admissões hospitalares (**Pereira et al. 2010; Colombo et al. 2013a; Moretti et al. 2013**). Estes estudos deixam claro que fungemia por *Candida* spp. é um problema significativo de saúde pública no nosso meio.

Dentre as mais de 200 espécies de *Candida* conhecidas, aproximadamente 17 delas têm sido isoladas de infecções humanas. No entanto, diversos estudos têm mostrado que mais de 90% dos casos de candidemia são atribuídos a apenas cinco espécies: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* (**Calderone, 2009**). Todos esses patógenos podem apresentar manifestações clínicas semelhantes, contudo, há peculiaridades nas infecções causadas pelas diferentes espécies de *Candida*, principalmente no que se refere à fonte de infecção, fatores de risco, história natural e susceptibilidade aos antifúngicos (**Pfaller and Dikema, 2007; Nishikaku et al. 2010; Nucci et al. 2013**).

A distribuição das espécies de *Candida* envolvidas em ICS apresenta variações geográficas importantes. Embora *C. albicans* seja a espécie mais frequentemente isolada de pacientes com candidemia no mundo todo, é possível observar aumento substancial de casos de infecções por espécies de *Candida* não-*C. albicans* (**Pfaller et al. 2010; Colombo et al. 2013a; Nucci et al. 2013**). Na América Latina e em determinados países europeus, como Espanha e Itália, *C. parapsilosis* é a espécie de *Candida* não-*C. albicans* mais frequentemente associada às infecções invasivas (**Basetti et al. 2011; Canton et al. 2011; Colombo et al. 2013a; Nucci et al. 2013**). Por outro lado, nos EUA e outros países da Europa (Bélgica, Alemanha, Dinamarca, Escócia, Noruega) *C. glabrata* representa a maior causa de ICS por *Candida* não-*C. albicans* (**Horn et al. 2009; Nishikaku, et al. 2010; Das et al. 2011**). Vale mencionar que estudos recentes, envolvendo casos de fungemia documentados em centros médicos do Brasil, apontam para aumento de isolamento de *C. glabrata* em episódios de candidemia em nossos hospitais (**Colombo et al. 2013b; Moretti et al. 2013**).

Ainda não estão bem estabelecidas as razões pelas quais as taxas de incidência de candidemia em hospitais brasileiros são maiores do que aquelas

observadas nos EUA e na Europa. Da mesma forma, ainda permanece incerto as reais causas das diferenças geográficas observadas nas taxas de prevalência de espécies de *Candida* spp. associadas à fungemia. De maneira geral, essas diferenças parecem estar associadas a uma complexa combinação de variáveis, o que inclui: condições ambientais e socioeconômicas; adoção de terapia antifúngica empírica e profilática em pacientes com alto risco para candidemia; dificuldades de implementação de programas de controle de infecção hospitalar; e, diferenças nos recursos disponíveis para o tratamento (**Pfaller and Dikema, 2007; Nucci et al. 2010b; Nishikaku et al. 2010**).

Vale destacar que a pressão seletiva exercida pelo uso de antifúngicos parece ser um dos principais fatores associados com as diferenças epidemiológicas, principalmente no que se refere ao aumento de infecções causadas por isolados e/ou espécies resistentes (**Lortholary et al. 2011**). Neste cenário, diversos estudos têm mostrado que o aumento do uso do fluconazol está associado a altas taxas de incidência de infecções por *C. glabrata* e *C. krusei*; quadros de neutropenia estão associados com infecções por *C. tropicalis*; e, infecções por *C. parapsilosis* estão associadas ao uso de CVC e de nutrição parenteral (**Pfaller and Dikema, 2007; Nishikaku et al. 2010; Lortholary et al. 2011**).

1.2. Candidemia persistente.

1.2.1. Conceito e implicação clínica.

Entre as complicações associadas aos casos de candidemia está incluída a candidemia persistente, caracterizada pelo isolamento de *Candida*spp. em amostras sequenciais de hemocultura após o diagnóstico inicial, mesmo em pacientes expostos ao tratamento antifúngico adequado (**Clancy et al., 2006; Nucci, 2011**). Importante deixar claro que apesar de endocardite por *Candida* constituir causa frequente de persistência da hemocultura positiva há um número substancial de pacientes que evoluem com candidemia persistente sem ter endocardite (**Nucci, 2011**). Neste contexto, quatro principais aspectos devem ser considerados: i) o isolamento da mesma espécie de *Candida* em

hemoculturas seriadas; ii) o intervalo de tempo entre as coletas das hemoculturas positivas; iii) a exposição a terapia antifúngica adotada; e, iv) tempo mínimo de tratamento.

Todavia, ainda não há na literatura científica um consenso acerca da definição de critérios objetivos que permitam identificar os casos de persistência da ICS por *Candida* spp. (Nucci, 2011). Aparentemente, a principal divergência entre os estudos está relacionada à definição do período de tempo entre a primeira hemocultura positiva e os isolamentos subsequentes para que seja diagnosticado o quadro de candidemia persistente. Dessa forma, a falta de padronização desses critérios tem prejudicado a avaliação da incidência e do impacto clínico dessa complicação.

Ainda assim, alguns estudos clínico-epidemiológicos relacionados à candidemia têm englobado, entre os dados clínicos analisados, a avaliação de persistência da ICS por *Candida* spp. Em estudo retrospectivo conduzido por Luzzati e colaboradores (2005) foram analisados 370 episódios de candidemia. Neste estudo, foi definido como candidemia persistente o isolamento da mesma espécie de *Candida* por dois ou mais dias consecutivos. Nesta casuística, 59% dos casos foram caracterizados como persistência da infecção.

Em estudo clínico sobre a eficácia da micafungina e da anfotericina B lipossomal durante o tratamento de candidemia, Kuse e colaboradores (2007) observaram que, nos dois grupos de tratamento, 9% dos casos caracterizavam-se como candidemia persistente. Em 2009, Betts e colaboradores realizaram estudo prospectivo de 197 casos de candidemia (102 tratados com 50mg/dia e 95 tratados com 150mg/dia de caspofungina). Neste estudo, quadros de candidemia persistente foram observados em 12% e 3% dos pacientes pertencentes aos primeiro e segundo grupos, respectivamente. Todavia, em ambos estudos, os autores não deixam claro quais os critérios utilizados para identificar os casos de candidemia persistente.

Em outros estudos epidemiológicos, nos quais candidemia persistente foi definida como a positividade da hemocultura até o final do tratamento, foi observado que 9% a 15% dos pacientes com candidemia desenvolveram

infecções persistentes (**Pappas et al. 2007; Queiroz-Telles et al. 2008**). Por outro lado, em estudo que considerou como candidemia persistente o isolamento da mesma espécie de *Candida* após 48 horas da primeira hemocultura positiva, a persistência da infecção foi observada em 45% dos pacientes com candidemia (**Park et al. 2007**).

Em relação à incidência de candidemia persistente no mundo, em 2011 Nucci conduziu revisão sistemática da literatura e avaliou 22 estudos clínico-epidemiológicos de pacientes acometidos por ICS por *Candida* spp. De forma geral, o autor verificou que entre 8 e 15% dos casos de candidemia, os pacientes apresentaram quadros de persistência desta infecção. Entretanto, conforme já mencionado, a falta de critérios homogêneos para classificação dos casos de candidemia persistente, torna difícil a comparação entre os estudos.

Em relação à mortalidade, ainda não está claro o impacto desse fenômeno no desfecho clínico do paciente. No entanto, há um senso comum que a ausência do clareamento da hemocultura sugere má resposta à estratégia terapêutica podendo acarretar em maiores possibilidades de complicações clínicas (**Nucci, 2011**).

1.2.2. Condições predisponentes.

Várias condições predisponentes têm sido atribuídas ao desenvolvimento da persistência da infecção hematogênica por *Candida* spp. em pacientes não portadores de endocardite. De forma geral, já está bem estabelecido que as maiores taxas de persistência são observadas em pacientes neonatos, particularmente prematuros. Nesta população, quando comparada com pacientes adultos, são registradas as maiores proporções de infecções invasivas, a exemplo de osteomelite, endoftalmite e bola fúngica renal (**Hammoud et al. 2013**).

Robinson et al. (2011) avaliaram os casos de ICS por *Candida* em UTI neonatal do hospital escola de Wichita, Kansas, EUA, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2010. Nesta casuística, foi observada elevada incidência de candidemia persistente em neonatos (24%, n=9), sendo persistência

definida como a positivação da hemocultura após 5 dias do primeiro isolamento. Os autores verificaram ainda que o atraso do início da terapia antifúngica, ou seja, após as primeiras 24 h do diagnóstico da candidemia, aumenta substancialmente as chances do desenvolvimento de candidemia persistente, embora não tenha sido observada associação com aumento de mortalidade. Ainda neste estudo, verificou-se que variáveis como o peso no momento do nascimento, a idade gestacional, a idade no momento da infecção, hiperalimentação, nutrição parenteral, presença de CVC, escolha da terapia antifúngica inicial e uso de antibióticos antes do momento da infecção não apresentaram correlação estatisticamente significativa com a mortalidade de pacientes com candidemia persistente.

Outro importante aspecto no que se refere aos fatores predisponentes para a persistência da candidemia está relacionado à presença de patologias ou dispositivos médicos que possibilitem a persistência do foco infeccioso.

A presença de CVC ou outros dispositivos médicos tem sido descrita com um dos mais importantes fatores de risco para persistência da infecção, devido, principalmente, à possibilidade de formação de biofilme neste dispositivo (**Rex et al. 1995; Luzzati et al. 2000; Nucci et al. 2010a**). Considerando que as células de leveduras organizadas em biofilme podem apresentar resistência aos antifúngicos e ao sistema imune do hospedeiro, sua presença pode representar fonte permanente do patógeno (**Bizerra et al. 2008; Melo et al. 2011**). Nos casos de contaminação do CVC, a melhor alternativa parece ser a remoção e/ou substituição do dispositivo, o que nem sempre é possível dependendo da gravidade do paciente. Alguns estudos demonstraram que a remoção precoce do CVC pode facilitar o tratamento e contribuir para eliminação do foco da infecção (**Rex et al. 1995; Luzzati et al. 2000; Nucci et al. 2010a**).

Apesar de poucos relatos, autores têm sugerido que a ocorrência de tromboflebite por *Candida* spp. pode representar um reservatório do patógeno, o que resulta em foco de persistência da infecção. Importante mencionar que, nestes casos, os exames físicos apresentam baixa sensibilidade para detectar casos de tromboflebite séptica, sendo essencial a realização de exames de

imagem. Casos de tromboflebite supurativa têm sido reconhecidos apenas quando associados à presença de cateter intravascular, sendo muitas vezes de difícil tratamento (**Caccese et al.2012**).

Outro possível foco persistente do patógeno é a presença de próteses valvares contaminadas, uma vez que, embora não muito frequentes, casos de endocardite por *Candida* spp. apresentam alto risco (33%) de culminarem em persistência da infecção (**Solla-Buceta et al. 2013**). Como mencionado, o foco do nosso estudo exclui a análise de pacientes cuja ocorrência de candidemia persistente esteja associada ao diagnóstico de endocardite.

No Quadro 2 estão sumarizados as possíveis condições associadas ao quadro de candidemia persistente e as condutas laboratorial e terapêutica sugeridas. Importante mencionar que todas as recomendações sugeridas têm como base observações obtidas a partir de estudos que apresentaram diferentes limitações: pequeno tamanho amostral, estudos retrospectivos, interferência de determinados fatores de confusão como, por exemplo, pacientes com candidemia disseminada ou pacientes com candidemia sem CVC no momento do diagnóstico.

De forma geral, os principais aspectos do hospedeiro relacionados ao fenômeno de candidemia persistente já se encontram bem estabelecidos. Neste contexto, pacientes persistentemente neutropênicos, prematuros com comprometimento do sistema imunológico, pacientes recebendo altas doses de imunossupressores podem ter persistência de candidemia por defeito nos fagócitos. Finalmente, importante aspecto a ser considerado é há necessidade de uma abordagem mais criteriosa direcionada ao patógeno. Em um estudo conduzido por Tumbarello e colaboradores (2007) mostrou que em modelo multivariado de análise de risco para óbito, a formação de biofilme caracteriza-se como fator preditor independente para mortalidade. Por último, a sensibilidade do patógeno frente à terapia antimicrobiana deve ser considerada de grande valia como causa da não negatificação da hemocultura (**Nucci, 2011**).

Quadro 2. Sugestões de condições associadas, condutas laboratoriais e terapêuticas em casos de candidemia persistente.

Condições associadas à candidemia persistente	Abordagem diagnóstica	Estratégia terapêutica
Neutropenia persistente	Hemograma	Abreviar a duração da neutropenia (Fator estimulante de colônias de granulócitos, transfusão de células brancas).
Baixa dosagem da droga no sangue	Checar a dosagem e buscar razões possíveis, incluindo a absorção oral ou interação do medicamento.	Mudança de rota oral para intravenosa; descontinuar concomitantemente a droga que interfere com o nível sérico do agente antifúngico; ou, cogitar a mudança de droga.
Infecção endovascular	Ecocardiografia, ecocardiograma com Doppler e PET-CT.	Plano de tratamento prolongado, cirurgia adjuvante.
Abscesso profundo em tecidos	Ultrassonografia, CT scan, ressonância magnética e PET-CT.	Drenagem do abscesso.
Infecção associada com material protético	Diagnóstico de candidemia associados à CVC.	Remover o material protético.
Resistência primária ou secundária a droga	Identificar a espécie de <i>Candida</i> . Realizar teste de suscetibilidade aos antifúngicos.	Mudança de classe terapêutica.

Fonte: Nucci, 2011.

1.3. Equinocandinas e seu uso no tratamento da candidemia.

1.3.1. Classe terapêutica.

Atualmente, três grupos principais de drogas antifúngicas têm sido utilizados na prática clínica em infecções sistêmicas por *Candida* spp.: i) os poliênicos, representados principalmente pela anfotericina B e suas formulações lipídicas; ii) os triazólicos, sendo seus principais agentes o fluconazol e o voriconazol; e iii) as equinocandinas, representadas pela caspofungina, anidulafungina e micafungina (**Pappas et al. 2009**).

As equinocandinas representam a mais nova classe de drogas antifúngicas, composta por três agentes: micafungina, anidulafungina e caspofungina. As equinocandinas são lipopeptídeos semi-sintéticos, produzidos a partir de modificações químicas em metabólitos produzidos durante a fermentação de determinados fungos: caspofungina é produzida a partir da pneumocandina B extraída de *Glarea lozoyentis*; micafungina é produzida a partir do hexapeptídeo FR901370, extraído de *Coleophoma empedra*; e, anidulafungina é produzida a partir de equinocandin B, extraído de *Aspergillus nidulans* (Deresinski and Stevens, 2003; Eschenauer et al. 2007; Perlin, 2011). Os agentes antifúngicos pertencentes a esta classe são caracterizados por apresentarem estrutura química de hexapeptídeos cíclicos ligados a uma cadeia lateral de ácido graxo. A estrutura molecular de cada equinocandina encontra-se ilustrada na Figura 1.

A caspofungina foi a primeira equinocandina aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) nos EUA em 2001, seguida por anidulafungina em 2005 e micafungina em 2006. No Brasil, a aprovação para uso clínico pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária ocorreu nos anos de 2002, 2008 e 2010, respectivamente. Atualmente, os *guidelines* americano e brasileiro para tratamento de infecções invasivas por *Candida* spp. recomendam a utilização dessa classe de antifúngicos como terapia de escolha para o tratamento de candidíase esofágica e invasiva, incluindo candidemia, bem como terapia antifúngica empírica nos casos de infecção provável por *Candida* spp. (Pappas et al. 2009, Colombo et al. 2012).

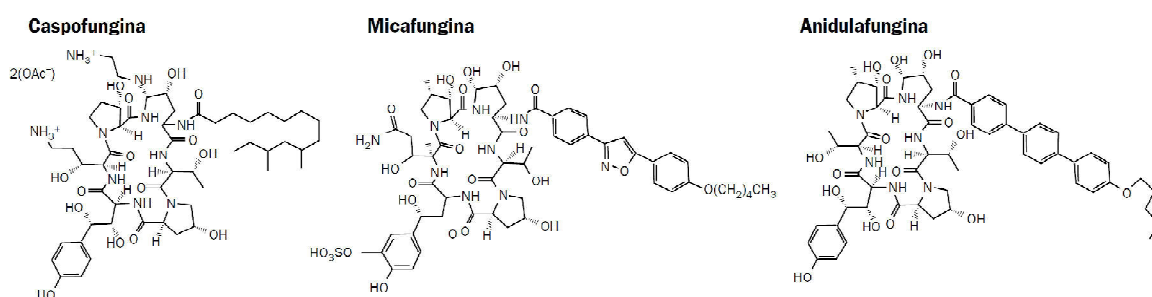


Figura 1. Estrutura química molecular da caspofungina, micafungina e anidulafungina.

Em um estudo clínico duplo-cego, comparando a atividade de caspofungina e anfotericina B desoxicolato no tratamento de candidíase invasiva, ficou constatado que a caspofungina é tão eficaz quanto à anfotericina B desoxicolato, com percentuais de sucesso de 73,4% e 61,7%, respectivamente. Além da alta eficácia, o grupo tratado com caspofungina apresentou menor número de efeitos adversos relacionados ao tratamento **(Mora-Duarte et al. 2002)**.

Em estudo conduzido por Reboli et al.(2007), comparando a atividade da anidulafungina e do fluconazol no tratamento de candidíase invasiva, ficou constatado que o perfil de segurança de ambas as drogas é muito satisfatório. Por outro lado, os pacientes tratados com anidulafungina apresentaram uma maior taxa de sucesso terapêutico (75,6%) quando comparado aos pacientes tratados com fluconazol (60,1%), diferença estatisticamente significativa ($p < 0,02$).

Kuse e colaboradores (2007) conduziram um ensaio clínico duplo-cego, comparando a atividade de micafungina e anfotericina B lipossomal no tratamento de candidíase invasiva, onde mostraram que a porcentagem de sucesso terapêutico foi muito semelhante entre o grupo tratado com micafungina e o tratado com anfotericina B lipossomal, 89,6% e 89,5%, respectivamente. Porém, o grupo tratado com micafungina apresentou menor número de efeitos adversos quando comparado ao grupo tratado com anfotericina B lipossomal.

Nestes três estudos, foram observadas as respectivas taxas de candidemia persistente no grupo tratado com equinocandinas: 8%; 12%; e, 9%. Importante mencionar que nesses estudos foram relatados maior prevalência de *C. parapsilosis* envolvidos na persistência da infecção.

1.3.2. Mecanismo de ação.

As equinocandinas apresentam atividade fungicida contra as espécies pertencentes ao gênero *Candida*, incluindo aquelas com resistência intrínseca ou susceptibilidade dose dependente ao fluconazol (*C. krusei* e *C. glabrata*, respectivamente) ou resistência intrínseca à anfotericina B (*C. lusitanae*)

(Chen et al. 2011). Porém, altos MICs de equinocandinas têm sido visto em *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* para as quais esta classe de droga apresenta atuação predominantemente fungistática (Katiyar et al. 2006; Garcia-Effron et al. 2008).

O mecanismo de ação das equinocandinas se dá pela ligação à enzima β -1,3-glucana sintase (Fks), responsável pela biossíntese de β -1,3-glucana, o principal componente da parede celular de *Candida* spp. A enzima glucana sintase é formada por, ao menos, duas subunidades: Fks (codificada pelos genes *FKS1*, *FKS2* e *FKS3*), que apresenta atividade catalítica; e, Rho1p, proteína regulatória que está envolvida em diferentes processos biológicos (Perlin 2007; Munro, 2010; Chen et al. 2011; Pfaller et al. 2012). A inibição da enzima Fks1 através da ligação das equinocandinas resulta na diminuição da quantidade de β -1,3-glucana na parede celular fúngica, levando à instabilidade osmótica, à lise celular e, conseqüentemente, à morte das células (Bizerra et al. 2011; Beyda et al. 2012).

A ausência de parede celular e de moléculas de β -1,3-glucana em células de mamíferos faz com que as equinocandinas apresentem baixos índices de toxicidade, uma vantagem importante em relação às demais drogas antifúngicas (Denning, 2003; Deresinski and Stevens, 2003; McComarck and Perry, 2005; Vazquez, 2005; Chandrasekar and Sobel, 2006; Pappas et al. 2009).

1.3.3. Mecanismo de resistência.

Embora ainda seja um fenômeno raro, alguns casos de resistência ao tratamento com equinocandinas têm sido relatados (Ishikawa et al. 2009; Pfaller et al. 2012; Alexander et al. 2013). Dessa forma, há uma preocupação crescente com a possibilidade de seleção de isolados e/ou espécies resistentes às equinocandinas.

O principal mecanismo de resistência descrito para equinocandinas está relacionado à ocorrência de mutações no genes *FKS*, sítio alvo dessa classe de drogas. Essas mutações podem resultar na alteração conformacional da enzima e na diminuição da afinidade de interação com as equinocandinas, o

que, conseqüentemente, acarreta em resistência a essa classe de drogas (**Balashov et al. 2006; Perlin, 2007; Garcia-Effron et al. 2010; Walker et al.2010**). Os isolados resistentes apresentam mutações em duas regiões específicas dos genes *FKS*, conhecidas como *hot spot1* (HS1) e *hot spot2* (HS2).

As regiões nucleotídicas do HS1 e HS2 do gene *FKS1* das espécies *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis (sensu lato)* são apresentadas na Tabela 1. Importante mencionar que, mutações que acarretam em troca de aminoácidos nestas regiões têm maior possibilidade de resultar em resistência às equinocandinas (**Perlin 2007; Walker et al.2010; Bizerra et al. 2013**). Diversos estudos têm mostrado que a troca do aminoácido serina da posição 645 por uma prolina, fenilalanina ou tirosina é a principal mutação apresentada por isolados de *C. albicans* resistentes às equinocandinas (**Park et al.2005;Balashov et al.2006; Perlin, 2007; Castanheira et al.2010; Garcia-Effron et al. 2010**).

Vale ainda mencionar que o aumento da concentração inibitória mínima (CIM) entre os isolados de *C. parapsilosis (sensu lato)* e *C. guilliermondii* está relacionado à presença de mutações naturais no gene *FKS1* (**Perlin, 2007; Garcia-Effron et al.2008; Walker et al. 2010**). De fato, todos os membros do complexo *C. parapsilosis* (*C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*) contêm uma mutação na posição do aminoácido 660 de Fks1, resultando na substituição de uma prolina por uma alanina (**Garcia-Effron et al. 2008**), enquanto os isolados de *C. guilliermondii* possuem uma substituição no aminoácido da posição 642 de Fks1 (**Perlin, 2007**). Apesar dos maiores valores de CIM exibido por estas espécies, elas ainda se encontram dentro do limite terapêutico para esta classe de drogas e são classificadas como sensíveis (**Colombo et al. 2010; CLSI M27-S4, 2012**).

Tabela 1. Porção do gene *FKS1* correspondente às regiões HS1 e HS2.

Espécie	Região Nucleotídica – gene <i>FKS1</i>	
	HS1	HS2
<i>C. albicans</i>	1921 – 1947	4069 – 4092
<i>C. parapsilosis</i>	1954 – 1980	4105 – 4128
<i>C. tropicalis</i>	1921 – 1947	4069 – 4092
<i>C. krusei</i>	1963 – 1989	4092 – 4116

HS1 – região do *hot spot 1*. HS2 – região do *hot spot 2*.

Importante mencionar que, além de mutações no gene *FKS1*, em isolados de *Candida guilliermondii* e *Candida glabrata* mutações em *FKS2* também estão associadas à resistência às equinocandinas (Katiyar et al. 2006; Thompson et al.2008; Garcia-Effron et al. 2009; Zimbeck et al.2010). De fato, em isolados de *C. glabrata*, nos quais os genes *FKS1* e *FKS2* são totalmente redundantes para a síntese de β -1,3-glucana, a resistência às equinocandinas se dá, principalmente, por mutações nas regiões HS1 e HS2 do gene *FKS2*, uma vez que mutações no gene *FKS1* conferem menor *fitness* à levedura (Ben-Ami et al. 2011; Katiyar et al. 2012; Arendrup et al. 2012).

1.3.3.1. Epidemiologia da resistência às equinocandinas.

Estudos recentes têm relatado um aumento dos casos de resistências às equinocandinas, fenômeno que parece estar associado com a maior utilização dessa classe de drogas em diferentes centros médicos (Perlin, 2011; Pfaller, 2012; Alexander et al.2013).

Em 2011, Pfaller e colaboradores (2011a) analisaram 15.269 isolados de *Candida* obtidos no período de 2001 a 2009, em 100 centros médicos distribuídos no mundo. Neste período, os autores observaram que, de maneira geral, houve diminuição de sensibilidade às equinocandinas pelas espécies de *Candida*. Os autores observaram que a proporção de isolados de *C. glabrata* resistentes à anidulafungina aumentou de 0,4% em 2004 para 1,8% em 2009. De maneira semelhante, a proporção de isolados de *C. krusei* e *C. parapsilosis* resistentes à micafungina aumentou de 2,4% para 5,7% e de 0,0% para 3,1%, respectivamente, entre o período de 2004 e 2009.

Entre as espécies que têm apresentado resistência às equinocandinas, *C. glabrata* tem sido aquela mais descrita na literatura. Em estudo acerca da epidemiologia e do perfil de susceptibilidade de isolados de *Candida* recuperados de corrente sanguínea, foi observado que a resistência às equinocandinas foi mais comum em *C. glabrata*, sendo constatado que 3,8%, 5,1% e 3,2% dos isolados desta espécie apresentaram resistência à anidulafungina, caspofungina e micafungina, respectivamente **(Pfaller et al. 2011b)**. Em 2010, Zimbeck e colaboradores analisaram 490 isolados de *C. glabrata* coletados ao longo de estudo de vigilância epidemiológica. Nesta casuística, os autores observaram que 3,3% dos isolados apresentavam valores de CIMs elevados para ao menos uma das equinocandinas.

Recentemente, em estudo conduzido por Alexander e colaboradores (2013) foram analisados 313 isolados de *C. glabrata* obtidos a partir de 293 episódios de candidemia durante os anos de 2001 a 2010. Neste período, os autores observaram que as taxas de resistência às equinocandinas aumentaram de 4,9% para 12,3%. Além disso, foi possível observar que, entre 78 isolados resistentes ao fluconazol, 14,1% apresentavam resistência frente ao menos uma das equinocandinas.

Na América Latina, o primeiro caso de resistência comprovada as equinocandinas foi relatado por Bizerra e colaboradores (2013) a partir de um caso de fungemia de escape em paciente sob tratamento profilático com micafungina. Neste estudo, a partir de cinco hemoculturas sequenciais, foram recuperados cinco isolados de *C. glabrata*. Quando submetidos aos testes de susceptibilidade *in vitro*, à análise de mutação nos genes *FKS1* e *FKS2*, bem como ao ensaio de glucana sintase, os autores observaram que todos os isolados apresentavam resistência frente às três equinocandinas.

Esses estudos deixam claro que após a inclusão das equinocandinas ao arsenal terapêutico antifúngico e com o aumento do uso clínico das mesmas, há uma tendência à elevação das taxas de resistência a essa classe de drogas, principalmente entre isolados de *Candida* spp.

Neste contexto, a presente investigação tem como objetivo investigar a ocorrência de resistência às equinocandinas em nosso meio. Para tanto,

selecionamos casos de candidemia persistente à essa classe terapêutica no sentido de ampliar a chance de caracterizar sua ocorrência bem como seus mecanismos de resistência.

2.0. OBJETIVOS

A presente investigação teve por objetivo avaliar características microbiológicas de cepas de candidemia persistente às equinocandinas em relação a:

- I. Distribuição de espécies envolvidas;
- II. Perfil de susceptibilidade à 5 antifúngicos (anfotericina B, fluconazol, voriconazol, caspofungina e anidulafungina) de uso sistêmico;
- III. Possível presença de mutação no gene *FKS1* relacionado com resistência às equinocandinas.

3.0. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Seleção de casos de candidemia persistente.

O presente estudo caracteriza-se como uma análise retrospectiva, para avaliação de potencial desenvolvimento de resistência às equinocandinas em pacientes com candidemia persistente tratados com estes fármacos. Para tanto, a partir dos dados clínicos coletados ao longo do último estudo de vigilância Rede Candidemia Brasil (RCB), foram selecionados os casos de pacientes com candidemia persistente cuja terapia antifúngica adotada tenha incluído quaisquer das equinocandinas (**Colombo et al. 2013a**). A Figura 2 ilustra o fluxograma de trabalho seguido durante a seleção desses casos. Basicamente, entre 436 pacientes com hemocultura positiva para *Candida* spp., pertencentes ao estudo RCB, 188 tiveram uma segunda cultura de sangue analisada. Desses, 63 pacientes apresentaram episódio de candidemia persistente, ou seja, positividade da segunda hemocultura após 48 horas de início do tratamento antifúngico. Após essa etapa inicial, os seguintes critérios de inclusão foram aplicados para seleção dos casos incluídos ao presente estudo: i) ausência de CVC ou troca/remoção deste dispositivo médico até 48 horas após o diagnóstico da candidemia; ii) exposição a terapêutica antifúngica adequada, ou seja, terapia antifúngica com atividade *in vitro* sobre o agente etiológico da infecção documentado no primeiro isolamento; iii) utilização de equinocandinas durante o tratamento antifúngico. Foram incluídos pacientes sem endocardite com diagnóstico confirmado por ecocardiograma. Do total de 63 pacientes com candidemia persistente, apenas 13 atenderam aos critérios de inclusão descritos acima, sendo, portanto, incluídos no presente estudo.

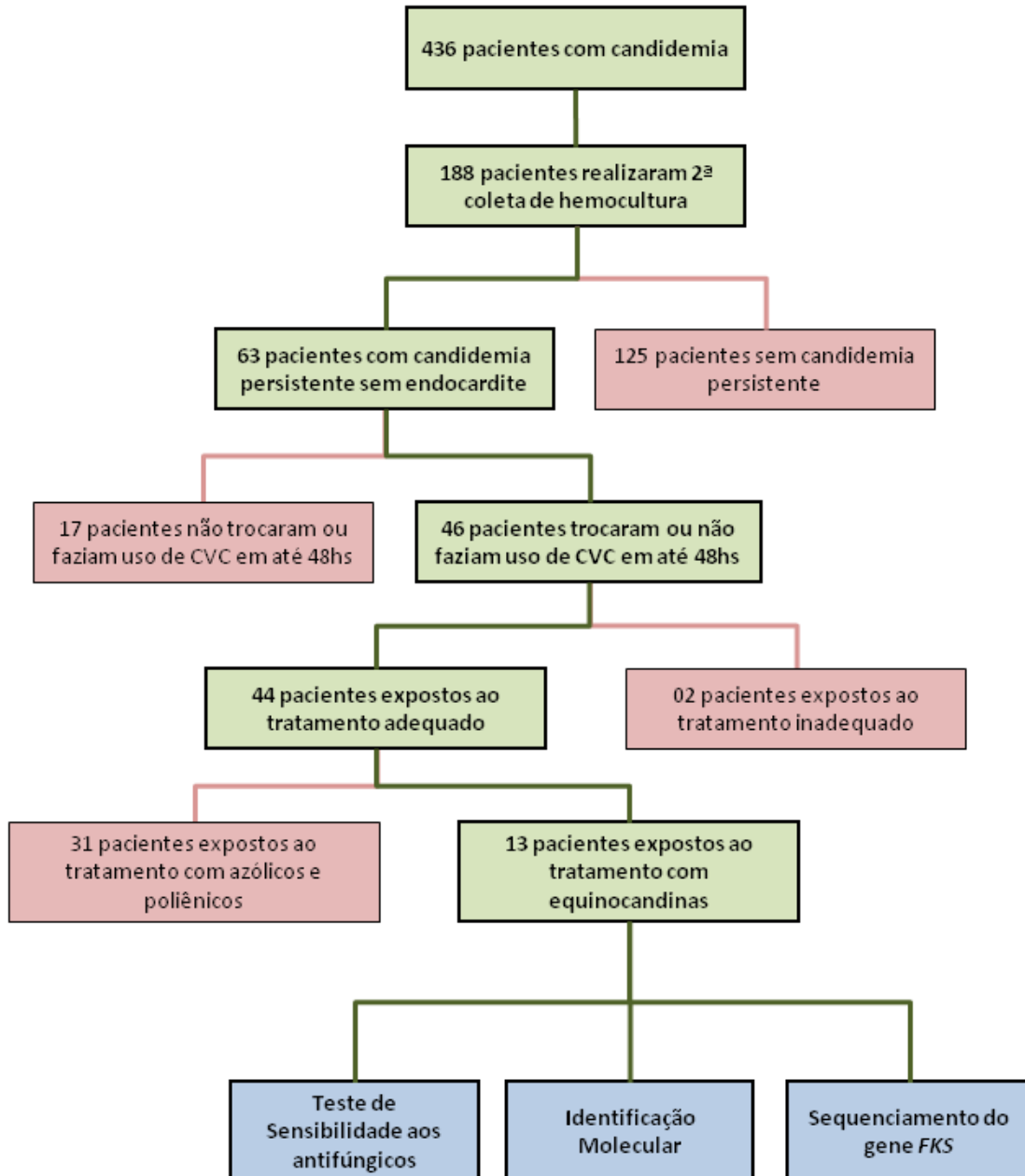


Figura 2. Fluxograma de trabalho seguido durante o desenvolvimento deste estudo. Do total de 436 pacientes com fungemia, 63 apresentaram candidemia persistente, sendo que 13 atenderam aos critérios de inclusão e foram incluídos no presente estudo (quadros verdes). Todos os isolados foram submetidos à teste de sensibilidade aos antifúngicos, identificação molecular e sequenciamento do gene *FKS1* (quadros azuis).

3.2. Seleção das amostras de *Candida* spp. de pacientes com candidemia persistente.

Foram selecionados 53 isolados de *Candida* spp. obtidos a partir de frascos de hemoculturas positivos oriundos dos 13 pacientes incluídos no presente estudo (Tabela 2). Estas cepas foram recuperadas do banco de microrganismos do Laboratório Especial de Micologia (LEMI), Disciplina de Infectologia, Universidade Federal de São Paulo– UNIFESP, composto de mais de 4.000 isolados de *Candida* spp., incluindo aqueles do estudo RCB.

3.3. Identificação dos microrganismos selecionados.

3.3.1. Verificação da viabilidade e pureza das leveduras.

As amostras selecionadas para este estudo foram submetidas à verificação de sua viabilidade e pureza através do cultivo, pela técnica de esgotamento, em Placas de Petri (90x15cm) contendo CHROMagar *Candida*® (CHROMagar Microbiology, Paris, France). Após incubação à 37°C por 48 horas foram analisados o aspecto e a coloração das colônias das leveduras.

3.3.2. Identificação dos microrganismos através de amplificação e sequenciamento da região ITS do rDNA.

Todos os 53 isolados de *Candida* spp. selecionados para este estudo e listados na Tabela 2 tiveram sua identificação confirmada através de sequenciamento da região espaçadora interna transcrita (ITS) do DNA ribossomal (rDNA) utilizando os oligonucleotídeos iniciadores universais ITS1 e ITS4 (Tabela 3) (White et al. 1990).

Tabela 2. Amostras de *Candida* spp. utilizadas no presente estudo.

Paciente	Nº LEMI	Data do isolamento	Identificação fenotípica
01	7063A	19/11/2010	<i>C. albicans</i>
	7063B	19/11/2010	<i>C. albicans</i>
	7071A	23/11/2010	<i>C. albicans</i>
	7071B	23/11/2010	<i>C. albicans</i>
	7071C	25/11/2010	<i>C. albicans</i>
	7071D	25/11/2010	<i>C. albicans</i>
	7145B	29/11/2010	<i>C. albicans</i>
	7145C	01/12/2010	<i>C. albicans</i>
	7073	01/12/2010	<i>C. albicans</i>
02	7969A	01/04/2011	<i>C. krusei</i>
	7969B	12/04/2011	<i>C. krusei</i>
03	7970A	30/04/2011	<i>C. parapsilosis(sensu lato)</i>
	7970B	13/05/2011	<i>C. parapsilosis(sensu lato)</i>
	7970C	21/05/2011	<i>C. parapsilosis(sensu lato)</i>
04	6859A	15/09/2011	<i>C. tropicalis</i>
	6859B	23/09/2011	<i>C. tropicalis</i>
05	7108A	09/11/2011	<i>C. parapsilosis(sensu lato)</i>
	7108B	22/11/2011	<i>C. parapsilosis(sensu lato)</i>
06	7252A	18/10/2011	<i>C. albicans</i>
	7252B	21/10/2011	<i>C. albicans</i>
07	8084B	25/05/2011	<i>C. parapsilosis(sensu lato)</i>
	8084C	25/05/2011	<i>C. parapsilosis(sensu lato)</i>
	8084D	03/06/2011	<i>C. parapsilosis(sensu lato)</i>
	8084E	06/06/2011	<i>C. parapsilosis(sensu lato)</i>
	8084F	10/06/2011	<i>C. parapsilosis(sensu lato)</i>
08	7550A	18/11/2010	<i>C. tropicalis</i>
	7550B	18/11/2010	<i>C. tropicalis</i>
	7550E	21/11/2010	<i>C. parapsilosis(sensu lato)</i>
	7550C	22/11/2010	<i>C. tropicalis</i>
	7550D	22/11/2010	<i>C. tropicalis</i>
	7550F	30/11/2010	<i>C. parapsilosis(sensu lato)</i>
09	8046A	01/06/2011	<i>C. parapsilosis(sensu lato)</i>
	8046B	01/06/2011	<i>C. parapsilosis(sensu lato)</i>
	8046C	01/06/2011	<i>C. parapsilosis(sensu lato)</i>
	8046D	04/06/2011	<i>C. parapsilosis(sensu lato)</i>
	8046E	06/06/2011	<i>C. parapsilosis(sensu lato)</i>
10	6923A	29/07/2011	<i>C. krusei</i>
	6923B	05/08/2011	<i>C. krusei</i>
	6923C	08/08/2011	<i>C. krusei</i>

Continuação da Tabela 2.

Paciente	Nº LEMI	Data do isolamento	Identificação fenotípica
11	7456A	31/01/2011	<i>C. parapsilosis(sensu lato)</i>
	7456B	31/01/2011	<i>C. parapsilosis(sensu lato)</i>
	7456C	04/02/2011	<i>C. parapsilosis(sensu lato)</i>
	7456D	04/02/2011	<i>C. parapsilosis(sensu lato)</i>
	7456E	08/02/2011	<i>C. parapsilosis(sensu lato)</i>
12	7823A	01/04/2011	<i>C. parapsilosis(sensu lato)</i>
	7823B	01/04/2011	<i>C. parapsilosis(sensu lato)</i>
	7823C	09/04/2011	<i>C. parapsilosis(sensu lato)</i>
	7823D	09/04/2011	<i>C. parapsilosis(sensu lato)</i>
	7823E	17/04/2011	<i>C. parapsilosis(sensu lato)</i>
	7823F	17/04/2011	<i>C. parapsilosis(sensu lato)</i>
13	7876A	13/05/2011	<i>C. albicans</i>
	7876B	16/05/2011	<i>C. albicans</i>
	7876C	17/05/2011	<i>C. albicans</i>

3.3.2.1. Extração do DNA genômico das leveduras.

O DNA genômico foi extraído e purificado diretamente da colônia do fungo utilizando técnica de lise mecânica em nitrogênio líquido. Para tanto, uma colônia com 24 horas de cultivo foi retirada da placa, colocada em 4mL de caldo YPD (Difco Laboratories, EUA) e incubada overnight à 35°C sob agitação constante (200 rpm). Em seguida, 1mL da cultura foi transferido para microtubos de 1,5mL e centrifugado a 3824×g por 3 minutos. As células obtidas foram lavadas duas vezes com 500µL de água destilada esterilizada para eliminação do meio de cultura.

Foram adicionados aos microtubos contendo o pellet celular cerca de 200µL de pérolas de vidro de 0,5mm (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, USA). Estes foram vedados com parafilme M (Pechinery Plastic Packaging – Wisconsin, EUA), imersos em nitrogênio líquido e submetidos à agitação no equipamento Fast Prep (Thermo – Massachusetts, EUA) em dois ciclos de 45 segundos com velocidade 4,0 para a ruptura mecânica da parede e membrana celular das células fúngicas.

Após a etapa de lise dos fungos, foi seguido o protocolo *in house*, que utiliza o reagente Brazol, (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) para purificação do DNA. Aos microtubos com as amostras lisadas, foram adicionados 600µL de Brazol e o volume resultante foi agitado em vortex. Seguiu-se a adição de 130µL de fenol-clorofórmio (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, USA), nova agitação em vortex e centrifugação a 20.000×g e 8°C por 12 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos contendo 500µL de etanol absoluto gelado, agitados em vortex e centrifugados a 20.000×g e 8°C por 12 minutos. Em seguida, foram adicionados ao pellet resultante 500µL de etanol 70% e realizada a centrifugação a 20.000×g e 8°C por 12 minutos. Nova lavagem com etanol 70% foi realizada e, após remoção do etanol, o precipitado foi mantido em fluxo laminar até a evaporação total do etanol remanescente. Em seguida, o precipitado foi dissolvido em 50µL de água Milli-Q.

3.3.2.2. Tratamento do DNA com RNase A.

Para remoção do RNA e purificação do DNA, aos tubos contendo 50µL de DNA foram adicionados 50µL de água Milli-Q, 1µL de Tris-HCL 1M pH7,5 e 1µL de RNase A (USB Corporation, USA) a 10mg/mL. A reação foi incubada à 37°C por uma hora. Posteriormente, o DNA foi precipitado com 10µL de acetato de sódio 3M pH4,5 e 220µL de etanol absoluto gelado. A suspensão foi homogeneizada, incubada por 30 minutos no gelo e centrifugada a 20.000×g por 15 minutos. Após desprezar o sobrenadante, 500µL de etanol 70% foram adicionados para eliminação de sal e nova centrifugação foi realizada. Por fim, o etanol foi removido e o precipitado foi seco em fluxo laminar por dez minutos. A eluição completa do precipitado foi realizada adicionando 50µL de água Milli-Q.

3.3.2.3. Quantificação do DNA.

O DNA extraído foi submetido à quantificação e à análise de pureza em espectrofotômetro (NanoVue Plus, GE). A avaliação da pureza foi realizada através da razão entre as leituras DO260nm/DO280nm e

DO260nm/DO230nm. Valores entre 1,8 e 2,0 indicam DNA de alta pureza e livre de sais, enquanto que os valores abaixo de 1,8 indicam contaminação com proteínas e ou excesso de sal e, na sua ocorrência, a extração de DNA foi realizada novamente.

3.3.2.4. Amplificação da região ITS do rDNA.

A região ITS do rDNA foi amplificada através da PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores universais ITS1 e ITS4 (Tabela 3). Para a PCR foram adicionados em tubos de microcentrifugação de 0,2mL os seguintes reagentes: 12,5µL de PCR Master Mix® (PROMEGA, EUA), 1µL de cada iniciador a 10pmol (IDT, EUA), 2µL de DNA diluído a 40ng/µL e 8,5µL de água Milli-Q, totalizando um volume final de 25µL. A amplificação foi realizada em um termociclador de gradiente Veriti®(Applied Biosystems, EUA) programado com ciclo inicial de 94°C por 3 minutos, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, hibridação a 57°C por 1 minuto e extensão durante 1 minuto a 72°C. No último ciclo a temperatura de 72°C foi mantida por um período de extensão de 5 minutos e, em seguida, reduzida para 4°C, na qual as amostras ficaram mantidas até sua retirada do aparelho. Após o término da reação, o DNA amplificado foi armazenado a -20°C.

3.3.2.5. Eletroforese e purificação dos produtos da PCR.

As amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,2% (Invitrogen, USA) em solução tampão TAE 1X (Tris acetato EDTA) para verificação da eficácia da amplificação. Cinco microlitros dos produtos amplificados foram então diluídos em 2 µL de EZ-Vision® (Amresco, EUA) e, então, adicionados a cada orifício do gel que foi submetido nas condições de 70 volts a 400mA por 1 hora. Para confirmar o tamanho dos fragmentos amplificados, foram adicionados 5µL de marcador de peso molecular de 100pb (DNA Ladder; Invitrogen, EUA) no primeiro e no último orifício do gel. Os produtos da PCR foram purificados utilizando o Kit de purificação Amicon Ultra® (Millipore, EUA), seguindo as instruções

recomendadas pelo fabricante. As amostras purificadas foram armazenadas a -20° C até o momento do sequenciamento.

3.3.2.6. Sequenciamento da região ITS do rDNA.

Após a purificação, os produtos amplificados foram sequenciados de acordo com o método de terminação de cadeia (**Sanger, 1977**) utilizando-se o kit Taq DyeDeoxy Terminator v3.1 Cycle Sequencing® (Applied Biosystems, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o sequenciamento foram os mesmos empregados na amplificação. A reação foi realizada em uma placa de 96 poços, cada um contendo um produto de PCR purificado diluído em água Milli-Q e um mix preparado especificamente para cada iniciador. O volume final em cada poço da placa foi de 15µL na qual continha 40–80ng de DNA (4µL de DNA diluído em 2µL de água Milli-Q), 2µL de pré-mix Taq DyeDeoxy, 4µL de tampão de sequenciamento e 3µL de iniciador a 2pmol/µL. A placa preparada foi submetida a 25 ciclos de 20 segundos a 95°C, 15 segundos a 50°C e 1 minuto a 60°C no termociclador Veriti® (Applied Biosystems, EUA). Após a essa etapa, os produtos da reação de sequenciamento foram precipitados a fim de eliminar o excesso de iniciadores, sais, dNTPs e ddNTPs não incorporados. Resumidamente, 2,0µL de EDTA 125mM e 3,0µL de acetato de sódio 3M foram adicionados a cada orifício da placa de 96 poços. Em seguida, alíquotas de 55µL de etanol absoluto foram adicionados a cada poço da placa de sequenciamento, sendo esta vedada, homogeneizada e incubada por 15 minutos, ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. Após a incubação, a placa foi centrifugada por 35 minutos a 1454×g e 20°C, para precipitação das moléculas de DNA. Após a centrifugação, o etanol foi descartado e os pellets foram lavados com 70µL de etanol 70%. Novamente, a placa foi homogeneizada e centrifugada por 15 minutos a 1454×g e 4°C. Em seguida, o etanol foi descartado por inversão e o excesso retirado por evaporação a 95°C. Após a precipitação, os fragmentos foram submetidos a uma etapa de desnaturação. Para tanto, 15µL de formamida HiDi® (Applied Biosystems, EUA) foram adicionados a cada um dos poços da placa. A placa foi vedada com uma septa específica para separação eletroforética em capilar,

homogeneizada por 20 segundos e incubada a 94°C por 3 minutos, seguida de um choque térmico em gelo por 1 minuto.

O sequenciamento foi realizado por separação eletroforética em capilar em um sequenciador modelo ABI Prism 3100 Genetic Analyzer® (Applied Biosystems, EUA), que utiliza poliacrilamida POP6® (Applied Biosystems, EUA) e tampão TBE 1X (Tris/Borato/EDTA).

3.3.2.7. Montagem e análise dos contigs.

As sequências consenso da região amplificada foram montadas utilizando o *software* Sequencher® (GeneCodes Corporation, EUA). Estas sequências foram analisadas por comparação em bancos de sequências de DNA, utilizando a ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), para identificação de espécie. Para verificação da confiabilidade dos resultados fornecidos pelo BLAST, foram considerados válidos somente os alinhamentos que obtiveram valores de identidade máxima $\geq 96\%$, cobertura $\geq 98\%$ e *e-value* $< 10^{-5}$, respectivamente.

Tabela 3. Listagem de todos os oligonucleotídeos utilizados neste estudo.

Espécie	Oligonucleotídeo	Gene a que se refere	Propósito	Referência
<i>Candida</i> spp.	ITS1 ITS4	<i>rDNA</i>	Sequenciamento da região ITS do rDNA	White et al. 1990.
<i>Candida</i> spp.	1HS1F*_CSP 1HS1R*_CSP	<i>β-1,3-glucana sintase 1</i>	Sequenciamento da região HS1 do gene <i>FKS1</i> .	Garcia-Effron et al. 2008
<i>Candida</i> spp.	1HS2F*_CSP 1HS2R*_CSP	<i>β-1,3-glucana sintase 1</i>	Sequenciamento da região HS2 do gene <i>FKS1</i> .	Garcia-Effron et al. 2008
<i>Candida krusei</i>	1HS2F*_CK 1HS2R*_CK	<i>β-1,3-glucana sintase 1</i>	Sequenciamento da região HS2 do gene <i>FKS1</i> .	Park et al. 2005

*As letras F e R nos nomes dos oligonucleotídeos indicam a orientação 5'-3'. F: *forward* (*sense*) ou R: *reverse* (*antisense*)

3.4. Teste de susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos.

Todos os 53 isolados foram analisados em relação à sua susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos, anfotericina B, fluconazol (Pfizer Incorporated, New York, N.Y. EUA), voriconazol (Pfizer Incorporated, New York, N.Y., EUA), anidulafungina e caspofungina (Merck, Rahway, N.J., EUA), através do método de microdiluição em caldo preconizado pelo CLSI (**CLSI M27-S4, 2012**).

Foi utilizado o meio de cultivo sintético Roswell Park Memorial Institute (RPMI- 1640) com L-glutamina, preparado da seguinte forma: 10,4 g/L de RPMI-1640 (Cultilab, Campinas, Brasil) e 34,3 g/L de ácido morfolinopropanolsulfônico (MOPS). O pH foi ajustado para 7,0. O meio de cultivo foi esterilizado por filtração a vácuo, utilizando-se filtro biológico 0,22 µm (Corning Incorporated Costar, Corning, NY, EUA). Frascos contendo o meio foram conservados em refrigerador a 4° C.

Os antifúngicos testados foram diluídos em dez diferentes concentrações seriadas, a saber: fluconazol 1,25 a 640 µg/mL, anfotericina B, voriconazol, anidulafungina e caspofungina 0,3 a 160 µg/mL. As dez diferentes concentrações de cada antifúngico foram diluídas a 1:5 em RPMI-1640 e alíquotas de 100 µL destas concentrações foram dispensadas nas placas de microdiluição (Corning Inc. Costar), utilizando-se pipeta multicanal (Digital Multichannel Pipette, Labsystem, Helsinki, Finland). Cada placa contém 12 colunas numeradas de um a doze e 8 linhas identificadas de A a H.

Concentrações decrescentes da droga foram dispensadas sequencialmente nas placas de microtitulação nos poços pertencentes às colunas numeradas de 02 a 11. Os poços de número 12 foram utilizados como controles de crescimento, contendo neles 100 µL de RPMI-1640 sem droga. Os poços pertencentes à coluna identificada com o número 01 foram utilizados como controles de esterilidade, contendo apenas 200 µL do meio RPMI-1640. As placas foram mantidas a -70° C até sua utilização por período máximo de seis meses. No dia do experimento, as placas foram mantidas à temperatura ambiente por 30 minutos antes de serem utilizadas.

A partir de um cultivo de 24 horas da levedura a ser testada, realizado em Sabouraud Dextrose Ágar, foi preparada uma suspensão de inóculo inicial com transmitância de 90% determinada por espectrofotometria, utilizando-se comprimento de onda a 530 nm. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas em meio RPMI-1640 para obtenção de inóculo final contendo 0,5 a 2,5 X 10³ UFC/mL. Alíquotas de 100µL da solução do inóculo final foram dispensadas na placa de microdiluição, nas posições de 02 a 12, contendo 100µL de diferentes concentrações dos antifúngicos testados. O poço 01 foi reservado para controle de esterilidade do meio, como mencionado anteriormente. Ao final, as placas foram transferidas para a estufa a 35°C e a leitura do teste foi realizada após 24 horas de incubação. Além dos isolados clínicos selecionados, seguindo as orientações do CLSI, organismos controle de *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258 foram incluídos em cada lote de ensaios para a verificação da perfeita diluição dos antifúngicos (CLSI M27- S4, 2012). Esta verificação é possível uma vez que são conhecidas previamente as CIMs para estes microrganismos controles frente aos antifúngicos a serem testados.

3.4.1. Leitura e interpretação dos resultados de microdiluição em caldo.

Para leitura do teste de microdiluição em caldo, as placas foram colocadas em suporte contendo espelho, permitindo a observação clara do reverso das mesmas. Foram realizadas leituras visuais após 24 horas de incubação. Para os azólicos e equinocandinas os valores da CIM foram definidos como a menor concentração capaz de induzir proeminente inibição (em torno de 50%) do crescimento celular, em relação ao poço controle (CLSI M27-S4, 2012). Além disso, as CIMs foram classificadas de forma descritiva em termos de variação, CIM₅₀ (concentração de antifúngico capaz de inibir 50% dos isolados testados) e CIM₉₀ (concentração de antifúngico capaz de inibir 90% dos isolados testados).

Os critérios para definição de susceptibilidade e pontos de corte para todos os antifúngicos testados foram aqueles sugeridos pelo documento M27-S4 do CLSI (2012). A Tabela 4 ilustra os valores de ponto de corte utilizados para a interpretação dos testes de susceptibilidade neste estudo.

Tabela 4. Valores de ponto de corte sugeridos para interpretação dos testes de susceptibilidade de *Candida* spp.

Antifúngico	Espécie	Variação de CIM (µmL)		
		S	SDD*	R
Fluconazol	<i>C. albicans</i>	≤ 2,0	4,0	≥ 8,0
	<i>C. glabrata</i>	-	≤ 32,0	≥ 64,0
	<i>C. krusei</i>	-	-	-
	<i>C. parapsilosis</i> **	≤ 2,0	4,0	≥ 8,0
	<i>C. tropicalis</i>	≤ 2,0	4,0	≥ 8,0
Voriconazol	<i>C. albicans</i>	≤ 0,125	0,25-0,5	≥ 1,0
	<i>C. glabrata</i>	-	-	-
	<i>C. krusei</i>	≤ 0,5	1,0	≥ 2,0
	<i>C. parapsilosis</i> **	≤ 0,125	0,25-0,5	≥ 1,0
	<i>C. tropicalis</i>	≤ 0,125	0,25-0,5	≥ 1,0
Anidulafungina	<i>C. albicans</i>	≤ 0,25	0,5	≥ 1,0
	<i>C. glabrata</i>	≤ 0,25	0,5	≥ 1,0
	<i>C. tropicalis</i>	≤ 0,25	0,5	≥ 1,0
	<i>C. krusei</i>	≤ 0,25	0,5	≥ 1,0
	<i>C. parapsilosis</i> **	≤ 2,0	4,0	≥ 8,0
	<i>C. guilliermondii</i>	≤ 2,0	4,0	≥ 8,0
Caspofungina	<i>C. albicans</i>	≤ 0,25	0,5	≥ 1,0
	<i>C. glabrata</i>	≤ 0,25	0,5	≥ 1,0
	<i>C. tropicalis</i>	≤ 0,25	0,5	≥ 1,0
	<i>C. krusei</i>	≤ 0,25	0,5	≥ 1,0
	<i>C. parapsilosis</i> **	≤ 2,0	4,0	≥ 8,0
	<i>C. guilliermondii</i>	≤ 2,0	4,0	≥ 8,0

* Para caspofungina e anidulafungina, leia-se intermediário.

** *C. parapsilosis* (*sensu lato*).

3.5. Análise dos mecanismos de resistência às equinocandinas expressos por isolados de *Candida* spp.

Todas as 53 cepas selecionadas foram analisadas molecularmente quanto à ocorrência de mecanismos de resistência às equinocandinas. Para tanto, os isolados foram submetidos à reação para amplificação e posterior

sequenciamento das regiões *hot spot 1* e *hot spot 2* (HS1 e HS2, respectivamente) do gene *FKS1*. Importante mencionar que, em todas as etapas dessas análises, foram incluídas cepas referência (*C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. albicans* ATCC 90028, *C. krusei* ATCC 6258, *C. orthopsilosis* ATCC 96139, *C. tropicalis* MYA-3404).

3.5.1. Análise de mutações nas regiões HS1 e HS2 do gene *FKS1*.

Após extração do DNA (item 2.3.2.1), as regiões HS1 e HS2 do gene *FKS1* foram amplificadas (item 2.3.2.4) e sequenciadas (item 2.3.2.6) por PCR utilizando os oligonucleotídeos descritos nos estudos de Garcia-Effron et al. 2008 e Park et al. 2005 (Tabela 3) (Figura 3).

As sequências consenso da região amplificada foram montadas segundo metodologia acima descrita (item 2.3.2.7). Posteriormente, essas sequências foram alinhadas e analisadas quanto à ocorrência de mutações por meio de comparação com a sequência do gene *FKS1* de isolados referência sensíveis às equinocandinas (*C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. albicans* ATCC 90028, *C. krusei* ATCC 6258, *C. orthopsilosis* ATCC 96139, *C. tropicalis* MYA-3404). Para esta análise foi utilizado o software Lasergene 8.0.2 (DNASTAR, Madison, WI, USA).

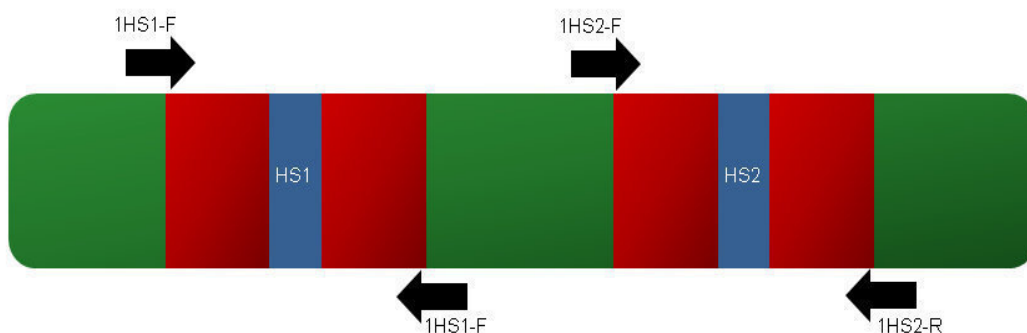


Figura 3. Esquema do gene *FKS1* (retângulo verde). Utilizando os oligonucleotídeos 1HS1-F e 1HS1-R foram analisadas as sequências da região HS1 (retângulo azul) bem como das regiões flangeadoras (retângulos vermelho) deste *hot-spot*. Da mesma forma, utilizando os oligonucleotídeos 1HS2-F e 1HS2-R foram analisadas a região HS2 (retângulo azul) e as porções adjacentes a ela (retângulos vermelhos).

3.5.2. Análise do perfil de mutação nas regiões que flanqueiam as regiões HS1 e HS2 do gene *FKS1*.

Com o intuito de buscar por mutações que explicassem o perfil de sensibilidade dos microrganismos ou a persistência da candidemia, foram sequenciadas e analisadas, além das regiões HS1 e HS2, as porções do gene *FKS1* que flanqueiam o HS1 e HS2 (Figura 3).

4.0. RESULTADOS

4.1. Identificação dos microrganismos selecionados.

4.1.1. Seleção de pacientes com candidemia.

Após análise criteriosa dos dados clínicos dos 436 pacientes incluídos no estudo RCB, foi constatado que 63 (14,4%) apresentaram episódios de candidemia persistente na ausência de endocardite (foram excluídos os pacientes com diagnóstico de endocardite confirmado por ecocardiograma). Após a aplicação dos critérios de inclusão propostos (ausência ou troca/remoção de CVC até 48 horas após o diagnóstico da candidemia; exposição à terapêutica antifúngica adequada; e, uso de equinocandinas como parte do tratamento), foram selecionados 13 (3%) pacientes para o presente estudo. A Tabela 5 ilustra as principais características clínicas dos pacientes selecionados. Foi possível observar que 9 de 13 pacientes apresentam idades em extremos (< 1 ano ou > 60 anos, pacientes 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 11 e 13), 6 pacientes estavam na UTI quando no diagnóstico (pacientes 2, 4, 6, 10, 11 e 12) 5 pacientes fizeram uso de corticoterapia (pacientes 1, 2, 4, 10 e 13), 5 pacientes estavam em uso contínuo de nutrição parenteral total (pacientes 1, 3, 5, 9 e 11) e 5 pacientes em uso de ventilação mecânica (pacientes 2, 4, 6, 10 e 12). Vale dizer que os 13 casos foram documentados em 6 centros médicos de 3 estados brasileiros.

4.1.2. Seleção, viabilidade e pureza das amostras.

Foram recuperados 53 isolados de *Candida* spp. a partir de hemoculturas coletadas dos 13 pacientes selecionados para a presente investigação. Todos os isolados foram semeados em meio cromogênico CHOMagar *Candida*® para a verificação de sua pureza. Todas elas apresentaram crescimento satisfatório, sem presença de sinais de contaminação. Após essa triagem inicial, as cepas foram analisadas em relação ao seu perfil bioquímico bem como às estruturas micromorfológicas.

Considerando a recente descrição de complexos de espécies crípticas pertencentes ao gênero *Candida*, todos os isolados foram analisados molecularmente através do sequenciamento da região ITS do rDNA.

Tabela 5. Variáveis clínicas dos pacientes incluídos no presente estudo.

Paciente	Gênero	Idade (anos)	Local de Internação	CVC	Neutropenia	Doença de Base	Cirurgia
1	M	63	Cirurgia	S	N	Câncer sólido	N
2	F	60	UTI	S	N	Tx de fígado	S (abdominal)
3	F	37	Clínica Médica	S	N	Câncer sólido	N
4	M	87	UTI	S	N	Diabetes	S (abdominal)
5	F	47	Cirurgia	S	N	N	S (abdominal)
6	F	0,5	UTI	S	N	Doença cardíaca	N
7	F	78	Cirurgia	S	N	Diabetes	S (Cardiotorácica)
8	F	67	Clínica Médica	S	N	Câncer sólido	S (abdominal)
9	M	71	Clínica Médica	S	N	N	S (vascular)
10	M	45	UTI	S	N	Tx de fígado/diabetes	S (abdominal)
11	F	76	UTI	S	N	Diabetes	N
12	F	31	UTI	S	N	Doença Neurológica	N
13	M	64	Clínica Médica	S	S	Câncer Hematológico	S (Cardiotorácica)

M: masculino. F: feminino. S: sim. N: não. Tx: transplante. CVC: cateter venoso em posição central. UTI: Unidade de terapia intensiva.

Continuação Tabela 5.

Paciente	NPT	Corticoterapia	Outros Imunossupressores	Ventilação Mecânica	TTO 1	TTO 2	TTO 3	Desfecho
1	S	S	N	N	FCZ	CSF	FCZ	Óbito
2	N	S	S	S	LAmB	ANF	-	Óbito
3	S	N	N	N	CSF	LAmB	-	Alta
4	N	S	N	S	CSF	-	-	Óbito
5	S	N	N	N	FCZ	ANF	-	Óbito
6	N	N	N	S	ANF	FCZ	-	Alta
7	N	N	N	N	CSF	-	-	Alta
8	N	Desconhecido	Desconhecido	N	ANF	FCZ	-	Alta
9	S	N	N	N	MCF	FCZ	-	Óbito
10	N	S	S	S	ANF	LAmB	-	Alta
11	S	N	N	N	CSF	-	-	Óbito
12	N	Desconhecido	N	S	CSF	LAmB	FCZ	Alta
13	N	S	S	N	CSF	-	-	Alta

S: sim. N: não. TTO: tratamento. FCZ: fluconazol. LAmB: anfotericina B lipossomal. CSF: caspofungina. ANF: anidulafungina. MCF: micafungina. AmB: anfotericina B.

4.1.3. Identificação dos microrganismos através de amplificação e sequenciamento da região ITS do rDNA.

A partir do sequenciamento da região ITS do rDNA foi possível obter fragmentos com tamanho variando de 400 bp a 647 bp. As sequências geradas foram analisadas por comparação em bancos de sequências de DNA, utilizando a ferramenta *BLAST*, para a identificação de espécies. Foram considerados apenas os alinhamentos que obtiveram valores de identidade máxima $\geq 99\%$, cobertura $\geq 99\%$ e *e-value* $<10^{-5}$, respectivamente.

A análise das sequências de ITS obtidas permitiu a identificação de todos os microrganismos. Dentre os 53 isolados clínicos de *Candida* spp. utilizados no presente estudo, 22 (41,5%) foram identificados como *C. parapsilosis* (*sensu stricto*), 14 (26,4%) como *C. tropicalis*, 6 (11,3%) como *C. orthopsilosis*, 6 (11,3%) como *C. albicans* e 5 (9,5%) como *C. krusei*. Em relação aos 13 pacientes, 5 (38,5%) foram infectados por isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*), 3 (23%) por isolados de *C. albicans*, 2 (15,4%) por isolados de *C. krusei*, 1 (7,7%) por isolado de *C. tropicalis* e 1 (7,7%) teve como agente etiológico da candidemia isolados de *C. orthopsilosis*. Vale notar que um paciente (7,7%), apresentou episódio de infecção mista com alternância de isolamento de duas diferentes espécies, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (*sensu stricto*).

A partir dos dados obtidos pode-se observar que houve 100% de correlação entre as identificações geradas pelas metodologias clássica e molecular. Importante mencionar que, na situação específica do paciente 12, conforme esperado, *C. orthopsilosis* foi identificada apenas por métodos moleculares.

A Tabela 6 apresenta as identificações fenotípicas e moleculares obtidas, bem como os valores de identidade máxima, cobertura e *e-value* fornecidos pelo *BLAST*.

Tabela 6. Identificações fenotípica e molecular obtidas para os 53 isolados de *Candida* spp. utilizadas no presente estudo.

Paciente	Nº LEMI	Data do isolamento	Identificação Fenotípica	Identificação Molecular			
				Espécie	ID MAX*. (%)**	Cobertura (%)	e-value
01	7063A	19/11/2010	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	100	99	0.0
	7063B	19/11/2010	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	100	99	0.0
	7071A	23/11/2010	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	100	99	0.0
	7071B	23/11/2010	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	100	99	0.0
	7071C	25/11/2010	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	100	99	0.0
	7071D	25/11/2010	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	100	99	0.0
	7145B	29/11/2010	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	100	99	0.0
	7145C	01/12/2010	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	100	99	0.0
02	7073	01/12/2010	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	100	99	0.0
	7969A	01/04/2011	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	99	99	0.0
03	7969B	12/04/2011	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	99	99	0.0
	7970A	30/04/2011	<i>C. parapsilosis (sensu lato)</i>	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	100	100	0.0
	7970B	13/05/2011	<i>C. parapsilosis (sensu lato)</i>	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	100	99	0.0
04	7970C	21/05/2011	<i>C. parapsilosis (sensu lato)</i>	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	100	100	0.0
	6859A	15/09/2011	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	100	100	0.0
05	6859B	23/09/2011	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	100	100	0.0
	7108A	09/11/2011	<i>C. parapsilosis (sensu lato)</i>	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	99	98	0.0
06	7108B	22/11/2011	<i>C. parapsilosis (sensu lato)</i>	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	99	98	0.0
	7252A	18/10/2011	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	99	99	0.0
07	7252B	21/10/2011	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	99	99	0.0
	8084B	25/05/2011	<i>C. parapsilosis (sensu lato)</i>	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	100	99	0.0
	8084C	25/05/2011	<i>C. parapsilosis (sensu lato)</i>	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	100	99	0.0
	8084D	03/06/2011	<i>C. parapsilosis (sensu lato)</i>	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	100	99	0.0
	8084E	06/06/2011	<i>C. parapsilosis (sensu lato)</i>	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	100	99	0.0
	8084F	10/06/2011	<i>C. parapsilosis (sensu lato)</i>	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	100	99	0.0

* Identidade máxima. ** Porcentagem.

Continuação Tabela 6.

Paciente	Nº LEMI	Data do isolamento	Identificação Fenotípica	Identificação Molecular			
				Espécie	ID MAX. (%)	Cobertura (%)	e-value
08	7550A	18/11/2010	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	100	99	0.0
	7550B	18/11/2010	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	100	99	0.0
	7550E	21/11/2010	<i>C. parapsilosis (sensu lato)</i>	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	100	100	0.0
	7550C	22/11/2010	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	100	99	0.0
	7550D	22/11/2010	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	100	99	0.0
	7550F	30/11/2010	<i>C. parapsilosis (sensu lato)</i>	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	100	100	0.0
09	8046A	01/06/2011	<i>C. parapsilosis (sensu lato)</i>	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	99	100	0.0
	8046B	01/06/2011	<i>C. parapsilosis (sensu lato)</i>	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	100	99	0.0
	8046C	01/06/2011	<i>C. parapsilosis (sensu lato)</i>	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	100	100	0.0
	8046D	04/06/2011	<i>C. parapsilosis (sensu lato)</i>	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	100	100	0.0
	8046E	06/06/2011	<i>C. parapsilosis (sensu lato)</i>	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	99	100	0.0
10	6923A	29/07/2011	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	100	99	0.0
	6923B	05/08/2011	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	100	99	0.0
	6923C	08/08/2011	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	100	99	0.0
11	7456A	31/01/2011	<i>C. parapsilosis (sensu lato)</i>	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	100	100	0.0
	7456B	31/01/2011	<i>C. parapsilosis (sensu lato)</i>	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	100	100	0.0
	7456C	04/02/2011	<i>C. parapsilosis (sensu lato)</i>	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	100	100	0.0
	7456D	04/02/2011	<i>C. parapsilosis (sensu lato)</i>	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	100	100	0.0
	7456E	08/02/2011	<i>C. parapsilosis (sensu lato)</i>	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	99	100	0.0
12	7823A	01/04/2011	<i>C. parapsilosis (sensu lato)</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	100	99	0.0
	7823B	01/04/2011	<i>C. parapsilosis (sensu lato)</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	100	99	0.0
	7823C	09/04/2011	<i>C. parapsilosis (sensu lato)</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	100	99	0.0
	7823D	09/04/2011	<i>C. parapsilosis (sensu lato)</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	100	99	0.0
	7823E	17/04/2011	<i>C. parapsilosis (sensu lato)</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	100	99	0.0
	7823F	17/04/2011	<i>C. parapsilosis (sensu lato)</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	100	99	0.0
13	7876A	13/05/2011	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	100	99	0.0
	7876B	16/05/2011	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	100	99	0.0
	7876C	17/05/2011	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	100	99	0.0

* Identidade máxima. ** Porcentagem.

4.2. Testes de susceptibilidade *in vitro* de *Candida* spp. aos antifúngicos.

Os perfis de susceptibilidade das 53 cepas de *Candida* spp. aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol, voriconazol, caspofungina e anidulafungina foram analisados pelo método de microdiluição em caldo. Em todos os ensaios foi incluído, entre as amostras testadas, organismos-controle de *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258. A variação dos valores de CIMs destes organismos-controle, nos diferentes ensaios, foi compatível com aqueles esperados pela metodologia do CLSI documento M27-S4, 2012.

A partir da análise de susceptibilidade *in vitro*, foi possível observar que os 48 (90,5% de 53 cepas) isolados de *Candida* provenientes dos pacientes de números 1 (9 isolados de *C. albicans*), 3 (3 isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*)), 4 (2 isolados de *C. tropicalis*), 5 (2 isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*)), 6 (2 isolados de *C. albicans*), 7 (5 isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*)), 8 (6 isolados de *C. orthopsilosis*), 9 (5 isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*)), 11 (5 isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*)), 12 (6 isolados de *C. orthopsilosis*) e 13 (3 isolados de *C. albicans*) foram sensíveis aos cinco antifúngicos testados.

Importante observar que todos os isolados de *C. krusei* (n = 5) obtidos de dois pacientes com candidemia persistente (paciente 2 e paciente 10) apresentaram CIMs compatíveis com o fenótipo de resistência à caspofungina, sendo os isolados do paciente 2 foram intermediários à anidulafungina. Além disso, *C. krusei* é classificada como intrinsecamente resistente ao fluconazol (CLSI-documento M27-S4, 2012).

Vale ainda mencionar que não foi observado aumento significativo dos valores de CIM aos antifúngicos entre os isolados sequenciais obtidos de um mesmo paciente ao longo do tratamento.

Em relação ao paciente 11 (5 isolados de *C. parapsilosis*) notamos que as amostras sequenciais apresentaram CIM = 0,5 a 1,0 para fluconazol e CIM= 0,5 a 1,0 para anfotericina B. Interpretamos estes resultados como dentro do

intervalo de reprodutibilidade do teste utilizado, que são aceitos como resultados díspares até \pm uma diluição.

A Tabela 7 ilustra os valores de CIM obtidos para os 53 isolados clínicos de *Candida* spp. frente aos antifúngicos avaliados neste estudo.

Tabela 7. Padrão de susceptibilidade dos isolados de *Candida* aos quatro antifúngicos testados.

Paciente	Nº LEMI	Data do isolamento	Espécie	Antifúngicos				
				AMB	FCZ	VCZ	CSF	ANF
01	7063A	19/11/2010	<i>C. albicans</i>	0,5	0,125	0,03	0,03	0,03
	7063B	19/11/2010	<i>C. albicans</i>	0,5	0,125	0,03	0,03	0,03
	7071A	23/11/2010	<i>C. albicans</i>	0,5	0,125	0,03	0,03	0,03
	7071B	23/11/2010	<i>C. albicans</i>	0,5	0,125	0,03	0,03	0,03
	7071C	25/11/2010	<i>C. albicans</i>	0,5	0,125	0,03	0,03	0,03
	7071D	25/11/2010	<i>C. albicans</i>	0,5	0,125	0,03	0,03	0,03
	7145B	29/11/2010	<i>C. albicans</i>	0,5	0,125	0,03	0,03	0,03
	7145C	01/12/2010	<i>C. albicans</i>	0,5	0,125	0,03	0,03	0,03
	7073	01/12/2010	<i>C. albicans</i>	0,5	0,125	0,03	0,03	0,03
02	7969A	01/04/2011	<i>C. krusei</i>	0,5	16,0	0,25	1,0	0,5
	7969B	12/04/2011	<i>C. krusei</i>	0,5	16,0	0,25	1,0	0,5
03	7970A	30/04/2011	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	0,5	2,0	0,06	1,0	2,0
	7970B	13/05/2011	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	0,5	2,0	0,06	1,0	2,0
	7970C	21/05/2011	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	0,5	2,0	0,06	1,0	2,0
04	6859A	15/09/2011	<i>C. tropicalis</i>	0,25	0,25	0,03	0,25	0,06
	6859B	23/09/2011	<i>C. tropicalis</i>	0,25	0,25	0,03	0,25	0,06
05	7108A	09/11/2011	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	0,5	0,25	0,03	1,0	1,0
	7108B	22/11/2011	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	0,5	0,25	0,03	1,0	2,0
06	7252A	18/10/2011	<i>C. albicans</i>	0,25	0,125	0,03	0,25	0,06
	7252B	21/10/2011	<i>C. albicans</i>	0,25	0,125	0,03	0,25	0,06
07	8084B	25/05/2011	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	0,5	0,25	0,03	1,0	2,0
	8084C	25/05/2011	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	0,5	0,25	0,03	1,0	2,0
	8084D	03/06/2011	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	0,5	0,25	0,03	1,0	2,0
	8084E	06/06/2011	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	0,5	0,25	0,03	1,0	2,0
	8084F	10/06/2011	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	0,5	0,25	0,03	1,0	2,0

AMB – anfotericina B. FCZ - fluconazol. VCZ - voriconazol. CSF - caspofungina. ANF - anidulafungina.

Continuação Tabela 7.

Paciente	Nº LEMI	Data do isolamento	Espécie	Antifúngicos				
				AMB	FCZ	VCZ	CSF	ANF
08	7550A	18/11/2010	<i>C. tropicalis</i>	0,25	0,125	0,03	0,25	0,25
	7550B	18/11/2010	<i>C. tropicalis</i>	0,25	0,125	0,03	0,25	0,25
	7550E	21/11/2010	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	0,5	0,25	0,03	1,0	2,0
	7550C	22/11/2010	<i>C. tropicalis</i>	0,25	0,125	0,03	0,25	0,25
	7550D	22/11/2010	<i>C. tropicalis</i>	0,25	0,125	0,03	0,25	0,25
	7550F	30/11/2010	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	0,5	0,25	0,03	1,0	2,0
09	8046A	01/06/2011	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	1,0	0,125	0,03	0,5	0,5
	8046B	01/06/2011	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	1,0	0,125	0,03	0,5	0,5
	8046C	01/06/2011	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	1,0	0,125	0,03	0,5	0,5
	8046D	04/06/2011	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	1,0	0,125	0,03	0,5	0,5
	8046E	06/06/2011	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	1,0	0,125	0,03	0,5	0,5
10	6923A	29/07/2011	<i>C. krusei</i>	0,5	16,0	0,25	1,0	0,03
	6923B	05/08/2011	<i>C. krusei</i>	0,5	16,0	0,25	1,0	0,03
	6923C	08/08/2011	<i>C. krusei</i>	0,5	16,0	0,25	1,0	0,03
11	7456A	31/01/2011	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	0,5	0,5	0,03	2,0	2,0
	7456B	31/01/2011	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	0,5	0,5	0,03	2,0	2,0
	7456C	04/02/2011	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	0,5	1,0	0,03	2,0	2,0
	7456D	04/02/2011	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	1,0	1,0	0,03	2,0	2,0
	7456E	08/02/2011	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	1,0	1,0	0,03	2,0	2,0
12	7823A	01/04/2011	<i>C. orthopsilosis</i>	0,5	0,25	0,03	1,0	1,0
	7823B	01/04/2011	<i>C. orthopsilosis</i>	0,5	0,25	0,03	1,0	1,0
	7823C	09/04/2011	<i>C. orthopsilosis</i>	0,5	0,25	0,03	1,0	1,0
	7823D	09/04/2011	<i>C. orthopsilosis</i>	0,5	0,25	0,03	1,0	1,0
	7823E	17/04/2011	<i>C. orthopsilosis</i>	0,5	0,25	0,03	1,0	1,0
	7823F	17/04/2011	<i>C. orthopsilosis</i>	0,5	0,25	0,03	1,0	1,0
13	7876A	13/05/2011	<i>C. albicans</i>	0,25	0,125	0,03	0,03	0,03
	7876B	16/05/2011	<i>C. albicans</i>	0,25	0,125	0,03	0,03	0,03
	7876C	17/05/2011	<i>C. albicans</i>	0,25	0,125	0,03	0,03	0,03

AMB – anfotericina B. FCZ - fluconazol. VCZ - voriconazol. CSF - caspofungina. ANF - anidulafungina.

4.3. Análise dos mecanismos de resistência às equinocandinas expressos por isolados de *Candida* spp.

4.3.1. Análise de mutações nas regiões HS1 e HS2 do gene *FKS1*.

Os 53 isolados utilizados neste estudo foram submetidos a ensaios moleculares para análise de mecanismos de resistência. Todas as cepas tiveram o DNA extraído e as regiões HS1 e HS2 amplificadas e submetidas ao sequenciamento.

Após o sequenciamento, as sequências consenso geradas para cada região foram alinhadas e analisadas quanto à ocorrência de mutações por meio de comparação com as sequências disponíveis no *GenBank* de isolados referência sensíveis às equinocandinas: *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. albicans* ATCC 90028, *C. krusei* ATCC 6258, *C. orthopsilosis* ATCC 96139, *C. tropicalis* MYA-3404, com números de acesso EU221325.1, GQ456066.1, EF426563.1, XM_003867859.1 e XM_002550462.1, respectivamente.

Conforme mostrado na Tabela 8, nenhum dos isolados analisados apresentou mutações relacionadas aos sítios já descritos como associados à resistência às equinocandinas (regiões HS1 e HS2 do gene *FKS1*). Utilizando como referência para genótipo de resistência apenas os genes já descritos, todos os 53 isolados testados seriam considerados como selvagens.

Com exceção do paciente 8, todas as cepas de um mesmo paciente apresentaram a mesma sequência nucleotídica, ou seja, foram infectados por um único haplótipo representativo da espécie em questão. No caso específico do paciente 8, apenas o primeiro isolado de *C. tropicalis* apresentou três mutações na região HS2: T → C, T → C e T → C, nas posições 4107, 4122 e 4125, respectivamente, enquanto os demais isolados dessa espécie (2º, 4º e 5º isolados) não apresentaram mutações. Importante mencionar que mesmo ocorrendo na região HS2, essas mutações foram sinônimas, não havendo alteração na sequência de aminoácidos. Claramente, documentamos 2 haplótipos diferentes nas 4 cepas de *C. tropicalis* que infectaram o paciente 8.

Tabela 8. Sequências nucleotídica e de aminoácido correspondentes às regiões HS1 e HS2 do gene *FKS1* de *Candida spp.*

PCT	Isolado		Genótipo		Sequência Nucleotídica		Sequência de aa	
	Nº LEMI	Espécie	HS1	HS2	HS1	HS2	HS1	HS2
	ATCC 90028				TTCTTGACWTTGTCTTTAAGAGATCCT	GATTGGATTAGACGTTATACTTTG	FLTSLRDP	DWIRRYTL
01	7063A	Ca	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCTTTAAGAGATCCT	GATTGGATTAGACGTTATACTTTG	FLTSLRDP	DWIRRYTL
	7063B	Ca	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCTTTAAGAGATCCT	GATTGGATTAGACGTTATACTTTG	FLTSLRDP	DWIRRYTL
	7071A	Ca	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCTTTAAGAGATCCT	GATTGGATTAGACGTTATACTTTG	FLTSLRDP	DWIRRYTL
	7071B	Ca	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCTTTAAGAGATCCT	GATTGGATTAGACGTTATACTTTG	FLTSLRDP	DWIRRYTL
	7071C	Ca	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCTTTAAGAGATCCT	GATTGGATTAGACGTTATACTTTG	FLTSLRDP	DWIRRYTL
	7071D	Ca	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCTTTAAGAGATCCT	GATTGGATTAGACGTTATACTTTG	FLTSLRDP	DWIRRYTL
	7145B	Ca	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCTTTAAGAGATCCT	GATTGGATTAGACGTTATACTTTG	FLTSLRDP	DWIRRYTL
	7145C	Ca	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCTTTAAGAGATCCT	GATTGGATTAGACGTTATACTTTG	FLTSLRDP	DWIRRYTL
	7073	Ca	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCTTTAAGAGATCCT	GATTGGATTAGACGTTATACTTTG	FLTSLRDP	DWIRRYTL
	ATCC 6258				TTCCATTATTTGTCCATTAGAGATCCA	GATTGGATTAGACGTTATACATTATTC	FLILSIRDP	DWIRRYTSL
02	7969A	Ck	wt	wt	TTCCATTATTTGTCCATTAGAGATCCA	GATTGGATTAGACGTTATACATTATTC	DWIRRYTL	DWIRRYTSL
	7969B	Ck	wt	wt	TTCCATTATTTGTCCATTAGAGATCCA	GATTGGATTAGACGTTATACATTATTC	DWIRRYTL	DWIRRYTSL
	ATCC 22019				TTCTTGACTTTGTCCATTGAGAGATGCT	GACTGGATTAGACGTTACACCTTG	FLTSLRDA	DWIRRYTL
03	7970A	Cp	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCCATTGAGAGATGCT	GACTGGATTAGACGTTACACCTTG	FLTSLRDA	DWIRRYTL
	7970B	Cp	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCCATTGAGAGATGCT	GACTGGATTAGACGTTACACCTTG	FLTSLRDA	DWIRRYTL
	7970C	Cp	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCCATTGAGAGATGCT	GACTGGATTAGACGTTACACCTTG	FLTSLRDA	DWIRRYTL
	MYA – 3404				TTCTTGACTTTGTCTTTAAGAGATCCA	GATTGGATTAGACGTTATACTTTG	FLTSLRDP	DWIRRYTL
04	6859A	Ct	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCTTTAAGAGATCCA	GATTGGATTAGACGTTATACTTTG	FLTSLRDP	DWIRRYTL
	6859B	Ct	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCTTTAAGAGATCCA	GATTGGATTAGACGTTATACTTTG	FLTSLRDP	DWIRRYTL
	ATCC 22019				TTCTTGACTTTGTCCATTGAGAGATGCT	GACTGGATTAGACGTTACACCTTG	FLTSLRDA	DWIRRYTL
05	7108A	Cp	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCCATTGAGAGATGCT	GACTGGATTAGACGTTACACCTTG	FLTSLRDA	DWIRRYTL
	7108B	Cp	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCCATTGAGAGATGCT	GACTGGATTAGACGTTACACCTTG	FLTSLRDA	DWIRRYTL
	ATCC 90028				TTCTTGACWTTGTCTTTAAGAGATCCT	GATTGGATTAGACGTTATACTTTG	FLTSLRDP	DWIRRYTL
06	7252A	Ca	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCTTTAAGAGATCCT	GATTGGATTAGACGTTATACTTTG	FLTSLRDP	DWIRRYTL
	7252B	Ca	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCTTTAAGAGATCCT	GATTGGATTAGACGTTATACTTTG	FLTSLRDP	DWIRRYTL
	ATCC 22019				TTCTTGACTTTGTCCATTGAGAGATGCT	GACTGGATTAGACGTTACACCTTG	FLTSLRDA	DWIRRYTL
07	8084B	Cp	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCCATTGAGAGATGCT	GACTGGATTAGACGTTACACCTTG	FLTSLRDA	DWIRRYTL
	8084C	Cp	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCCATTGAGAGATGCT	GACTGGATTAGACGTTACACCTTG	FLTSLRDA	DWIRRYTL
	8084D	Cp	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCCATTGAGAGATGCT	GACTGGATTAGACGTTACACCTTG	FLTSLRDA	DWIRRYTL
	8084E	Cp	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCCATTGAGAGATGCT	GACTGGATTAGACGTTACACCTTG	FLTSLRDA	DWIRRYTL
	8084F	Cp	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCCATTGAGAGATGCT	GACTGGATTAGACGTTACACCTTG	FLTSLRDA	DWIRRYTL

PCT – paciente. Ca – *C. albicans*. Ck – *C. krusei*. Cp – *C. parapsilosis (sensu stricto)*. Ct – *C. tropicalis*. Co – *C. orthopsilosis*. wt – wild type. W- A ou T. aa – aminoácido.

Continuação Tabela 8.

PCT	Isolado		Genótipo		Sequência Nucleotídica		Sequência de AA	
	Nº LEMI	Espécie	HS1	HS2	HS1	HS2	HS1	HS2
08	MYA-3404				TTCTTGACTTTGTCTTTAAGAGATCCA	GATTGGATTAGACGTTATACTTTG	FLTLSLRDP	DWIRRYTL
	7550A	Ct	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCTTTAAGAGATCCA	GACTGGATTAGACGTTACACCTTG	FLTLSLRDP	DWIRRYTL
	7550B	Ct	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCTTTAAGAGATCCA	GATTGGATTAGACGTTATACTTTG	FLTLSLRDP	DWIRRYTL
	7550C	Ct	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCTTTAAGAGATCCA	GATTGGATTAGACGTTATACTTTG	FLTLSLRDP	DWIRRYTL
	7550D	Ct	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCTTTAAGAGATCCA	GATTGGATTAGACGTTATACTTTG	FLTLSLRDP	DWIRRYTL
	ATCC 22019				TTCTTGACTTTGTCATTGAGAGATGCT	GACTGGATTAGACGTTACACCTTG	FLTLSLRDA	DWIRRYTL
	7550E	Cp	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCATTGAGAGATGCT	GACTGGATTAGACGTTACACCTTG	FLTLSLRDA	DWIRRYTL
	7550F	Cp	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCATTGAGAGATGCT	GACTGGATTAGACGTTACACCTTG	FLTLSLRDA	DWIRRYTL
09	ATCC 22019				TTCTTGACTTTGTCATTGAGAGATGCT	GACTGGATTAGACGTTACACCTTG	FLTLSLRDA	DWIRRYTL
	8046A	Cp	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCATTGAGAGATGCT	GACTGGATTAGACGTTACACCTTG	FLTLSLRDA	DWIRRYTL
	8046B	Cp	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCATTGAGAGATGCT	GACTGGATTAGACGTTACACCTTG	FLTLSLRDA	DWIRRYTL
	8046C	Cp	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCATTGAGAGATGCT	GACTGGATTAGACGTTACACCTTG	FLTLSLRDA	DWIRRYTL
	8046D	Cp	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCATTGAGAGATGCT	GACTGGATTAGACGTTACACCTTG	FLTLSLRDA	DWIRRYTL
	8046E	Cp	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCATTGAGAGATGCT	GACTGGATTAGACGTTACACCTTG	FLTLSLRDA	DWIRRYTL
10	ATCC 6258				TTCTTGACTTTGTCATTGAGAGATGCT	GACTGGATTAGACGTTACACCTTG	FLTLSLRDA	DWIRRYTL
	6923A	Ck	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCATTGAGAGATGCT	GATTGGATTAGACGTTATACTTTG	FLILSIRDP	DWIRRYTLS
	6923B	Ck	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCATTGAGAGATGCT	GATTGGATTAGACGTTATACTTTG	FLILSIRDP	DWIRRYTLS
	6923C	Ck	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCATTGAGAGATGCT	GATTGGATTAGACGTTATACTTTG	FLILSIRDP	DWIRRYTLS
11	ATCC 22019				TTCTTGACTTTGTCATTGAGAGATGCT	GACTGGATTAGACGTTACACCTTG	FLTLSLRDA	DWIRRYTL
	7456A	Cp	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCATTGAGAGATGCT	GACTGGATTAGACGTTACACCTTG	FLTLSLRDA	DWIRRYTL
	7456B	Cp	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCATTGAGAGATGCT	GACTGGATTAGACGTTACACCTTG	FLTLSLRDA	DWIRRYTL
	7456C	Cp	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCATTGAGAGATGCT	GACTGGATTAGACGTTACACCTTG	FLTLSLRDA	DWIRRYTL
	7456D	Cp	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCATTGAGAGATGCT	GACTGGATTAGACGTTACACCTTG	FLTLSLRDA	DWIRRYTL
	7456E	Cp	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCATTGAGAGATGCT	GACTGGATTAGACGTTACACCTTG	FLTLSLRDA	DWIRRYTL
12	ATCC 96139				TTCTTGACTTTGTCATTGAGAGATGCT	GATTGGGTTAGACGTTATACTTTG	FLTLSLRDA	DWVRRYTL
	7823A	Co	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCATTGAGAGATGCT	GATTGGGTTAGACGTTATACTTTG	FLTLSLRDA	DWVRRYTL
	7823B	Co	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCATTGAGAGATGCT	GATTGGGTTAGACGTTATACTTTG	FLTLSLRDA	DWVRRYTL
	7823C	Co	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCATTGAGAGATGCT	GATTGGGTTAGACGTTATACTTTG	FLTLSLRDA	DWVRRYTL
	7823D	Co	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCATTGAGAGATGCT	GATTGGGTTAGACGTTATACTTTG	FLTLSLRDA	DWVRRYTL
	7823E	Co	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCATTGAGAGATGCT	GATTGGGTTAGACGTTATACTTTG	FLTLSLRDA	DWVRRYTL
	7823F	Co	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCATTGAGAGATGCT	GATTGGGTTAGACGTTATACTTTG	FLTLSLRDA	DWVRRYTL

PCT – paciente. Ca – *C. albicans*. Ck – *C. krusei*. Cp – *C. parapsilosis (sensu stricto)*. Ct – *C. tropicalis*. Co – *C. orthopsilosis*. wt – wild type. W- A ou T. aa – aminoácido.

Continuação Tabela 8.

PCT	Isolado		Genótipo		Sequência Nucleotídica		Sequência de aa	
	Nº LEMI	Espécie	HS1	HS2	HS1	HS2	HS1	HS2
	ATCC 90028				TTCTTGACWTTGTCTTTAAGAGATCCT	GATTGGATTAGACGTTATACTTTG	FTLSLRDP	DWIRRYTL
13	7876A	Ca	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCTTTAAGAGATCCT	GATTGGATTAGACGTTATACTTTG	FTLSLRDP	DWIRRYTL
	7876B	Ca	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCTTTAAGAGATCCT	GATTGGATTAGACGTTATACTTTG	FTLSLRDP	DWIRRYTL
	7876C	Ca	wt	wt	TTCTTGACTTTGTCTTTAAGAGATCCT	GATTGGATTAGACGTTATACTTTG	FTLSLRDP	DWIRRYTL

PCT – paciente. Ca – *C. albicans*. Ck – *C. krusei*. Cp – *C. parapsilosis (sensu stricto)*. Ct – *C. tropicalis*. Co – *C. orthopsilosis*. wt – wild type. W – A ou T. aa – aminoácido.

4.3.2. Análise do perfil de mutação nas regiões que flanqueiam as regiões HS1 e HS2 do gene *FKS1*.

Como podemos observar na Tabela 8, as regiões HS1 e HS2 são compostas por 27 e 24 nucleotídeos, respectivamente, e representam uma pequena porção do gene *FKS1*, este composto por aproximadamente 5.600 nucleotídeos, dependendo da espécie de *Candida*. Além dessas regiões específicas, foram analisadas, ainda, sequências próximas a estas e cujo tamanho variaram de 520 – 761 nucleotídeos e de 441 – 667 nucleotídeos para os HS1 e HS2, respectivamente, dependendo da espécie de *Candida* analisada. A Tabela 9 ilustra a ocorrência de mutações nessas regiões, indicando o tipo de alteração nucleotídica, a posição e as possíveis trocas de aminoácidos.

Através dessa análise foi possível observar que a maioria dos isolados apresentaram mutações nas regiões que flanqueiam as HS1 e HS2 do gene *FKS1*, com exceção dos isolados dos pacientes 5, 7, 9 e 12. De fato, os dois isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) provenientes do paciente 5, bem como os dez isolados da mesma espécie pertencentes aos pacientes 7 e 9 (5 isolados cada um), não apresentaram mutações nessas regiões. Da mesma forma, nenhuma mutação foi detectada nos seis isolados de *C. orthopsilosis* provenientes do paciente 12.

Por outro lado, os isolados de *C. albicans* dos pacientes 1, 6 e 13 (n= 9, 2 e 3 isolados, respectivamente) apresentaram diversas mutações sinônimas nas regiões próximas aos HS1 e HS2. Os isolados do paciente 1 apresentaram mutações nas posições 1929 (A → W), 2346 (C → T) e 4230 (C → T), e os do paciente 13 nas posições 1929 (A → W) e 2253 (G → A). Os isolados do paciente 6 apresentaram apenas uma mutação na posição 4230 (C → T). De forma semelhante, os dois isolados de *C. tropicalis* do paciente 4 apresentaram mutações silenciosas nas posições 1752 (G → S), 2715 (C → T) e 2718 (C → T). Vale ressaltar que em alguns isolados foi possível observar a presença de heterozigose, representada pelas letras “W” e “S” (A/T e C/G, respectivamente).

Além de mutações sinônimas foi possível observar mudanças que acarretaram na troca de aminoácidos (Tabela 9). Os dois isolados de *C. krusei* recuperados do paciente 2, bem como os três isolados da mesma espécie recuperados do paciente 10, apresentaram, além de mutação silenciosa na posição 2016 (G → A), mutação não sinônima na posição 2101 (C → A), a qual resultou na troca dos aminoácidos leucina por metionina no aminoácido da posição 701.

Os três isolados de *C. parapsilosis (sensu stricto)*, pertencentes ao paciente 3, apresentaram troca de uma valina por uma isoleucina na posição 595 da sequência de aminoácido como resposta à alteração de bases na posição 1783 (G → A). Além desta alteração, esses isolados apresentaram ainda mutação sinônima na posição 2087 (A → T). Em relação ao paciente 11, todos os cinco isolados de *C. parapsilosis (sensu stricto)* apresentam mutação na posição 4178 (A → G) conferindo troca de ácido glutâmico por uma glicina na posição 1393 da sequência de aminoácidos.

Importante ressaltar que, exceto pelo paciente 8, em todos os isolados de um mesmo paciente um único genótipo para as regiões gênicas analisadas foi observado (Tabela 8). O encontro dessas mutações em todos os isolados sugere que a persistência da candidemia tenha sido provocada por um único isolado.

O paciente de número 8 representou um caso específico, principalmente pela alternância do isolamento de *C. tropicalis* (1º, 2º, 4º e 5º isolados) e *C. parapsilosis (sensu stricto)* (3º e 6º isolados). Em relação aos isolados de *C. parapsilosis* não foram detectadas mutações nas regiões analisadas. Por outro lado, foram observadas diferenças em relação ao primeiro isolado de *C. tropicalis* e os demais isolados dessa mesma espécie. Enquanto o primeiro isolado não apresentou nenhuma mutação nas regiões analisadas, para os demais isolados (2º, 4º e 5º) foi possível observar a presença de heterozigose na posição 1752 (G → S), a qual não acarretou em troca de aminoácidos. Apesar de se tratar de mutação sinônima, percebe-se que o primeiro isolado de *C. tropicalis* apresentou perfil de mutação diferente dos demais isolados da mesma espécie, tanto em relação à região específica

do HS2 quanto às regiões que flanqueiam o HS1. Esses dados sugerem que o primeiro isolado de *C. tropicalis* seja genotipicamente diferente daqueles recuperados das hemoculturas sequenciais.

Tabela 9. Mutações detectadas em regiões próximas aos HS1 e HS2 do gene *FKS1* de *Candida* spp.

Paciente	Isolado		Posições	Mutações	Aminoácidos
	Nº LEMI	Espécie			
01	7063A	<i>C. albicans</i>	1929 / 2346 / 4230	A → W* / C → T / C → T	Ø / Ø / Ø
	7063B	<i>C. albicans</i>	1929 / 2346 / 4230	A → W* / C → T / C → T	Ø / Ø / Ø
	7071A	<i>C. albicans</i>	1929 / 2346 / 4230	A → W* / C → T / C → T	Ø / Ø / Ø
	7071B	<i>C. albicans</i>	1929 / 2346 / 4230	A → W* / C → T / C → T	Ø / Ø / Ø
	7071C	<i>C. albicans</i>	1929 / 2346 / 4230	A → W* / C → T / C → T	Ø / Ø / Ø
	7071D	<i>C. albicans</i>	1929 / 2346 / 4230	A → W* / C → T / C → T	Ø / Ø / Ø
	7145B	<i>C. albicans</i>	1929 / 2346 / 4230	A → W* / C → T / C → T	Ø / Ø / Ø
	7145C	<i>C. albicans</i>	1929 / 2346 / 4230	A → W* / C → T / C → T	Ø / Ø / Ø
02	7969A	<i>C. krusei</i>	2016 / 2101	G → A / C → A	Ø / L701M
	7969B	<i>C. krusei</i>	2016 / 2101	G → A / C → A	Ø / L701M
03	7970A	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	1783 / 2087	G → A / A → T*	V595I / Ø
	7970B	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	1783 / 2087	G → A / A → T*	V595I / Ø
	7970C	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	1783 / 2087	G → A / A → T*	V595I / Ø
04	6859A	<i>C. tropicalis</i>	1752 / 2715 / 2718	G → S** / C → T / C → T	Ø / Ø / Ø
	6859B	<i>C. tropicalis</i>	1752 / 2715 / 2718	G → S** / C → T / C → T	Ø / Ø / Ø
06	7252A	<i>C. albicans</i>	4230	C → T	Ø
	7252B	<i>C. albicans</i>	4230	C → T	Ø
08	7550A	<i>C. tropicalis</i>	-	-	-
	7550B	<i>C. tropicalis</i>	1752	G → S**	Ø
	7550E	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	-	-	-
	7550C	<i>C. tropicalis</i>	1752	G → S**	Ø
	7550D	<i>C. tropicalis</i>	1752	G → S**	Ø
	7550F	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	-	-	-
10	6923A	<i>C. krusei</i>	2016 / 2101	G → A / C → A	Ø / L701M
	6923B	<i>C. krusei</i>	2016 / 2101	G → A / C → A	Ø / L701M
	6923C	<i>C. krusei</i>	2016 / 2101	G → A / C → A	Ø / L701M

Ø – mutação do tipo sinônima, não conferindo troca de aminoácido. * - posição que apresenta heterozigose A e T. ** - posição que apresenta heterozigose C e G.

Continuação Tabela 9.

Paciente	Isolado		Posições	Mutações	Aminoácidos
	Nº LEMI	Espécie			
11	7456A	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	4178	A → G	E1393G
	7456B	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	4178	A → G	E1393G
	7456C	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	4178	A → G	E1393G
	7456D	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	4178	A → G	E1393G
	7456E	<i>C. parapsilosis (sensu stricto)</i>	4178	A → G	E1393G
13	7876A	<i>C. albicans</i>	1929 / 2253	A → W* / G → A	∅ / ∅
	7876B	<i>C. albicans</i>	1929 / 2253	A → W* / G → A	∅ / ∅
	7876C	<i>C. albicans</i>	1929 / 2253	A → W* / G → A	∅ / ∅

∅ – mutação do tipo sinônima, não conferindo troca de aminoácido. * - posição que apresenta heterozigose A e T. ** - posição que apresenta heterozigose C e G.

5.0. DISCUSSÃO

Candidemia permanece como importante problema de saúde pública em hospitais terciários de todo o mundo, em especial na América Latina **(Nucci et al. 2013; Colombo et al. 2013a; Moretti et al. 2013)**.

Entre as complicações associadas aos casos de candidemia inclui-se o quadro de candidemia persistente, basicamente caracterizado como o isolamento contínuo de leveduras do gênero *Candida* em amostras sequenciais de hemocultura após o diagnóstico inicial, mesmo em pacientes expostos ao tratamento antifúngico adequado. Importante mencionar que casos de persistência da infecção estão associados com aumento de risco de infecções em vísceras e de óbito **(Fraser et al. 1992; Nucci 2011)**.

Embora não estejam totalmente estabelecidas, algumas características do hospedeiro têm sido consideradas como predisponentes para a persistência da infecção, o que inclui idade no momento da infecção, uso de nutrição parenteral total, ventilação mecânica, presença de neutropenia, exposição à corticoterapia e outros imunossupressores, bem como ocorrência de endocardite, tromboflebite e presença de dispositivos médicos que possibilitem a persistência do foco infeccioso, como, por exemplo, o uso de CVC infectado com biofilme **(Tumbarello et al. 2007; Fiori et al. 2011; Nucci 2011; Solla-Buceta et al. 2012; Caccesse et al. 2012)**.

A terapêutica antifúngica inadequada, caracterizada tanto pelo uso de antimicrobiano sem atividade contra o patógeno, como pela utilização em dose inadequada ou em associação com outros medicamentos que possam interferir em seus níveis séricos, é também condição que certamente contribui para o insucesso terapêutico, o que pode acarretar em persistência da infecção **(Eschenauer et al. 2007; Kim et al. 2007; Pappas et al. 2009; Ishikawa et al. 2010; Chen et al. 2011)**.

Neste contexto, fica evidente que ICS por isolados de *Candida* spp. resistentes aos antifúngicos tem maior probabilidade de resultarem falha terapêutica e, conseqüentemente, na persistência da infecção **(Rex et al. 2003; Ishikawa et al. 2009; Nucci 2011; Solla-Buceta et al. 2012)**. Dessa forma, o principal objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência de resistência às

equinocandinas em pacientes que apresentaram persistência de ICS por *Candida* spp. a despeito do uso correto deste medicamento.

Após análise dos dados clínicos coletados ao longo do estudo de vigilância RCB observou-se que do total de 436 pacientes, 63 (14,4%) apresentaram candidemia persistente, ou seja, positividade de hemoculturas sequenciais após 48h do início do tratamento pela mesma espécie de *Candida* (**Colombo et al. 2013a**). Em revisão da literatura conduzida por Nucci (2011) acerca de candidemia persistente, foi relatado que nos diversos estudos epidemiológicos analisados, aproximadamente 8-15% dos pacientes com candidemia desenvolvem quadro de persistência da infecção ao longo do tratamento. A proporção de casos de candidemia persistente observada nestes estudos corrobora os dados obtidos na presente investigação.

Em relação às práticas clínicas aplicadas aos pacientes com candidemia, as diretrizes das sociedades americana e brasileira de doenças infecciosas preconizam que os pacientes que apresentam ICS por *Candida* spp. sejam acompanhados através de coleta sequencial de hemocultura após o início da terapia antifúngica (**Pappas et al. 2009; Colombo et al. 2012**). Essa estratégia de coletas sequenciais, em conjunto com a análise dos dados clínicos, tem como objetivo a avaliação do clareamento da hemocultura, dado importante para detecção de possível ocorrência de falha terapêutica e dos casos de candidemia persistente. Apesar dessa recomendação, em nossa casuística foi observado que apenas 188 (43,1%) dos 436 pacientes incluídos no RCB realizaram ao menos uma segunda coleta sequencial de hemocultura, para os quais foi possível avaliar a ocorrência de candidemia persistente. Dessa forma, a avaliação da real incidência dessa complicação não pode ser avaliada adequadamente.

Vale ressaltar que o estudo RCB não tinha como objetivo principal a avaliação dos casos de candidemia persistente e, portanto, a coleta sequencial de hemocultura apenas para 188 pacientes talvez esteja relacionada com o estado crítico em que estes se encontravam e, principalmente, por não apresentarem boa resposta clínica ao tratamento.

A partir dos 63 pacientes que apresentaram candidemia persistente, aplicando-se nossos critérios de exclusão e inclusão, foram selecionados 13 pacientes. Importante mencionar que a aplicação desses critérios teve como finalidade identificar coorte de pacientes com maior risco de terem sido infectados por cepas resistentes às equinocandinas. Neste contexto, foram excluídos condições sabidamente associadas à persistência da hemocultura, como não remoção de CVC, neutropenia e casos de endocardite.

Através da análise dos dados clínicos dos 13 pacientes selecionados, foi observado que a maioria deles apresentou idades em extremos (< 1 ano ou > 65 anos) e estava internado em UTI no momento do diagnóstico. Além disso, aproximadamente 38% fizeram uso de corticoterapia e/ou estavam em uso contínuo de nutrição parenteral total e/ou de ventilação mecânica. Esses dados deixam claro que todos eles estavam em estado crítico e apresentavam associação de diversos fatores predisponentes diretamente ligados ao desenvolvimento de candidemia, bem como à sua persistência (**Colombo et al. 2006; Pappas et al. 2009; Luzzati et al. 2013; Skrobik and Laverdiere, 2013; Nucci et al. 2013**).

Em relação ao agente etiológico dos casos de candidemia persistente, dos 13 pacientes selecionados, 5 deles (38,5%) foram infectados por isolados de *C. parapsilosis (sensu stricto)*, 3 (23%) por *C. albicans*, 2 (15,4%) por *C. krusei*, 1 (7,7%) por *C. tropicalis* e 1 (7,7%) por *C. orthopsilosis*. Vale notar que um paciente (7,7%) apresentou episódio de infecção mista com alternância de isolamento de duas diferentes espécies, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis (sensu stricto)*. Esses dados mostram que em nossa casuística houve prevalência de *C. parapsilosis (sensu lato)* entre os casos que evoluíram com candidemia persistente nos pacientes tratados com equinocandinas.

De fato, estudos sobre o perfil de susceptibilidade *in vitro* das espécies de *C. parapsilosis (sensu lato)* mostraram que esses patógenos apresentam valores de CIMs mais elevados quando comparados às demais espécies de *Candida* (**Garcia-Effron et al. 2008; Gonçalves et al. 2010; Bizerra et al. 2011; Pfaller et al. 2013**). Além disso, diferentes investigações têm mostrado que as equinocandinas possuem atividade predominantemente fungistática

contra isolados de *C. parapsilosis* (*sensu lato*) (**Bizerra et al. 2011; Barchiesi et al. 2006**). Baseados nesses achados, alguns autores têm questionado à eficácia das equinocandinas no tratamento das ICS por isolados do complexo *C. parapsilosis*, sugerindo que o uso dessa classe terapêutica no tratamento de infecções por esse patógeno poderia resultar em maior dificuldade no clareamento da hemocultura e maior probabilidade de persistência da infecção (**Reboli et al. 2007**).

Todavia, em estudo de Colombo e colaboradores (2010) não foram observadas diferenças significativas no tempo de negatização das hemoculturas em pacientes infectados pelas diferentes espécies de *Candida* e expostos ao tratamento com caspofungina. Estudos recentes de meta-análise corroboram os dados de Colombo e colaboradores, mostrando haver boa resposta clínica em episódios de candidemia por *C. parapsilosis* a despeito das CIMs elevadas para equinocandinas (**Andes et al. 2010; Kale-Pradhan et al. 2010**). Segundo os critérios estabelecidos pelo documento M27-S4 (**CLSI M27-S4, 2012**), os isolados desse complexo de espécies, em sua grande maioria, são classificados como sensíveis às equinocandinas.

No presente estudo não foram observados casos de candidemia persistente por isolados de *C. glabrata*. Estudos americanos e europeus têm relatado um aumento dos casos de falha terapêutica em pacientes com ICS por essa espécie durante tratamento com equinocandinas, fenômeno caracterizado pelo não clareamento da hemocultura, o que inclui casos de candidemia persistente (**Costa de Oliveira et al. 2011; Lortholary et al. 2011; Pfaller, 2012; Shields et al. 2012; Durán-Valle et al. 2012; Alexander et al. 2013**). Nota-se ainda que nos últimos anos, houve um aumento das taxas de resistência às equinocandinas entre isolados de *C. glabrata*, associado principalmente pelo aumento do uso terapêutico e/ou empírico dessa classe de antifúngicos (**Alexander et al. 2013; Ostrosky-Zeichner, 2013**). O fato de não termos observado casos de candidemia persistente por *C. glabrata*, bem como não ter sido relatado nenhum caso de resistência às equinocandinas entre isolados dessa espécie durante o estudo RCB, pode estar relacionado com a menor prevalência dessa espécie em centros médicos no Brasil, bem como

pelo uso ainda pouco frequente de equinocandinas em nossos hospitais, principalmente em hospitais públicos (**Colombo et al. 2006; Nucci et al. 2013; Colombo et al. 2013b**).

Ainda em relação à distribuição de espécies de *Candida*, entre os pacientes selecionados para o presente estudo, dois deles apresentaram candidemia persistente por isolados de *C. krusei*. Vale ressaltar que essa espécie representa apenas o 5ª ou 6ª agente de candidemia em hospitais brasileiros, responsável por apenas 4% dos casos de candidemia no estudo RCB (**Colombo et al. 2013a**). Além disso, estudos têm mostrado que de forma geral os isolados de *C. krusei* apresentam-se sensíveis às equinocandinas, com valores de CIM semelhantes àqueles observados para *C. albicans* e *C. tropicalis* (**CLSI M27-S4, 2012; Pfaller et al. 2013**). Parece bem estabelecido que as equinocandinas apresentam excelente eficácia terapêutica em infecções por *C. krusei*, não havendo relatos na literatura acerca de casos de candidemia persistente envolvendo essa espécie durante terapia antifúngica com esta classe de fármaco.

No que se refere ao perfil de susceptibilidade aos antifúngicos exibido pelos isolados recuperados de pacientes com candidemia persistente, são raros os trabalhos que avaliaram essa característica em amostras de *Candida* spp. ao longo da persistência da ICS. De fato, na maioria das investigações somente o primeiro isolado recuperado tem sido submetido a testes de susceptibilidade *in vitro*, acreditando-se que os isolados subsequentes apresentem o mesmo perfil.

No presente estudo, todos os isolados de *Candida* spp. foram submetidos à análise *in vitro* de susceptibilidade aos antifúngicos, não sendo observado aumento significativo dos valores de CIM entre os isolados sequenciais obtidos de um mesmo paciente ao longo do tratamento. Em relação à ocorrência de resistência às equinocandinas, somente cinco isolados, todos identificados como *C. krusei* (2 e 3 isolados dos pacientes 2 e 10, respectivamente), apresentaram fenótipo resistente frente à caspofungina. Cabe ainda ressaltar que os isolados de *C. krusei* do paciente 2 foram classificados como intermediários à anidulafungina. No que diz respeito às

demais drogas antifúngicas, todos os isolados foram classificados como sensíveis às mesmas, com exceção dos isolados de *C. krusei*, os quais são classificados como intrinsecamente resistentes ao fluconazol (**Pfalleret al. 2010**).

Embora apenas 9,4% (5 isolados de *C. krusei*) dos isolados avaliados nesta investigação tenham sido classificados como resistentes às equinocandinas, todas as amostras foram submetidas à análise da sequência do gene *FKS1*, visto que há relatos na literatura de infecções envolvendo isolados de *Candida* spp. que, apesar de serem classificados como sensíveis às equinocandinas, apresentam mutações nos genes *FKS* (**Baixenchi et al. 2007; Arendrup et al. 2009; Garcia-Effron et al. 2009**).

A partir da análise das sequências obtidas para o gene *FKS1*, pode-se notar que nenhum dos isolados analisados apresentou mutações relacionadas aos sítios já descritos como associados à resistência às equinocandinas (regiões HS1 e HS2 do gene *FKS1*), sendo, portanto, classificados como isolados selvagens.

Conforme mencionado anteriormente, as regiões HS1 e HS2 representam apenas uma pequena porção do gene *FKS1*. Dessa forma, foram analisadas, ainda, as porções gênicas que flanqueiam as regiões HS1 e HS2. De maneira geral pode-se observar que a maioria dos isolados apresentou mutações nestas porções, que, na maioria das vezes, foram sinônimas, ou seja, não alteraram a sequência de aminoácidos e, conseqüentemente, a estrutura da proteína codificada. Em relação aos pacientes 3 e 11, ambos acometidos por *C. parapsilosis (sensu stricto)*, foi possível observar a ocorrência de mutação não sinônima nas regiões próximas às HS1 e HS2. No entanto, essas mutações não tiveram impacto nos valores de CIMs quando comparados aos demais isolados dessa mesma espécie.

Por outro lado, os cinco isolados de *C. krusei* provenientes dos pacientes 2 (2 isolados) e 10 (3 isolados), classificados como intermediário e sensível à anidulafungina, respectivamente, e todos classificados como resistentes à caspofungina, apresentaram mutação não sinônima no

nucleotídeo de número 2101, posição esta muito próxima a porção gênica correspondente à região HS1 (1963 – 1989). Para esses pacientes, vale mencionar que a utilização de anidulafungina parece ter sido associada à falha terapêutica. De fato, o paciente 10, cujo tratamento foi iniciado com anidulafungina, apresentou negativação da hemocultura somente após a mudança da terapia antifúngica para anfotericina B lipossomal, após a qual o paciente apresentou boa resposta clínica e recebeu alta. De maneira oposta, o paciente 2, cujo tratamento inicial foi realizado com anfotericina B lipossomal e posteriormente modificado para anidulafungina, não apresentou boa resposta ao tratamento com este antifúngico e foi a óbito. Vale lembrar que os isolados deste último paciente foram classificados como intermediários à anidulafungina (CIM= 0,5 µg/mL). Dessa forma, os achados microbiológicos (persistência da hemocultura positiva e valores elevados de CIM para equinocandinas) sugerem que a mutação observada em regiões próximas ao HS possa ser de alguma forma relacionada ao desfecho clínico negativo durante tratamento com equinocandinas.

Uma indagação a ser feita é se os sucessivos isolados detectados sequencialmente seriam representativos de uma mesma cepa ou representariam infecções sucessivas por cepas distintas da mesma espécie de *Candida*.

De fato, para que se possa afirmar que a persistência da infecção tenha sido causada por um mesmo isolado de *Candida*, é necessário comprovar que todos os isolados recuperados apresentem o mesmo genótipo. Para tanto, metodologias como RAPD, RFLP, análise de microssatélites e, principalmente, MLST tem sido empregadas (**Da Mata et al. 2010; Vanhee et al. 2010; Marcos-Zambrano et al. 2013; Romeo et al. 2013**). Apesar de tais análises não terem sido realizadas no presente estudo, vale mencionar que todos os isolados de um mesmo paciente apresentaram o mesmo perfil de mutações na porção do gene *FKS1* analisada, dado este que sugere que a infecção persistente tenha sido causada pela mesma cepa de *Candida*.

Por outro lado, o paciente 8 apresentou situação específica e curiosa acerca dos isolados recuperados. Além de apresentar alternância de espécies

(*C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (*sensu stricto*)) nas hemoculturas sequenciais, as análises moleculares apontaram que o primeiro isolado de *C. tropicalis* apresentou perfil genotípico distinto dos demais isolados da mesma espécie, enquanto os isolados de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*) apresentaram perfil genotípico idêntico. Esses dados sugerem que tal paciente tenha sido infectado por 3 cepas diferentes, sendo 2 de *C. tropicalis* e 1 cepa de *C. parapsilosis* (*sensu stricto*). Importante mencionar que este indivíduo foi submetido a procedimentos cirúrgicos abdominais, o que poderia explicar a diversidade de cepas provocando ICS, conforme já demonstrado por Da Matta e colaboradores (2010).

Os resultados obtidos ao longo do presente estudo sugerem que os casos de candidemia persistente, especificamente em pacientes submetidos a tratamento com equinocandinas, parecem estar relacionados principalmente com as condições clínicas apresentadas pelos pacientes, ou seja, condições que dificultam a resposta do hospedeiro frente à infecção, principalmente no que se refere à realização de procedimentos médicos invasivos, nutrição parenteral total, corticoterapia, internação em UTI e idade em extremos.

Por outro lado, foi verificado dois casos de candidemia persistente por isolados de *C. krusei*, que apresentaram resistência à caspofungina e sensibilidade intermediária à anidulafungina (paciente 2), sendo observada mutações não sinônimas em região muito próxima a porção gênica correspondente à região HS1 do gene *FKS1*. Como mencionado anteriormente, não há relatos na literatura acerca de casos de candidemia persistente envolvendo *C. krusei* durante tratamento com equinocandinas. Além disso, o paciente infectado pelos isolados de *C. krusei* com sensibilidade intermediária à anidulafungina não apresentou boa resposta à terapia com esse antifúngico e foi a óbito. Há necessidade de estudos posteriores para avaliar o impacto dessa mutação no perfil de susceptibilidade e resposta à terapia antifúngica com equinocandinas em isolados de *C. krusei*. Nesse contexto, os ensaios para análise da atividade de glucana sintase podem representar o método mais eficaz para elucidação desse fenômeno.

A presente investigação deixa claro que, a falha terapêutica e clínica ao tratamento com equinocandina é multifatorial. A resistência às equinocandinas ainda é rara entre isolados de *Candida* spp., mesmo quando analisada em coorte de maior risco para a ocorrência desse fenômeno, como a escolhida no presente trabalho. De qualquer forma, a identificação e análise do perfil de susceptibilidade dos isolados sequenciais de *Candida* spp. obtidos ao longo da persistência da infecção, somados a análise molecular de mecanismos de resistência, são essenciais para que possamos avaliar as reais causas envolvidas no fenômeno de persistência da ICS por *Candida* spp.

6.0. CONCLUSÕES E COMENTÁRIOS

A presente investigação obteve as seguintes conclusões:

1. Entre os 13 pacientes com candidemia persistente selecionados para o presente estudo, 5 (38,5%) foram infectados por *C. parapsilosis* (*sensu stricto*), 3 (23%) por *C. albicans*, 2 (15,4%) por *C. krusei*, 1 (7,7%) por *C. tropicalis* e 1 (7,7%) por *C. orthopsilosis*. Além disso, um paciente (7,7%) apresentou episódio de infecção mista, com alternância de isolamento de duas espécies: *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (*sensu stricto*).

2. Em relação ao perfil de susceptibilidade aos antifúngicos, a grande maioria dos isolados foi classificada como sensível a todos os antifúngicos testados, com exceção dos cinco isolados de *C. krusei* provenientes dos pacientes 2 (dois isolados) e 10 (três isolados). De fato, estes isolados apresentaram CIMs compatíveis com o fenótipo de resistência ao fluconazol e à caspofungina, sendo que dois deles foram intermediários à anidulafungina.

3. Não foi verificado aumento de valores de CIM entre os isolados sequenciais de um mesmo paciente a despeito do tratamento antifúngico utilizado.

4. Nenhum dos isolados apresentou mutação nas regiões HS1 e HS2 do gene *FKS1*, sendo classificados como selvagens em relação aos genótipos de resistência já descritos.

5. Os isolados de *C. krusei* apresentaram mutações não sinônimas em regiões muito próximas ao HS1. Aparentemente os pacientes infectados por estes isolados não apresentaram boa resposta à terapia com anidulafungina. No entanto, estudos posteriores, tanto *in vitro* como *in vivo*, são necessários para analisar o impacto dessas mutações no perfil de susceptibilidade às equinocandinas.

6. A partir da análise molecular dos isolados provenientes do paciente 8, que apresentou alternância do isolamento de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis (sensu stricto)*, pode-se sugerir que esse paciente tenha sido infectado por três diferentes cepas de *Candida*, sendo duas de *C. tropicalis* e uma de *C. parapsilosis (sensu stricto)*.

7. A ocorrência de resistência às equinocandinas ainda permanece rara em nosso meio, mesmo quando analisada em coorte de pacientes com risco elevado à ocorrência de tal fenômeno, principalmente pela exposição a estes antifúngicos.

8. Por fim, pode-se concluir que as características clínicas do paciente parecem ter maior relevância que os mecanismos de resistência às equinocandinas no que se refere à ocorrência de candidemia persistente.

7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **(editor), R. A. C.** 2009. *Candida* and Candidiasis. Richard A. Calderone, Washington, DC.
2. **Alexander B. D., Johnson M. D., Pfeiffer C. D., Jimenez-Ortigosa C., Catania J., Booker R., Castanheira M., Messer A. S., Perlin D. S., Pfaller M. A.** 2013. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clin. Infect. Dis.* **57**:1724–1732.
3. **Andes D., Diekema D. J., Pfaller M. A., Bohrmuller J., Marchillo K., Lepak A.** 2010. In vivo comparison of the pharmacodynamic targets for echinocandin drugs against *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* **54**(6):2497-506.
4. **Arendrup M. C., Kahlmeter G., Rodriguez-Tudela J. L., Donnelly J. P.** 2009. Breakpoints for susceptibility testing should not divide wild-type distributions of important target species. *Antimicrob Agents Chemother* **53**(4):1628-9.
5. **Arendrup M. C., Perlin D. S., Jensen R. H., Howard S. J., Goodwin J., Hope W.** 2012. Differential in vivo activities of anidulafungin, caspofungin, and micafungin against *Candida glabrata* isolates with and without FKS resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother.* **56**(5):2435-2442.
6. **Baixench M. T., Aoun N., Desnos-Ollivier M., Garcia-Hermoso D., Bretagne S., Ramires S., Piketty C., Dannaoui E.** 2007. Acquired resistance to echinocandins in *Candida albicans*: case report and review. *J Antimicrob Chemother.* **59**(6):1076-83.
7. **Balashov S. V., Park S., Perlin D. S.** 2006. Assessing resistance to the echinocandin antifungal drug caspofungin in *Candida albicans* by profiling mutations in *FKS1*. *Antimicrob Agents Chemother.* **50**(6):2058-63.
8. **Barchiesi F., Spreghini E., Tomassetti S., Della Vittoria A., Arzeni D., Manso E., Scalise G.** 2006. Effects of caspofungin against *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* **50**(8):2719-27.
9. **Bassetti M., Taramasso L., Nicco E., Molinari M. P., Mussap M., Viscoli C.** 2011. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility and outcome of nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in Italy. *PLoS One* **6**:e24198.

10. **Ben-Ami R., Garcia-Effron G., Lewis R. E., Gamarra S., Leventakos K., Perlin D. S., Kontoyiannis D. P.** 2011. Fitness and virulence costs of *Candida albicans* *FKS1* hot spot mutations associated with echinocandin resistance. *J Infect Dis.* **15**;204(4):626-35.
11. **Betts R. F., Nucci M., Talwar D., Gareca M., Queiroz-Telles F., Bedimo R. J., Herbrecht R., Ruiz-Palacios G., Young J. A., Baddley J. W., Strohmaier K. M., Tucker K. A., Taylor A. F., Kartsonis N. A.; Caspofungin High-Dose Study Group.** 2009. A multicenter, double-blind trial of a high-dose caspofungin treatment regimen versus a standard caspofungin treatment regimen for adult patients with invasive candidiasis. *Clin Infect Dis* **48**:1676–1684.
12. **Beyda N. D., Lewis R. E., Garey K. W.** 2012. Echinocandin resistance in *Candida* species: mechanisms of reduced susceptibility and therapeutic approaches. *Ann Pharmacother.* **46**(7-8):1086-96.
13. **Bizerra F. C., Nakamura C. V., de Poersch C., Estivalet Svidzinski T. I., Borsato Quesada R. M., Goldenberg S., Krieger M. A., Yamada-Ogatta S. F.** 2008. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS Yeast Res* **8**:442-50.
14. **Bizerra F. C., Melo A. S., Katchburian E., Freymüller E., Straus A. H., Takahashi H. K., Colombo AL.** 2011. Changes in cell wall synthesis and ultrastructure during paradoxical growth effect of caspofungin on four different *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother.* **55**(1):302-10.
15. **Bizerra F. C., Jimenez-Ortigosa C., Souza A. C. R., Breda G. L., Queiroz-Telles F., Perlin D. S., Colombo A. L.** 2013. Breakthrough Candidemia due to multidrug resistant *C. glabrata* during prophylaxis with low dose of micafungin - submitted.
16. **Brito L. R., Guimaraes T., Nucci M., Rosas R. C., Paula Almeida L., Da Matta D. A., Caccese R., Carfagna P., Pistilli N., Massetti A. P., Falcone M., Venditti M.** 2013. *Candida* thrombophlebitis of central veins: case report and review. *Med Mycol.* **50**(3):299-304.
17. **Canton E., Peman J., Quindos G., Eraso E., Miranda-Zapico I., Alvarez M., Merino P., Campos-Herrero I., Marco F., de la Pedrosa E. G., Yague G., Guna R., Rubio C., Miranda C., Pazos C., Velasco D., and F. S. Group.** 2011. Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:5590-6.

18. **Castanheira M., Woosley L. N., Diekema D. J., Messer S. A., Jones R. N., Pfaller M. A.** 2010. Low Prevalence of *fkp1* Hot Spot 1 Mutations in a Worldwide Collection of *Candida* Strains. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**(6):2655–2659.
19. **Chandrasedkar P. H., Sobel J. D.** 2006. Micafungin: a new echinocandin. *Clin Infect Dis.* **15**;42(8):1171-8.
20. **Chen S. C., Slavin M. A., Sorrell T. C.** 2011. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison. *Drugs* **71**(1):11-41.
21. **Clancy C. J., Stanley B., Nguyen M. H.** 2006. In vitro susceptibility of breakthrough *Candida* bloodstream isolates correlates with daily and cumulative doses of fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* **5**(10): 3496-8.
22. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2012. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; fourth informational supplement. CLSI document M27- S4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
23. **Colombo A. L.** 2006. Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *Candida parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. *Med Mycol* **44**:261-6.
24. **Colombo A. L., Thompson L., Graybill J. R.** 2008. The north and south of candidemia: Issues for Latin America. *Drugs Today (Barc)* **44 Suppl A**:1-34.
25. **Colombo A. L., Ngai A. L., Bourque M., Bradshaw S. K., Strohmaier K. M., Taylor A. F., Lupinacci R. J., Kartsonis N. A.** 2010. Caspofungin use in patients with invasive candidiasis caused by common non-albicans *Candida* species: review of the caspofungin database. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**(5):1864-71.
26. **Colombo A. L., Guimarães T., Aranha Camargo L. F., Richtmann R., Queiroz-Telles F., Salles M. J. C., da Cunha C. A., Yasuda M. A. S., Moretti M. L., Nucci M. ; on behalf of the Consenso Brasileiro de Infecções por *Candida* Group.** 2012. Brazilian guidelines for the management of candidiasis: a joint meeting report of three medical societies – Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia, Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *Braz J Infect Dis.* **16 Suppl 1**:S1-S34.

27. **Colombo A. L., Bizerra F. C., Guimarães T., Pasqualotto A., Camargo L.F.A., Salles M., Queiroz-Telles F., Dias V.M.C.H., Didier M. E. V., Querino N., Jimenez- Ortigosa C., Perlin D. S., Nucci M.** 2013a. Brazilian Network of Candidemia: a laboratory -based surveillance study on Candidabloodstream infection in 9 medical centers. **European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.**
28. **Colombo A. L., Garnica M., Aranha Camargo L. F., Da Cunha C. A., Bandeira A. C., Borghi D., Campos T., Senna A. L., Valias Didier M. E., Dias V. C., Nucci M.** 2013b. *Candida glabrata*: an emerging pathogen in Brazilian tertiary care hospitals. *Med Mycol* **51**(1):38-44.
29. **Costa-de-Oliveira S., Marcos Miranda I., Silva R. M., Pinto E., Silva A., Rocha R., Amorim A., Gonçalves Rodrigues A., Pina-Vaz C.** 2011. *FKS2* mutations associated with decreased echinocandin susceptibility of *Candida glabrata* following anidulafungin therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* **55**(3):1312-4.
30. **Da Matta D .A, Melo A. S, Colombo A. L, Frade J. P, Nucci M., Lott T. J.** 2010. Candidemia surveillance in Brazil: evidence for a geographical boundary defining an area exhibiting an abatement of infections by *Candida albicans* group 2 strains. *J Clin Microbiol* **48**(9):3062-7.
31. **Das I, Nightingale P., Patel M., Jumaa P.** 2011. Epidemiology, clinical characteristics, and outcome of candidemia: experience in a tertiary referral center in the UK. *15*(11):e759-63.
32. **Denning D. W.** 2003. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet.* **4**;362(9390):1142-51.
33. **Deresinski S. C., Stevens D. A.** 2003. Caspofungin. *Clin Infect Dis.* **1**;36(11):1445-57.
34. **Durán-Valle M. T., Gago S., Gómez-López A., Cuenca-Estrella M., Jiménez Díez-Canseco L., Gómez-Garcés J. L., Zaragoza O.** 2012. Recurrent episodes of candidemia due to *Candida glabrata* with a mutation in hot spot 1 of the *FKS2* gene developed after prolonged therapy with caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother.* **56**(6):3417-9.
35. **Eggimann P., Garbino J., Pittet D.** 2003. Management of *Candida* species infections in critically ill patients. *Lancet Infect Dis* **3**:772-85.
36. **Eschenauer G., Depestel D. D., Carver P. L.** 2007. Comparison of echinocandin antifungals. *Ther Clin Risk Manag.* **3**(1):71-97.

37. **Evans S. E.** 2010. Coping with *Candida* infections. *Proc Am Thorac Soc* 7:197-203.
38. **Fiori B., Posteraro B., Torelli R., Tumbarello M., Perlin D. S., Fadda G., Sanguinetti M.** 2011. In vitro activities of anidulafungin and other antifungal agents against biofilms formed by clinical isolates of different *Candida* and *Aspergillus* species. *Antimicrob. Agents Chemother* 55(6):3031-5.
39. **Fisher M.C., Henk D.A., Briggs C. J., Brownstein J. S., Madoff L. C, McCraw S. L., Gurr S. J.** 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*. 484(7393):186-94.
40. **Fraser V. J., Jones M., Dunkel J., Storer S., Medoff G., Dunagan W. C.** 1992. Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology, risk factors, and predictors of mortality. *Clin Infect Dis* 15:414–421.
41. **Garcia-Effron G., Katiyar S. K., Park S., Edlind T. D., Perlin DS.** 2008. A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 52(7):2305-12.
42. **Garcia-Effron G., Lee S., Park S., Cleary J. D., Perlin D.S.** 2009. Effect of *Candida glabrata* FKS1 and FKS2 mutations on echinocandin sensitivity and kinetics of 1,3-beta-D-glucan synthase: implication for the existing susceptibility breakpoint. *Antimicrob Agents Chemother*. 53(9):3690-3699.
43. **Garcia-Effron G., Chua D. J., Tomada J. R., Dipersio J., Perlin D. S., Ghannoum M., Bonilla H.** 2010. Novel *FKS* mutations associated with echinocandin resistance in *Candida* species. *Antimicrob. Agents Chemother*. 54:2225–2227.
44. **Giri S. and Kindo A.J.** 2012. A review of *Candida* species causing blood stream infection. *Indian J Med Microbiol* 30(3):270-278.
45. **Goncalves S. S., Amorim C. S., Nucci M., Padovan A. C., Briones M. R., Melo A. S., Colombo A. L.** 2010. Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *Candida parapsilosis* species complex: results from a nationwide surveillance of candidaemia in Brazil. *Clin Microbiol Infect* 16:885-7.
46. **Hajjeh R. A., Sofair A. N., Harrison L. H., Lyon G. M., Arthington-Skaggs B. A., Mirza S. A., Phelan M., Morgan J., Lee-Yang W., Ciblak M. A., Benjamin L. E., Sanza L. T., Huie S., Yeo S. F., Brandt M. E.,**

- Warnock D. W.** 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**(4):1519-1527.
- 47. Hammoud M. S., Al-Taiar A., Fouad M., Raina A., Khan Z.** 2013. Persistent candidemia in neonatal care units: risk factors and clinical significance. *Case Rep Obstet Gynecol.*:**350894**.
- 48. Horn D. L., Neofytos D., Anaissie E. J., Fishman J. A., Steinbach W. J., Olyaei A. J., Marr K. A., Pfaller M. A., Chang C. H., Webster K. M.** 2009. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis* **48**:1695-703.
- 49. Ishikawa J., Maeda T., Matsumura I., Yasumi M., Ujiie H., Masaie H., Nakazawa T., Mochizuki N., Kishino S., Kanakura Y.** 2009. Antifungal activity of micafungin in serum. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**(10):4559-62.
- 50. Ishikawa T., Takata T., Akamatsu S., Hatakenaka K., Matsumoto S., Maki K., Ikeda F., Tamai R., Tamura K.** 2010. Analysis of *Candida glabrata* strains with reduced sensitivity to micafungin in vitro isolated from a patient with persistent candidemia. *Jpn J Infect Dis.* **63**:332-7.
- 51. Katiyar S., Pfaller M., Edlind T.** 2006. *Candida albicans* and *Candida glabrata* clinical isolates exhibiting reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* **50**(8):2892-4.
- 52. Katiyar S. K., Alastruey-Izquierdo A., Healey K. R., Johnson M. E., Perlin D. S., Edlind T. D.** 2012. Fks1 and Fks2 are functionally redundant but differentially regulated in *Candida glabrata*: implications for echinocandin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **56**:6304–6309.
- 53. Katragkou A, Chatzimoschou A, Simitsopoulou M, Dalakiouridou M, Diza-Mataftsi E, Tsantali C, Roilides E.** 2008. Differential activities of newer antifungal agents against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* **52**:357-60.
- 54. Kett D. H., Azoulay E., Echeverria P. M., Vincent J. L., Extended Prevalence of Infection in ICU Study (EPIC II) Group of Investigators.** 2011. *Candida* bloodstream infections in intensive care units: analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study. *Crit Care Med* **39**(4):665-70.

55. **Kim R., Klachikian D., Reboli A. C.** 2007. A comparative evaluation of properties and clinical efficacy of the echinocandins. *Expert Opin Pharmacother.* **8**:1479-92.
56. **Kuse E.R., Chetchotisakd P., da Cunha C. A., Ruhnke M., Barrios C., Raghunadharao D., Sekhon J. S., Freire A., Ramasubramanian V., Demeyer I., Nucci M., Leelarasamee A., Jacobs F., Decruyenaere J., Pittet D., Ullmann A. J., Ostrosky-Zeichner L., Lortholary O., Koblinger S., Diekmann-Berndt H., Cornely O. A.; Micafungin Invasive Candidiasis Working Group.** 2007. Micafungin versus liposomal amphotericin B for candidaemia and invasive candidosis: a phase III randomised double-blind trial. *Lancet* **369**:1519–1527.
57. **Lortholary O., Desnos-Ollivier M., Sitbon K., Fontanet A., Bretagne S., Dromer F; French Mycosis Study Group.** 2011. Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2,441 patients. *Antimicrob Agents Chemother.* **55**(2):532-8.
58. **Luzzati R., Amalfitano G., Lazzarini L., Soldani F., Bellino S., Solbiati M., Danzi M. C., Vento S., Todeschini G., Vivenza C., Concia E.** 2000. Nosocomial candidemia in non-neutropenic patients at an Italian tertiary care hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19**:602–607.
59. **Luzzati R., Allegranzi B., Antozzi L., Masala L., Pegoraro E., Azzini A., Concia E.** 2005. Secular trends in nosocomial candidaemia in non-neutropenic patients in an Italian tertiary hospital. *Clin Microbiol Infect* **11**:908–913.
60. **Luzzati R., Cavinato S., Giangreco M., Granà G., Centonze S., Deiana M. L., Biolo G., Barbone F.** 2013. Peripheral and total parenteral nutrition as the strongest risk factors for nosocomial candidemia in elderly patients: a matched case-control study. *Mycoses* **16**. doi: 10.1111/myc.12090.
61. **Marcos-Zambrano L. J., Escribano P., Bouza E., Guinea J.** 2013. Use of molecular typing tools for the study of hospital outbreaks of candidemia. *Rev Iberoam Micol.* **19**. doi:pji: S1130-1406(13)00060-0.
62. **McCormack P. L, Perry C. M.** 2005. Caspofungin: a review of its use in the treatment of fungal infections. *Drugs.* **65**(14):2049-68.
63. **Melo A. S., Bizerra F. C., Freymüller E., Arthington-Skaggs B. A., Colombo A. L.** 2011. Biofilm production and evaluation of antifungal

susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. *Med Mycol.* **49**(3):253-62.

64. **Mora-Duarte J., Betts R., Rotstein C., Colombo A. L., Thompson-Moya L., Smietana J., Lupinacci R., Sable C., Kartsonis N., Perfect J.; Caspofungin Invasive Candidiasis Study Group.** 2002. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *N Engl J Med.* **19**;347(25):2020-9.
65. **Moretti M. L., Trabasso P., Lyra L., Fagnani R., Resende M. R., de Oliveira Cardoso L. G., Schreiber A. Z.** 2012. Is the incidence of candidemia caused by *Candida glabrata* increasing in Brazil? Five year surveillance of *Candida* bloodstream infection in a university reference hospital in southeast Brazil. *Med Mycol* **51**(3):225-30.
66. **Morgan J., Meltzer M. I., Plikaytis B. D., Sofair A. N., Huie-White S., Wilcox S., Harrison L.H., Seaberg E. C., Hajjeh R. A., Teutsch S. M.** 2005. Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: a case-control study using data from population-based candidemia surveillance. *Infect Control Hosp Epidemiol* **26**:540-7.
67. **Munro C. A.** 2010. Fungal echinocandin resistance. *F1000 Biol Rep.* **8**;2:66.
68. **Nishikaku A. S., Melo A. S. A., Colombo A. L.** 2010. Geographic Trends in Invasive Candidiasis. *Current Fungal Infection Reports* **4**:210-218.
69. **Nucci M., Anaissie E., Betts R. F., Dupont B. F., Wu C., Buell D. N., Kovanda L., Lortholary O.** 2010a. Early removal of central venous catheter in patients with candidemia does not improve outcome: analysis of 842 patients from 2 randomized clinical trials. *Clin Infect Dis* **51**:295–303.
70. **Nucci M., Queiroz-Telles F., Tobon A. M., Restrepo A., and Colombo A. L.** 2010b. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis* **51**:561-70.
71. **Nucci M.** 2011. Persistent Candidemia: causes and Investigations. *Curr Fungal Infect Rep* **5**:3-11.
72. **Nucci M., Queiroz-Telles F., Alvarado-Matute T., Tiraboschi I. N., Cortes J., Zurita J., Guzman-Blanco M., Santolaya M. E., Thompson L., Sifuentes-Osornio J., Echevarria J. I., Colombo A. L., Latin American Invasive Mycosis Network.** 2013. Epidemiology of

- candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. PLoS One. **8**(3):e59373.
73. **Ostrosky-Zeichner L.** 2013. *Candida glabrata* and *FKS* mutations: witnessing the emergence of the true multidrug-resistant *Candida*. Clin Infect Dis. **56**(12):1733-4.
74. **Pappas P. G., Rotstein C. M., Betts R. F., Nucci M., Talwar D., De Waele J. J., Vazquez J. A., Dupont B. F., Horn D. L., Ostrosky-Zeichner L., Reboli A. C., Suh B., Digumarti R., Wu C., Kovanda L. L., Arnold L. J., Buell D. N.** 2007. Micafungin versus caspofungin for treatment of candidemia and other forms of invasive candidiasis. Clin Infect Dis **45**:883–893.
75. **Pappas P. G., Kauffman C. A., Andes D., Benjamin D. K. Jr, Calandra T. F, Edwards J. E. Jr, Filler S. G., Fisher J. F., Kullberg B. J., Ostrosky-Zeichner L., Reboli A. C., Rex J. H., Walsh T. J., Sobel J. D.; Infectious Diseases Society of America.** 2009. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. **1**;48(5):503-35.
76. **Park S., Kelly R., Kahn J. N., Robles J., Hsu M. J., Register E., Li W., Vyas V., Fan H., Abruzzo G., Flattery A., Gill C., Chrebet G., Parent S. A., Kurtz M., Teppler H., Douglas C. M., Perlin D. S.** 2005. Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. Antimicrob Agents Chemother. **49**(8):3264-73.
77. **Park B. J., Colombo A. L., Guimaraes T., et al.:** 2007. Evaluation of the clinical significance of persistent candidemia: results from a prospective study. **Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** M-1160:440.
78. **Pereira G. H., Muller P. R., Szeszs M. W., Levin A. S., Melhem M. S.** 2010. Five-year evaluation of bloodstream yeast infections in a tertiary hospital: the predominance of non-*C. albicans Candida* species. Med Mycol **48**:839–842.
79. **Perlin D. S.** 2007. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. Drug Resist Updat. **10**(3):121-30.
80. **Perlin D. S.** 2011. Current perspectives on echinocandin class drugs. Future Microbiol. **6**(4):441-57.

81. **Pfaller M. A., and Diekema D. J.** 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**:133-63.
82. **Pfaller M. A., Diekema D. J., Gibbs D. L., Newell V. A., Ellis D., Tullio V., Rodloff A., Fu W., Ling T. A., and the Global Antifungal Surveillance.** 2010. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol* **48**:1366-77.
83. **Pfaller M. A., Boyken L., Hollis R., Kroeger J., Messer S., Tendolkar S., Diekema D.** 2011a. Use of epidemiological cutoff values to examine 9-year trends in susceptibility of *Candida* species to anidulafungin, caspofungin, and micafungin. *J Clin Microbiol* **49**(2):624-9.
84. **Pfaller M. A., Moet G. J., Messer S. A., Jones R. N., Castanheira M.** 2011b. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008-2009. *Antimicrob Agents Chemother.* **55**(2):561-6.
85. **Pfaller MA.** 2012. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med.* **125**(1 Suppl):S3-13.
86. **Pfaller M. A., Messer S. A., Woosley L. N., Jones R. N., Castanheira M.** 2013. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of geographic and temporal trends of antifungal resistance. *J Clin Microbiol* **51**(8):2571-81.
87. **Poikonen E., Lyytikäinen O., Anttila V. J., Ruutu P.** 2003. Candidemia in Finland, 1995-1999. *Emerg Infect Dis* **9**(8):985-90.
88. **Queiroz-Telles F., Berezin E., Leverger G., Freire A., van der Vyver A., Chotpitayasunondh T., Konja J., Diekmann-Berndt H., Koblinger S., Groll A. H., Arrieta A.; Micafungin Invasive Candidiasis Study Group.** 2008. Micafungin versus liposomal amphotericin B for pediatric patients with invasive candidiasis: substudy of a randomized double-blind trial. *Pediatr Infect Dis J* **27**:820–826.
89. **Reboli A. C., Rotstein C., Pappas P. G., Chapman S. W., Kett D. H., Kumar D., Betts R., Wible M., Goldstein B. P., Schranz J., Krause D.**

- S., Walsh T. J.; **Anidulafungin Study Group**. 2007. Anidulafungin versus fluconazole for invasive candidiasis. *N Engl J Med* **356**:2472–2482.
90. **Rex J. H., Bennett J. E., Sugar A. M., Pappas P. G., Serody J., Edwards J. E., Washburn R. G.** 1995. Intravascular catheter exchange and duration of candidemia. NIAID Mycoses Study Group and the Candidemia Study Group. *Clin Infect Dis* **21**:994–996.
91. **Rex J. H., Pappas P. G., Karchmer A. W., Sobel J., Edwards J. E., Hadley S., Brass C., Vazquez J. A., Chapman S. W., Horowitz H. W., Zervos M., McKinsey D., Lee J., Babinchak T., Bradsher R. W., Cleary J. D., Cohen D. M., Danziger L., Goldman M., Goodman J., Hilton E., Hyslop N. E., Kett D. H., Lutz J., Rubin R. H., Scheld W. M., Schuster M., Simmons B., Stein D. K., Washburn R. G., Mautner L., Chu T. C., Panzer H., Rosenstein R. B., Booth J.; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group.** 2003. A randomized and blinded multicenter trial of high-dose fluconazole plus placebo versus fluconazole plus amphotericin B as therapy for candidemia and its consequences in nonneutropenic subjects. *Clin Infect Dis*. **36**(10):1221-8.
92. **Robinson J. A., Pham H. D., Bloom B. T., Wittler R. R.** 2011. Risk factors for persistent candidemia infection in a neonatal intensive care unit and its effect on mortality and length of hospitalization. *J Perinatol*. **32**(8):621-5.
93. **Romeo O., Delfino D., Cascio A., Lo Passo C., Amorini M., Romeo D., Pernice I.** 2013. Microsatellite-based genotyping of *Candida parapsilosis sensu stricto* isolates reveals dominance and persistence of a particular epidemiological clone among neonatal intensive care unit patients. *Infect Genet Evol*. **13**:105-8.
94. **Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:5463-7.
95. **Sardi, J. C., L. Scorzoni, T. Bernardi, A.M. Fusco-Almeida, M.J. Mendes Giannini.** 2013. *J Med Microbiol* **62**(1):10-24.
96. **Shields R. K., Nguyen M. H., Press E. G., Kwa A. L., Cheng S., Du C., Clancy C. J.** 2012. The presence of an FKS mutation rather than MIC is an independent risk factor for failure of echinocandin therapy among patients with invasive candidiasis due to *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother*. **56**(9):4862-9.

-
97. **Solla-Buceta M., Hurtado-Doce A., Álvarez-Rocha L.** 2013. Persistent candidemia in a renal-pancreatic transplant patient. *Rev Iberoam Micol.* **29(2):**76-80.
98. **Skrobik Y., Laverdiere M.** 2013. Why Candida Sepsis Should Matter to ICU Physicians. *Crit Care Clin* **29(4):**853-864.
99. **Thompson G. R. 3rd, Wiederhold N. P., Vallor A. C., Villareal N. C., Lewis J. S. 2nd, Patterson T. F.** 2008. Development of caspofungin resistance following prolonged therapy for invasive candidiasis secondary to *Candida glabrata* infection. *Antimicrob Agents Chemother.* **52(10):**3783-5.
100. **Tumbarello M., Posteraro B., Trecarichi E. M., Fiori B., Rossi M., Porta R., de Gaetano Donati K., La Sorda M., Spanu T., Fadda G., Cauda R., Sanguinetti M.** 2007. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. *J Clin Microbiol* **45:**1843-50.
100. **Vanhee L. M., Nelis H. J., Coenye T.** 2010. What can be learned from genotyping of fungi? *Med Mycol.* **48 Suppl 1:**S60-9.
101. **Vazquez J. A.** 2005. Anidulafungin: a new echinocandin with a novel profile. *Clin Ther.* **27(6):**657-73.
102. **Walker L. A., Gow N. A., Munro C. A.** 2010. Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genet Biol.* **47(2):**117-26.
103. **Warnock D. W.** 2007. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* **48:**1-12.
104. **White T. J., Bruns T. D., Lee S. B., Taylor J. W.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p 315–322. *In* Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (ed), PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, Inc, San Diego, CA.
105. **Wisplinghoff H., Bischoff T., Tallent S. M., Seifert H., Wenzel R. P., Edmond M. B.** 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* **39:**309-17.
106. **Zimbeck A. J., Iqbal N., Ahlquist A. M., Farley M. M., Harrison L. H., Chiller T., Lockhart S. R.** 2010. FKS mutations and elevated echinocandin MIC values among *Candida glabrata* isolates from U.S.

population-based surveillance. Antimicrob Agents Chemother.
54(12):5042-5047.