



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

ISABELA HADDAD PERON

**AVALIAÇÃO DE SUSCETIBILIDADE E ESTUDO DE GENE DE
RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE *Candida albicans* OBTIDOS DE
ESPÉCIMES CLÍNICOS NO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNICAMP**

CAMPINAS

2016

ISABELA HADDAD PERON

**AVALIAÇÃO DE SUSCETIBILIDADE E ESTUDO DE GENE DE
RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE *Candida albicans* OBTIDOS DE
ESPÉCIMES CLÍNICOS NO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA
UNICAMP**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências Médicas, área de concentração Ciências Biomédicas.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA ISABELA HADDAD PERON E ORIENTADO
PELA PROF^a DR^a ANGÉLICA ZANINELLI SCHREIBER

CAMPINAS

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2014/08693-8

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

P424a Peron, Isabela Haddad, 1989-
Avaliação de suscetibilidade e estudo de gene de resistência de isolados clínicos de *Candida albicans* obtidos de espécimes clínicos no Hospital de Clínicas da UNICAMP / Isabela Haddad Peron. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Angélica Zaninelli Schreiber.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Candida albicans*. 2. Antifúngicos. 3. Candidemia. I. Schreiber, Angélica Zaninelli, 1965-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Susceptibility evaluation and study of the resistance gene of *Candida albicans* isolates obtained from clinical specimens of UNICAMP Hospital and Clinics

Palavras-chave em inglês:

Candida albicans

Antifungal agents

Candidemia

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Mestra em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Angélica Zaninelli Schreiber [Orientador]

Wanda Pereira Almeida

Célia Regina Garlipp

Data de defesa: 30-03-2016

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

ISABELA HADDAD PERON

ORIENTADORA: PROF^a DR^a ANGÉLICA ZANINELLI SCHREIBER

MEMBROS:

1. PROF^a DR^a ANGÉLICA ZANINELLI SCHREIBER

2. PROF^a DR^a WANDA PEREIRA ALMEIDA

3. PROF^a DR^a CÉLIA REGINA GARLIPP

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 30 de março de 2016

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio concedido para realização dessa pesquisa.

À Profª Drª Angélica Zaninelli Schreiber.

Ao Laboratório de Microbiologia da Divisão de Patologia Clínica – HC-UNICAMP e Laboratório de Investigação em Fungos – LIF/UNICAMP: Edson, Luzia e demais funcionários.

Ao Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas – LEMDI/UNICAMP: Profª Drª Maria Luiza Moretti, Ariane, Cibele e Laís.

Às amigas Franqueline, Débora, Rute e Márcia.

Aos familiares: mãe, pai e irmã.

Aos guias e entidades espirituais (em especial à Camila) e a Deus.

RESUMO

Leveduras do gênero *Candida* são integrantes da microbiota do corpo humano e, quando há um desequilíbrio entre microbiota e hospedeiro, podem se tornar patógenos oportunistas, sendo *C.albicans* a espécie mais frequente. A candidíase sistêmica apresenta sintomatologia infecciosa localizada que se dissemina a outros órgãos por via hematogênica. O antifúngico fluconazol inibe a síntese de ergosterol – componente essencial da membrana da célula fúngica – e é amplamente utilizado para profilaxia e tratamento de infecções causadas por espécies de *Candida*. Enquanto algumas são geneticamente resistentes (*C.krusei*) ou facilmente adquirem resistência (*C.glabrata*) a fluconazol, não há muitos relatos de resistência em *C.albicans*. Porém, esta levedura pode desenvolver mecanismos de resistência a fluconazol, incluindo mutações no gene *ERG11*, codificador da produção da enzima que atua na biossíntese do ergosterol. O presente estudo realizou a caracterização do perfil de suscetibilidade frente a antifúngicos de isolados de *C.albicans* obtidos de hemoculturas, bem como a investigação da ocorrência de mutações no gene *ERG11* de dois isolados de *C.albicans* (LIF-E10 e LIF 12560) que apresentaram resistência fenotípica *in vitro* a fluconazol. O estudo contou com 147 isolados de *C.albicans* provenientes de hemoculturas realizadas no Hospital de Clínicas/UNICAMP no período de 2006 a 2010 e também com os isolados LIF-E10 e LIF 12560, que são procedentes de outros materiais clínicos (escovado esofágico e cavidade bucal, respectivamente). Os isolados estavam previamente identificados segundo metodologia micológica manual e automação (equipamento Vitek® 2 bioMérieux). Foram reativados por meio de cultura em ágar Sabouraud dextrose e posteriormente depositados em painéis para identificação no equipamento BD Phoenix®. Os testes de suscetibilidade *in vitro* aos antifúngicos micafungina, anfotericina B, 5-flucitosina, fluconazol, voriconazol, itraconazol e caspofungina foram realizados por microdiluição em caldo segundo os documentos M27-A3 e M27-S4 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). A triagem de mutações no gene *ERG11* de LIF-E10 e LIF 12560 ocorreu pela amplificação de três regiões gênicas, com os iniciadores ERGSec1A/1B, ERGSec2A/2B e ERGSec3A/3B. O produto resultante foi submetido a sequenciamento e análise dos fragmentos de DNA amplificados por meio da comparação a uma cepa padrão suscetível a fluconazol (*C.albicans* ATCC 90028). Dos 147 isolados clínicos que passaram por reativação, 143 foram recuperados e quatro não apresentaram crescimento. Dos 143 submetidos à reidentificação no equipamento BD Phoenix®, 128 (89,5%) foram identificados como *C.albicans* e 15 (10,5%) foram identificados como *Candida dubliniensis*. Com o resultado divergente apresentado pelo BD Phoenix® em relação à identificação anterior feita pelo Vitek® 2, foi necessária a realização do sequenciamento (iniciadores ITS4/ITS5 e NL1/NL4), que resultou na confirmação dos 15 isolados como pertencentes à espécie *C.albicans*. Nos testes de suscetibilidade *in vitro*, todos os isolados de hemocultura foram caracterizados dentro da faixa suscetível (S) frente a todos os antifúngicos testados, corroborando com dados epidemiológicos mundiais que demonstram o predomínio do perfil suscetível de *C.albicans*. O sequenciamento do gene *ERG11* dos isolados LIF-E10 e LIF 12560 revelou seis mutações (G448V e G464S para LIF-E10 e E116D, T128K, E266D e A298V para LIF 12560), todas descritas na literatura como associadas ao fenômeno de resistência de *C.albicans* a fluconazol.

Palavras-chave: *Candida albicans*; antifúngicos; candidemia.

ABSTRACT

Candida species are present in the human body microbiota and, when there is an imbalance in the relationship between microbiota and host, these yeasts can become opportunistic pathogens, being *Candida albicans* the most frequently found species. The systemic candidiasis presents localized infectious symptoms and is able to spread to other organs through the haematogenous route. The fluconazole antifungal inhibits the synthesis of ergosterol – an essential component of the fungal cell membrane – and is the most common prophylactic choice when treating candidiasis. While some species are intrinsically resistant to fluconazole (*C.krusei*) or are more prone to develop resistance (*C.glabrata*), reports on the resistance of *C.albicans* to fluconazole are rare. However, this species is in fact able to develop such resistance mechanisms, including the mutations of the *ERG11* gene, which codifies the production of the enzyme that acts in the biosynthesis of the ergosterol. This report aimed to perform an antifungal susceptibility surveillance study on *C.albicans* bloodstream samples, as well as investigating mutations in the *ERG11* gene on two clinical *C.albicans* isolates (LIF-E10 and LIF 12560) that had previously presented *in vitro* resistance to fluconazole. This experiment was provided with 147 samples of *C.albicans* isolates from hemocultures that had been conducted in the Hospital and Clinics of the State University of Campinas from 2006 to 2010, as well as the LIF-E10 and LIF 12560 isolates, obtained, respectively, from oral cavity and esophageal cavity. The bloodstream isolates had been previously identified by conventional methods and Vitek™ 2 Systems (bioMérieux), and were reactivated through Sabouraud dextrose agar cultures, being subsequently placed in identification panels in the BD Phoenix™ equipment. The *in vitro* tests to susceptibility to antifungals micafungin, amphotericin B, 5-flucytosine, fluconazole, voriconazole, itraconazole and caspofungin were performed by the broth microdilution methodology in accordance with the *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) documents M27-A3 and M27-S4. The screening of the *ERG11* gene mutations of the LIF-E10 and LIF 12560 isolates was obtained by amplifying three genic regions through specific PCR primers ErgSec1A/1B, ErgSec2A/2B and ErgSec3A/3B. The resulting product was submitted to both sequencing and analysis of the DNA fragments, amplified by comparing them to the standard fluconazole-sensible sample *C.albicans* ATCC 90028. From the 147 clinical isolates that went through reactivation, 143 were recovered, whereas four did not present any growth. From the 143 submitted to reidentification in the BD Phoenix™ equipment, 128 (89.5%) were identified as *C.albicans*, and 15 (10.5%) were identified as *Candida dubliniensis*. Since such result presented by the BD Phoenix™ differed from the previous identification by the Vitek™ 2, the sequencing was necessary (primers ITS4/ITS5 and NL1/NL4), resulting in the confirmation of the 15 isolates as belonging to the *C.albicans* species. Regarding the *in vitro* susceptibility tests, all hemoculture isolates were characterized within the susceptible range (S) when facing all of the tested antifungals, corroborating with the epidemiological data that shows the dominance of the susceptible profile of the *C.albicans*. The nucleotide sequence analysis of the *ERG11* gene of both *C.albicans* isolates LIF-E10 and LIF 12560 revealed 6 nucleotide mutations (E116D, T128K, E266D, A298V, G448V, and G464S to LIF 12560), all of them previously reported on the data as associated to the phenomenon of the *C.albicans* fluconazole resistance.

Keywords: *Candida albicans*; antifungal drugs; candidemia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aspecto macromorfológico de cultura de <i>Candida</i> sp. em ágar Sabouraud dextrose.....	21
Figura 2: Prova do Tubo Germinativo positiva para <i>C.albicans</i>	21
Figura 3: Filamentação de <i>C.albicans</i> em ágar fubá.....	21
Figura 4: Equipamentos BD Phoenix [®] (A) e Vitek [®] 2 (B)	22
Figura 5: Esquema ilustrativo do DNA ribossomal fúngico	23
Figura 6: Espelho de leitura com placa de microdiluição posicionada	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Orientações interpretativas do CLSI para testes de suscetibilidade <i>in vitro</i> de <i>Candida</i> spp. frente aos antifúngicos	25
Tabela 2: Descrição dos iniciadores utilizados	37
Tabela 3: Sequenciamento ITS4 e ITS5 – Comparação com Genbank, ISHAM e CBS	41
Tabela 4: Sequenciamento NL1 e NL4 – Comparação com Genbank e CBS	41
Tabela 5: Intervalos de leitura da concentração inibitória mínima e valores de CIM ₅₀ e CIM ₉₀ dos isolados de hemocultura frente aos agentes antifúngicos micafungina, anfotericina B, 5-flucitosina, fluconazol, itraconazol, voriconazol e caspofungina.....	42
Tabela 6: Intervalos de leitura da concentração inibitória mínima dos isolados LIF 12560 e LIF-E10 frente aos agentes antifúngicos micafungina, anfotericina B, 5-flucitosina, fluconazol, itraconazol e voriconazol	42
Tabela 7: Mutações nucleotídicas e substituições correspondentes nos aminoácidos ..	43

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABC: *ATP-Binding Cassette*

AMB: anfotericina B

ASD: ágar Sabouraud dextrose

ATCC: *American Type Culture Collection*

BHI: Infusão de Cérebro e Coração (*Brain Heart Infusion*)

BLAST: *Basic Local Alignment Tool*

CASP: caspofungina

CDR: *Candida Drug Resistance*

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DNA: ácido desoxirribonucleico

EDTA: ácido etilenoaminotetracético

5FC: 5-flucitosina

FCL: fluconazol

FCM: Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

HC-UNICAMP: Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

h: horas

ISHAM: *International Society for Human and Animal Mycology*

ITS: *Internal Transcribed Spacer*

ITC: itraconazol

LaCTAD: Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida - UNICAMP

LEMDI: Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas – FCM/UNICAMP

LIF: Laboratório de Investigação em Fungos – FCM/UNICAMP

MCFG: micafungina

MDR: *Multidrug Resistance*

MOPS: ácido morfolinopropanosulfônico

mL: mililitro

mM: milimolar

μL: microlitro

ng: nanograma

pb: pares de bases

PCR: reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

rDNA: DNA ribossômico

rpm: rotações por minuto

UFC: unidades formadoras de colônia

V: volts

VRC: voriconazol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. <i>Candida albicans</i> e outras espécies de <i>Candida</i>	12
1.2. Patogenia das infecções por <i>Candida</i> spp	13
1.3. Candidemias	15
1.4. Antifúngicos	16
1.5. Diagnóstico das infecções fúngicas	20
1.5.1. Identificação das espécies de <i>Candida</i>	20
1.6. Teste de suscetibilidade frente aos antifúngicos	24
1.7. Justificativa	26
2. OBJETIVOS	27
Objetivo Principal	27
Objetivos Específicos	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. Local de trabalho	28
3.2. Isolados clínicos para estudo	28
3.3. Reativação dos micro-organismos selecionados para o estudo	29
3.4. Identificação dos isolados clínicos	29
3.4.1. Identificação dos isolados clínicos utilizando o BD Phoenix®	30
3.5. Sequenciamento dos isolados clínicos que apresentaram resultados divergentes entre os equipamentos	30
3.5.1. Extração de DNA	30
3.5.2. Amplificação do DNA alvo pela reação em cadeia da polimerase (PCR)	31
3.5.3. Purificação dos produtos de PCR	31
3.5.4. Reação de sequenciamento	32
3.5.5. Análise	32
3.6. Testes de suscetibilidade aos antifúngicos <i>in vitro</i> pelo método de microdiluição em caldo	33
3.6.1. Meio de cultura	33
3.6.2. Inóculo	33
3.6.3. Preparo das placas de microdiluição	34
3.6.4. Leitura das CIM	35
3.6.5. Controle de Qualidade	36
3.7. Sequenciamento do gene <i>ERG11</i> dos isolados LIF-E10 e LIF 12560	36

3.7.1.	Extração de DNA.....	37
3.7.2.	Amplificação do DNA alvo pela reação em cadeia da polimerase (PCR)	37
3.7.3.	Purificação dos produtos de PCR	38
3.7.4.	Reação de sequenciamento.....	38
3.7.5.	Análise.....	39
4.	RESULTADOS.....	40
4.1.	Reativação dos isolados clínicos.....	40
4.2.	Identificação dos isolados clínicos utilizando o BD Phoenix [®]	40
4.3.	Sequenciamento dos isolados clínicos que apresentaram resultados divergentes entre os equipamentos	40
4.4.	Testes de suscetibilidade frente aos antifúngicos.....	41
4.4.1.	Isolados obtidos de amostras de hemoculturas.....	41
4.4.2.	Isolados LIF-E10 e LIF 12560	42
4.5.	Sequenciamento do gene <i>ERG11</i> dos isolados LIF-E10 e LIF 12560.....	43
5.	DISCUSSÃO	44
5.1.	Reativação dos isolados clínicos.....	44
5.2.	Identificação dos isolados que apresentaram divergência entre os equipamentos	45
5.3.	Teste de suscetibilidade frente aos antifúngicos	46
5.4.	Mutações no gene <i>ERG11</i>	49
6.	CONCLUSÃO.....	51
7.	ANEXOS	52
8.	REFERÊNCIAS	59

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Candida albicans* e outras espécies de *Candida*

Segundo Sidrim e Rocha (2004), a primeira documentação de leveduras do gênero *Candida* spp. como patógeno é atribuída a Langenbeck que, em 1839, observou e isolou, da cavidade oral de um paciente com afta bucal, um micro-organismo que atualmente é a mais importante levedura patogênica do homem, a *Candida albicans*. Antes de Langenbeck, Hipócrates (460 a 337 a.C.) e Galeno (200 a 130 a.C.) descreveram pela primeira vez a presença de lesões orais esbranquiçadas compatíveis com candidíase bucal. Posteriormente, David Gruby em 1842 definiu esta micose oral e deu início à classificação taxonômica da levedura. Ao longo dos tempos, esta levedura recebeu mais de 100 designações. Em 1853, Charles Robin determinou a primeira denominação do micro-organismo como *Oidium albicans* que, posteriormente, em 1890 foi reclassificado por Zopf e passou a ser reconhecido por *Monilia albicans*. Mais tarde, Berkhout (1923) classificou a levedura no gênero *Candida* e espécie *Candida albicans*. Posteriormente, Virchow (1821-1902) demonstrou sua capacidade de invasão nos tecidos. Em 1861, Zenker descreveu o primeiro caso de candidíase cerebral que provavelmente teve como foco original leveduras presentes em lesões esofágicas e orais, disseminadas por via hematogênica. Em 1940 foi descrito o primeiro caso de isolamento da levedura em corrente sanguínea (1-3).

Na classificação taxonômica, as leveduras do gênero *Candida* fazem parte do reino Fungi, divisão Eumycota, subdivisão Deuteromycotina, classe Deuteromycetes, ordem Cryptococcales, família Cryptococcacea e gênero *Candida*. É neste grupo dos deuteromicetos que está incluída a maioria dos fungos patogênicos ao homem. São fungos predominantemente unicelulares, tipicamente esféricos ou ovais, que se reproduzem sexuadamente e/ou assexuadamente por brotamento, cissiparidade ou uma combinação dos dois últimos processos. Considerados seres cosmopolitas e amplamente distribuídos pela natureza, podem ser encontrados na água, no ar atmosférico, no solo, sobre os animais e vegetais vivos, na matéria orgânica em decomposição, nos produtos alimentícios e industriais (3-5).

Alguns gêneros caracterizam-se por apresentar apenas blastoconídios (também conhecidos como “brotos”), enquanto outros formam, além de blastoconídios, pseudo-

hifas e/ou hifas verdadeiras (5). A fase unicelular leveduriforme pode gerar um blastoconídio e desenvolver hifas verdadeiras (como é o caso da espécie *Candida albicans*) por meio de um processo denominado filamentação. Entre o brotamento e a filamentação, o fungo ainda exibe uma variedade de morfologias durante o seu crescimento – como as pseudo-hifas, que são leveduras alongadas unidas entre si (3, 5-7). Lacaz e colaboradores (2002), em seu Tratado de Micologia Médica, caracterizam a pseudo-hifa como uma estrutura constituída por blastoconídios alongados, ligados uns aos outros em cadeia, formando filamento semelhante a uma hifa.

As alterações morfológicas representam uma resposta ou condição adaptativa das leveduras para sobreviver em condições biológicas diversificadas, como temperatura e pH, que variam em demasia do ambiente externo para o interno do organismo humano. Além disso, a habilidade de modificar-se morfológicamente (broto, pseudo-hifa e hifa verdadeira) colabora para a virulência destes fungos, tornando-os capazes de invadir os tecidos durante os processos infecciosos (4).

1.2. Patogenia das infecções por *Candida* spp.

As leveduras estão presentes em diversas regiões do corpo humano como integrantes de sua microbiota normal, como a pele, as unhas e o leito subungueal, os tratos genital e gastrointestinal, as mucosas oral e nasal (3, 5, 6). Espécies de *Candida* são as isoladas em maior frequência e, quando há um desequilíbrio na relação entre a microbiota e o organismo, essas leveduras podem se tornar patógenos oportunistas e causar infecções superficiais ou sistêmicas conhecidas como candidíases (3, 5, 8).

Das quase 200 espécies de *Candida* existentes, aproximadamente 10% são consideradas agentes etiológicos de candidíase humana e as principais de interesse clínico são: *C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.guilliermondii* e *C.lusitaniae*. *C.albicans* é a espécie mais frequentemente isolada de infecções superficiais e invasivas em diversos sítios anatômicos e como causa de candidíase em todas as partes do mundo (6, 9-12).

Com relação à patogenia das infecções causadas pelas espécies de *Candida*, o início se dá pelas prováveis modificações das defesas do hospedeiro que alteram a relação parasito/hospedeiro. Infecções que acometem a pele e as mucosas são principalmente devidas a mudanças na hidratação, no pH, nas concentrações de nutrientes e alterações na microbiota (13). Por outro lado, as candidíases sistêmicas

estão habitualmente associadas a uma imunossupressão ligada ao sistema fagocitário do hospedeiro e acometem pacientes internados em unidades de oncologia, hematologia, unidades de tratamento intensivo ou, ainda, pacientes submetidos a antibioticoterapia de amplo espectro (3, 5, 10, 11, 14).

Existem basicamente duas classificações para as manifestações clínicas das candidíases: cutâneo-mucosa e sistêmica ou invasiva (5, 15). Na primeira, incluem-se as formas intertriginosa, onicomicose, oral, vulvovaginite, balanopostite e cutâneo-mucosa crônica. Para tratar tais apresentações provocadas pelas espécies de *Candida*, uma grande quantidade de antifúngicos pode ser utilizada e a apresentação medicamentosa empregada, bem como a forma de administração, deve ser variável na dependência da gravidade da manifestação clínica (3, 5, 10).

Já a candidíase sistêmica ou invasiva apresenta sintomatologia infecciosa localizada e que, em algum período de sua evolução, disseminou-se a outros órgãos por via hematogênica. Determinados fatores predis põem o hospedeiro nesse tipo de disseminação, tais como portadores de doenças que comprometem o sistema imunológico, idosos e rupturas de barreiras mecânicas (cateterismo, queimaduras, sondagens). Fatores relacionados ao micro-organismo também colaboram para a instalação do processo infeccioso, como a capacidade de maior adesividade às células do hospedeiro, a produção de pseudo-hifas, a presença de toxinas e de enzimas proteolíticas (3, 5, 16).

A candidíase sistêmica possui manifestações clínicas bastante variáveis e, em geral, não específicas. Dessa forma, podem ser encontrados quadros com sintomatologia cardíaca, digestiva, esofágica, respiratória, hepática, renal e do sistema nervoso central. Por serem mais graves, requerem tratamento com antifúngicos administrados por via sistêmica (10, 17, 18). Os principais antifúngicos prescritos para o tratamento das infecções fúngicas sistêmicas são o fluconazol e a anfotericina B (10).

Com relação aos casos de candidíase orofaríngea e esofágica em pacientes portadores de candidíase recorrente e imunossuprimidos, o uso repetitivo ou a exposição prolongada aos antifúngicos utilizados para tratamento e profilaxia está ligado à aquisição de resistência das espécies de *Candida*, correlacionando este evento à falha terapêutica (19-21). Diferentemente da administração intravenosa, a via oral, utilizada no tratamento desses casos de candidíase, acarreta em um contato direto e constante do antifúngico com a levedura, originando um ambiente adverso para este

micro-organismo, selecionando positivamente cepas mais resistentes e fazendo com que os tratamentos não sejam mais eficazes (22).

1.3. Candidemias

Em todo o mundo, infecções fúngicas invasivas provocadas por leveduras do gênero *Candida* são importantes causas de morbidade e mortalidade. O número de casos desse tipo de infecção é crescente, principalmente entre pacientes imunossuprimidos, sob antibioticoterapia, sob nutrição parenteral ou expostos a procedimentos médicos invasivos. Entre as espécies patogênicas, *C.albicans* é a mais frequentemente associada a infecções, principalmente em casos de infecção de corrente sanguínea – complicação conhecida como candidemia ou candidíase hematogênica (23, 24).

O termo candidíase hematogênica engloba um espectro amplo de situações clínicas, incluindo desde episódios isolados de candidemia até casos em que a levedura presente na corrente sanguínea dissemina-se para um ou vários órgãos do hospedeiro infectado. Esta complicação requer diagnóstico clínico-laboratorial rápido e eficaz para que o tratamento possa ser iniciado (10).

Acredita-se que a maioria dos casos de candidemia seja adquirida por via endógena, pela translocação do patógeno por meio do trato gastrointestinal – local onde há rica colonização por espécies de *Candida* em até 70% da população (23, 25). A maior parte das candidemias é precedida por uma colonização pela mesma espécie de *Candida* que irá causar a infecção na corrente sanguínea. Qualquer variável que provoque desequilíbrio da microbiota ou lesão da mucosa gastrointestinal pode ser um agente facilitador de translocação da levedura até os capilares mesentéricos. Sendo assim, fatores que aumentem a colonização intestinal por *Candida* sp. (uso de antibióticos, oclusão intestinal) ou determinem atrofia ou lesão de mucosa intestinal (jejum prolongado, nutrição parenteral total, hipotensão, quimioterapia) podem potencializar o fenômeno de translocação no tubo gastrointestinal. Infecções hematogênicas por *Candida* sp. também podem ser adquiridas por via exógena, por meio do contato das mãos de profissionais de saúde com pacientes portadores de cateteres vasculares em posição central, implante de próteses contaminadas, bem como pela administração parenteral de soluções contaminadas (26).

A ocorrência de casos de candidemia em hospitais terciários aumentou

substancialmente nas últimas décadas em diferentes partes do mundo e são um grande problema devido às altas taxas de prevalência e mortalidade (10, 11). No Brasil, a incidência de candidemias em hospitais públicos terciários constitui aproximadamente 2,5 casos a cada 1000 pacientes (10). Devido a este fato, o emprego de medidas profiláticas tem aumentado com intuito de prevenir infecções fúngicas em pacientes imunocomprometidos. Essa intensa profilaxia é, muitas vezes, responsável pela seleção de micro-organismos resistentes aos antifúngicos – principalmente ao fluconazol (10, 22, 27).

1.4. Antifúngicos

Os antifúngicos são agentes que realizam prevenção contra infecções fúngicas, inibem a proliferação dos fungos no organismo ou causam sua destruição, dividindo-se em várias classes de acordo com o seu mecanismo de ação (3, 5).

Durante o desenvolvimento fúngico, um dos processos mais importantes é a biossíntese do ergosterol – componente fundamental na constituição da membrana dos fungos. Inicialmente, a substância esqualeno sofre ação da enzima esqualeno epoxidase, transformando-se em uma nova substância chamada esqualeno epóxido. Esta, por sua vez, é substrato de outras enzimas até se transformar em lanosterol. O lanosterol também sofre a ação de outra enzima (a 14- α -desmetilase), transformando-se em ergosterol. Dessa forma, alguns antifúngicos atuam diretamente no ergosterol ou interrompem sua síntese, em alguma fase da cascata, para conter a replicação fúngica (3, 5, 28).

Os derivados poliênicos são a classe de antifúngicos em que se inclui a anfotericina B e a nistatina. São responsáveis por ligar-se ao ergosterol presente na membrana da célula fúngica, produzindo poros e/ou canais que resultam no aumento da permeabilidade da membrana. Consequentemente, a célula fúngica sofre perda grande de pequenas moléculas e eletrólitos e tem sua homeostasia alterada (5, 29).

A flucitosina (5-FC) penetra na célula fúngica por intermédio de uma citosina-permease específica, não encontrada em células de mamíferos, denominada citosina desaminase. Em seguida, é convertida em 5-fluoracil, que, por sua vez, é um antimetabólico que inibe a enzima timidilato-sintetase e, portanto, a síntese de DNA (5, 29).

Os azóis são compostos sintéticos heterocíclicos, suficientemente apolares para

se difundirem pelos tecidos infectados, subdivididos em imidazóis (cetoconazol, miconazol, econazol, clotrimazol) e triazóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, ravuconazol e albaconazol) com base no número de nitrogênios presentes no anel azol, cuja diferença estrutural resulta em diferentes afinidades de ligação do composto antifúngico ao sistema enzimático citocromo P-450 do fungo. Essas substâncias são dotadas de alta versatilidade e possuem amplo espectro de atividade antifúngica (5, 9, 29).

O mecanismo de ação dessa ampla classe de antifúngicos consiste na inibição da desmetilação do carbono 14 do esterol da membrana celular do fungo impedindo, consequentemente, a biossíntese normal do ergosterol e alterando a composição bioquímica desta, com perda de constituintes celulares (proteínas, aminoácidos, nucleotídeos, cátions monovalentes), aliada a falhas na absorção de nutrientes extracelulares importantes (5, 28, 29).

A prevalência de infecções fúngicas tem aumentado consideravelmente nas últimas duas décadas, principalmente após o surgimento da pandemia causada pelo vírus HIV e o aumento de procedimentos médicos invasivos, bem como o uso de medicamentos imunossupressores. Dessa forma, houve também uma maior utilização dos antifúngicos tanto profilática quanto terapêuticamente (24).

No começo dos anos 90, uma nova geração de medicamentos azóis – os triazóis – foi introduzida para combater a alta incidência das infecções fúngicas. O fluconazol, em particular, mudou a face da terapia antifúngica devido a sua baixa toxicidade, boa penetrabilidade na maioria dos tecidos e também boa tolerância pelo organismo, já que possui efeitos colaterais reduzidos e mais brandos (30). Porém, com a introdução e a implementação do uso do fluconazol para profilaxia e tratamento de infecções pelo gênero *Candida*, houve aumento de relatos de resistência desses micro-organismos aos azóis.

As equinocandinas constituem uma nova classe de antifúngicos de uso exclusivamente parenteral: anidulafungina, caspofungina e micafungina são os representantes dessa classe terapêutica. Elas inibem o complexo enzimático 1,3- β -D-glucana sintetase, responsável pela síntese da 1,3- β -D-glucana, que é um polissacarídeo essencial para a formação da parede fúngica. Esses antifúngicos são considerados fungicidas para espécies de *Candida* (10, 29).

Caspofungina foi a primeira das três equinocandinas a se tornar disponível para

o tratamento de infecções fúngicas invasivas. Inicialmente introduzido em 2001, este antifúngico é aprovado para o tratamento de candidemia e de outras formas de candidíase invasiva em pacientes que são refratários ou intolerantes ao tratamento por outros antifúngicos (31, 32). Desta forma, a potente atividade de amplo espectro da caspofungina contra *Candida* spp. levou a ampla utilização deste agente para o tratamento de todas as formas de infecções graves por espécies de *Candida* ao longo dos últimos 4 anos (10, 31).

1.4.1. Mecanismos de resistência de *Candida* sp. a azóis

A resistência intrínseca (ou primária) é uma característica herdada e natural de certas espécies, não sendo a exposição prévia a antifúngicos um fator interferente. *Candida krusei*, por exemplo, é intrinsicamente resistente a fluconazol e *Cryptococcus neoformans* a equinocandinas. Já a resistência adquirida (ou secundária) ocorre quando uma espécie suscetível desenvolve uma resistência fenotípica resultante, em grande parte, do tratamento prolongado com antifúngicos e decorre geralmente de alteração gênica (22, 28, 33).

A resistência fúngica observada nos testes de suscetibilidade *in vitro* se refere ao fenômeno de “não-suscetibilidade” de um fungo frente a um agente antifúngico no qual a concentração inibitória mínima (CIM) excede o ponto de corte (*breakpoint*) estabelecido para aquele micro-organismo, ou seja, o micro-organismo é inibido com uma concentração de antifúngico muito maior que aquela que poderia ser seguramente administrada ao paciente, associando-se a este fato uma grande probabilidade de falha terapêutica (34, 35).

Diversos estudos têm sido realizados para a elucidação dos mecanismos moleculares responsáveis pelo desenvolvimento de resistência a azóis em isolados clínicos de espécies de *Candida*. Embora esses mecanismos possam ocorrer simultaneamente na célula fúngica, os mais comumente relatados são: mutações no gene *ERG11*, superexpressão do gene *ERG11* e superexpressão de genes codificadores de proteínas transportadoras de membrana (ou bombas de efluxo) (9, 22, 36, 37).

Alterações na via de biossíntese do ergosterol (p.ex., a inativação da enzima C5,6-desaturase) podem levar à resistência aos azóis por evitarem o acúmulo de metabólitos tóxicos do esterol – que, normalmente, acumulam-se na membrana na presença dos azóis. Nos micro-organismos mutantes, o ergosterol não é sintetizado.

Dessa forma, como o ergosterol é alvo da anfotericina B, pode ser observada resistência cruzada entre anfotericina B e fluconazol em consequência dessas alterações.

Mutações no gene *ERG11*

Uma causa frequente de resistência é decorrente da alteração na configuração espacial da enzima 14- α -desmetilase. Mutações em seu gene codificante, o *ERG11*, podem resultar em alterações pós-traducionais na sequência de aminoácidos e, conseqüentemente, na estrutura tridimensional da enzima em questão. Isso gera decréscimo na afinidade de ligação entre o componente azólico e a 14- α -desmetilase, sem impedir sua função, porém, gerando leveduras com fenótipo alterado resistente aos azóis (9, 33, 38).

Superexpressão do gene *ERG11*

Em presença de fluconazol, *C.albicans* aumenta a expressão do gene *ERG11*, provavelmente por mecanismo compensatório à depleção do ergosterol. O aumento da expressão do gene *ERG11* resulta em aumento da concentração da enzima 14- α -desmetilase no ambiente intracelular e, conseqüentemente, acarreta a necessidade de quantidades maiores de antifúngico para inibir a atividade da enzima (9, 38).

Superexpressão de genes codificadores de proteínas transportadoras de membrana (ou bombas de efluxo)

A redução do acúmulo intracelular do medicamento na célula fúngica colabora para que este seja um importante mecanismo de resistência a azóis. O fluconazol, por exemplo, é ativamente transportado ao meio externo pelas células fúngicas de uma maneira dependente de energia, e o maior efluxo deste antifúngico é causado pela superexpressão de genes que codificam proteínas transportadoras de membranas – os genes *CDR1* e *CDR2* (*Candida Drug Resistance*) (9, 16, 39).

Esses genes codificam proteínas transportadoras do tipo ABC (*ATP-Binding Cassette*), que atuam como bombas de efluxo transmembranas e utilizam a hidrólise do ATP para mobilizar uma variedade de pequenos compostos hidrofóbicos para fora da célula (16, 39).

Além de *CDR1* e *CDR2*, outro gene conhecido como *MDR1* (*Multidrug Resistance*) também está envolvido no sistema de transporte dependente de energia. A

proteína codificada por *MDR1* atua como transportadora de membrana do tipo MFS (*Major Facilitator Superfamily*), pertencente à superfamília das permeases, e utiliza gradiente de prótons para o transporte de compostos (16, 39).

1.5. Diagnóstico das infecções fúngicas

O diagnóstico das infecções fúngicas tem como base a combinação de dados clínicos e laboratoriais e inclui a demonstração do fungo na amostra biológica – seja por meio de exame direto do material ou pelo crescimento do agente em cultura. Paralelamente, o diagnóstico pode contar também com a detecção de antígenos, anticorpos e metabólitos circulantes do fungo. Todavia, a cultura ainda se mostra o método de baixo custo mais eficaz para manter nas rotinas laboratoriais que realizam diagnóstico micológico (40).

Existem métodos modernos de isolamento e identificação que utilizam recursos mais rápidos e tecnológicos, porém são mais onerosos para a rotina laboratorial. O CHROMagar® *Candida*, por exemplo, é um meio de isolamento primário capaz de fazer a identificação presuntiva das espécies de leveduras mais comumente isoladas dos materiais clínicos, bem como facilitar o reconhecimento de culturas mistas. Seu princípio é a produção de cor nas colônias por reações enzimáticas espécie-específicas, com um substrato cromogênico do meio (3, 5, 9).

Em infecções fúngicas invasivas provocadas por espécies de *Candida*, a identificação de sua espécie é essencial, uma vez que a patogenicidade e o perfil de suscetibilidade frente a um determinado antifúngico são variáveis entre as diferentes espécies. Além disso, a identificação também auxilia na investigação de surtos de infecção e na caracterização epidemiológica das espécies patogênicas (10, 41).

1.5.1. Identificação das espécies de *Candida*

1.5.1.1. Identificação morfológica clássica

O critério tradicional que permite distinguir as espécies de leveduras é o morfológico. Deste modo, é possível avaliar a macromorfologia das colônias para caracterizá-las quanto à cor e textura, por exemplo, bem como a micromorfologia, que analisa o formato das células leveduriformes e a formação ou não de pseudo-hifas e hifas verdadeiras (3).

As colônias de leveduras do gênero *Candida* obtidas a partir de cultura em ágar Sabouraud dextrose (ASD) possuem coloração branco-amarelada e aspecto cremoso, podendo variar em opacidade e brilho conforme a espécie (Figura 1). Quando submetidas à prova do Tubo Germinativo, as leveduras podem formar pseudo-hifas ou hifas verdadeiras, a depender da espécie (Figura 2). Além desta técnica, existe também a filamentação em ágar fubá (*Corn Meal*), que permite verificar o arranjo micromorfológico formado pela levedura e, assim, distinguir a espécie a qual pertence (Figura 3) (3, 5-7).



Figura 1: Aspecto macromorfológico de cultura de *Candida* sp. em ágar Sabouraud dextrose (Laboratório de Investigação em Fungos – FCM/UNICAMP)



Figura 2: Prova do Tubo Germinativo positiva para *C.albicans* (Laboratório de Investigação em Fungos – FCM/UNICAMP)



Figura 3: Filamentação de *C.albicans* em ágar fubá (Laboratório de Investigação em Fungos – FCM/UNICAMP)

1.5.1.2. Identificação por métodos automatizados

Métodos automatizados como o BD Phoenix[®] (Becton, Dickinson and Company – BD Diagnostics, Sparks, MD) e o Vitek[®] 2 (bioMérieux, Marcy L'Etoile, França) são sistemas que realizam a identificação de leveduras e, no caso do Vitek[®] 2, além da identificação, pode-se realizar também o teste de suscetibilidade frente aos antifúngicos.

O sistema Vitek[®] 2 (Figura 4) é um sistema modular integrado composto por uma unidade de enchimento seladora, um leitor-incubador, um módulo de controle computadorizado, um terminal de dados e uma impressora. O equipamento utiliza substratos cromogênicos desidratados depositados em finos cartões de plástico que, ao entrarem em contato com a suspensão do micro-organismo a ser identificado, são reidratados. Esse sistema detecta o crescimento do agente etiológico e a ocorrência de reações metabólicas nas microcavidades dos cartões de plástico utilizando uma tecnologia baseada na fluorescência, na mudança de coloração promovida pelas reações bioquímicas e também pela densidade óptica. Sua utilização não requer o uso de reagentes adicionais e os resultados das identificações de leveduras são disponibilizados dentro de um período de 4 a 18 horas (42, 43).

O equipamento BD Phoenix[®] (Figura 4) utiliza painéis descartáveis que contêm pequenos poços nos quais são armazenados substratos cromogênicos e fluorogênicos. Os painéis são manualmente preenchidos com a suspensão do micro-organismo e levados ao interior do equipamento para que este realize a leitura das diferentes reações bioquímicas e enzimáticas baseadas no crescimento microbiano e na degradação dos substratos. Este sistema também não requer o uso de reagentes adicionais e os resultados das identificações de leveduras são disponibilizados dentro de um período de 4 a 16 horas (43, 44).



Figura 4: Equipamentos BD Phoenix[®] (A) e Vitek[®] 2 (B)

1.5.1.3. Identificação molecular

As ferramentas moleculares apresentam elevadas sensibilidade e especificidade na detecção dos micro-organismos por meio de seu DNA (ácido desoxirribonucléico), permitindo resolver as limitações do diagnóstico convencional e, desta forma, podendo ser empregadas tanto na identificação como na tipagem para epidemiologia molecular

desses micro-organismos. O alvo mais frequente das pesquisas que utilizam a reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) são os DNA ribossomais (rDNA), cujos genes são encontrados em todos esses micro-organismos (45).

Para identificar o micro-organismo por sequenciamento de DNA, o gene alvo deve conter as regiões altamente conservadas que podem servir como locais de ligação de iniciadores, e estas regiões conservadas devem conter regiões com variabilidade de sequência suficiente para permitir a discriminação ao nível de gêneros e espécies. Desta forma, o sequenciamento das regiões *Internal Transcribed Spacer* (ITS), constituintes do DNA ribossomal, são alguns exemplos do que vem sendo estudado e utilizado em relação à identificação molecular das espécies fúngicas (46).

Para fins de diagnóstico a estrutura geral da região gênica do rDNA fúngico consiste de quatro genes ribossomais (subunidade pequena 18S, subunidade 5.8S, subunidade grande 25-28S e subunidade 5S) separados por regiões ITS por meio do rRNA, como mostra a Figura 5.

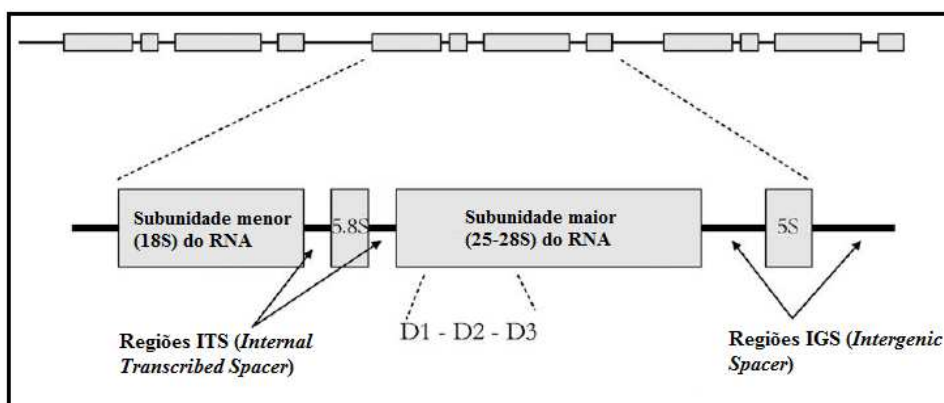


Figura 5: Esquema ilustrativo do DNA ribossomal fúngico (adaptado de Wengenack e Binnicker, 2009) (46)

O sequenciamento da região ITS é muito utilizado para identificação de espécies mais comuns de fungos – inclusive do gênero *Candida* – e essa região foi considerada o “código de barras” para a identificação molecular dos fungos. Os alvos mais frequentemente empregados nos métodos de sequenciamento são as regiões ITS1 e ITS2 (amplificada pelos iniciadores ITS4-ITS5), localizadas entre as subunidades ribossomais 18S e 28S, e a região D1-D2, constituinte da subunidade ribossomal 12-28S (46).

O sequenciamento da região D1/D2 (geralmente amplificada pelos iniciadores NL1-NL4) foi demonstrado ser satisfatório para a identificação exata da maioria das

espécies de leveduras. Entre *C.albicans* e *C.dubliniensis*, por exemplo, existem 13 diferenças relatadas entre os nucleotídeos da região D1/D2, o que se considera ser uma variação suficiente para diferenciar essas duas espécies (47).

Por meio de análises das regiões ITS e D1/D2 é possível a identificação de leveduras em gênero e espécie e também a verificação de alterações entre as espécies e se há alguma inter-relação entre elas (46).

1.6. Teste de suscetibilidade frente aos antifúngicos

A partir dos dados e da frequência de casos de falha terapêutica, houve a necessidade de novos métodos que avaliassem com mais acurácia a suscetibilidade dos fungos frente aos agentes antifúngicos (17). No ano de 2002, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) lançou o documento M27-A2 (48), padronizando o teste de suscetibilidade a antifúngicos para leveduras. Esse teste possui grande importância por guiar as decisões clínicas com o objetivo de promover melhores resultados para o paciente e talvez, mais do que isso, poder determinar os agentes antifúngicos que não vão funcionar no tratamento (34, 35).

A interpretação dos resultados visa aprimorar a correlação entre a clínica e os valores de concentração inibitória mínima de *Candida* spp., com a finalidade de melhorar a capacidade preditiva dos testes de suscetibilidade. Neste aspecto, no novo documento do CLSI (M27-S4) já são avaliados pontos de corte específicos de alguns antifúngicos para cada espécie dentro do gênero *Candida*, o que torna cada vez mais imprescindível a correta identificação das espécies (49).

De acordo com as orientações interpretativas do CLSI (Tabela 1) pode-se dizer que isolados de *Candida albicans* inibidos por $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ de fluconazol, $\geq 1 \mu\text{g/mL}$ de voriconazol e $\geq 1 \mu\text{g/mL}$ de caspofungina são considerados resistentes a estes agentes. Já os isolados desta espécie inibidos $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ de fluconazol, $\leq 0,125 \mu\text{g/mL}$ de voriconazol e $\leq 0,25 \mu\text{g/mL}$ de caspofungina são considerados suscetíveis.

É importante observar que, de forma geral, a correlação entre valores de CIMs e evolução clínica frente à terapêutica antifúngica é apenas parcial. O valor da CIM de um determinado antifúngico não define, isoladamente, o resultado final do tratamento em questão. Capacidade de resposta imunológica do hospedeiro, estágio avançado de doença antes do diagnóstico, formação de coleções purulentas em vísceras ou cavidades e persistência de próteses ou cateteres infectados são todos exemplos de fatores que

interferem na eficácia do tratamento a despeito da atividade inibitória ou microbici da terapia usada (24, 50, 51). Por estes motivos, observa-se apenas uma correlação parcial entre falha ou eficácia terapêutica de tratamento com o perfil de suscetibilidade *in vitro* obtido com determinado antifúngico. Diante desta limitação dos valores absolutos de CIM, pode-se inferir que, se existe resistência *in vitro*, maior a chance de haver falha terapêutica. Por outro lado, se os dados *in vitro* forem de sensibilidade, existe maior probabilidade de eficácia no tratamento (24, 50, 51).

Tabela 1: Orientações interpretativas do CLSI para testes de suscetibilidade *in vitro* de *Candida* spp. frente aos antifúngicos (M27-A3 e M27-S4 - *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2008)

Antifúngico	Interpretação da concentração inibitória mínima (µg/mL) após 48h		
	Suscetível (S)	Suscetível-dose dependente (S-DD)	Resistente (R)
Anfotericina B ⁽¹⁾	-	-	>1
Caspofungina ⁽²⁾⁽³⁾	≤0,25	-	≥1
Fluconazol ⁽³⁾	≤2	4	≥8
5-Flucitosina	≤4	-	≥32
Itraconazol	≤0,125	0,25-0,5	≥1
Micafungina	≤2	-	-
Voriconazol ⁽³⁾	≤0,125	0,25-0,5	≥1

NOTAS: ⁽¹⁾ a metodologia proposta pelo CLSI não permite a atribuição dos parâmetros S e S-DD para a anfotericina B e conclui que os isolados que apresentarem CIM >1µg/mL são tidos como provavelmente resistentes a tal antifúngico.

⁽²⁾ a leitura dos testes de suscetibilidade frente a caspofungina deve ser realizada após 24h de crescimento.

⁽³⁾ os valores de CIM descritos para fluconazol, voriconazol e caspofungina são específicos para a espécie *Candida albicans* e estão propostos no documento M27-S4 (49) do CLSI.

1.7. Justificativa

A ocorrência de candidemias causadas por outras espécies de *Candida* que não *Candida albicans* tem sido alvo de grande preocupação em instituições de saúde devido à conhecida resistência de alguns de seus representantes. Em um estudo recentemente realizado por Moretti e colaboradores (2013), durante o período de 2006 a 2010, foram descritos 313 isolados de *Candida* sp. em hemoculturas, sendo 138 (44%) deles causados por *C.albicans*. Apesar de ser uma porcentagem significativa, o estudo de Moretti *et al.* analisou apenas as espécies de *Candida* que não *C.albicans*. Desta forma, a preocupação com a ocorrência de resistência em isolados de *Candida albicans* motivou a verificação do perfil de suscetibilidade desses 44% de isolados, que representam nossos casos mais críticos.

O fenômeno da resistência a fluconazol é também relatado em isolados de *C.albicans* (52, 53). Em instituições que fazem uso profilático de fluconazol, como o HC-UNICAMP, esta é uma preocupação constante. Pacientes que fazem uso terapêutico prolongado de azóis (principalmente fluconazol) também estão sujeitos ao desenvolvimento de resistência de suas cepas. Em nossa instituição, dois recentes isolados de *C.albicans* – um de escovado esofágico (LIF-E10) e outro de cavidade oral (LIF 12560) – apresentaram fenótipo de resistência *in vitro* a fluconazol, já comprovado por meio de avaliação de suscetibilidade. Tal fato causou preocupação, intensificando o interesse em desvendar os mecanismos envolvidos neste processo de resistência.

2. OBJETIVOS

Objetivo Principal

Verificar o perfil de suscetibilidade frente aos antifúngicos de isolados de *Candida albicans* obtidos de hemoculturas realizadas no Hospital de Clínicas da UNICAMP durante o período de 2006 a 2010. Além disso, realizar o estudo do gene *ERG11* dos dois isolados LIF-E10 e LIF 12560 que apresentaram resistência *in vitro* a fluconazol para investigar se existem mutações em tal gene.

Objetivos Específicos

- Reativar e confirmar a identificação de isolados clínicos de *Candida albicans* provenientes de hemoculturas processadas no período de 2006 a 2010.
- Avaliar a suscetibilidade *in vitro* dos isolados provenientes de hemocultura e dos recentes isolados LIF-E10 e LIF 12560 pelo método de microdiluição em caldo frente aos antifúngicos micafungina, anfotericina B, 5-flucitosina, itraconazol, fluconazol, voriconazol e caspofungina.
- Realizar o sequenciamento do gene *ERG11* dos dois isolados LIF-E10 e LIF 12560 para investigar a ocorrência de possíveis mutações associadas à resistência ao fluconazol.
- Realizar o sequenciamento do gene *ERG11* dos isolados de hemocultura que apresentaram resistência *in vitro* a fluconazol para investigar a ocorrência de possíveis mutações associadas a este antifúngico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado com suporte financeiro provido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, sob processo número 14/08693-8.

3.1. Local de trabalho

Os locais de desenvolvimento deste estudo foram o Laboratório de Investigação em Fungos (LIF), do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas (FCM/UNICAMP), e o Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas (LEMDI), da Disciplina de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Ciências Médicas (FCM/UNICAMP).

Os isolados obtidos das hemoculturas e o de cavidade bucal (LIF 12560) foram coletados para fins de exame de rotina diagnóstica e, ao serem submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa da FCM – e por recomendação deste –, foram retirados da Plataforma Brasil, uma vez que não houve utilização de material clínico de pacientes e nem consulta a informações de prontuários, apenas a avaliação dos micro-organismos.

O isolado LIF-E10 também faz parte de outro projeto de pesquisa, sob responsabilidade da Dr^a Cristiane Kibune Nagasako Vieira da Cruz, que foi aprovado pelo Comitê de Ética sob número CEP 1316/2011 – CAAE 1218.0.146.000-11.

3.2. Isolados clínicos para estudo

Para a realização deste trabalho, 147 isolados clínicos de *Candida albicans* mantidos na Micoteca do LIF, previamente obtidos de amostras de hemocultura de diversos pacientes a partir dos exames processados na rotina laboratorial, foram selecionados para serem reativados. Destes, 138 compreendem os isolados presentes no estudo de Moretti e colaboradores (27) e nove são provenientes dos ambulatórios de Neonatologia e Pediatria do Hospital de Clínicas, que não estão incluídos nos estudos dos autores citados. Os nove micro-organismos foram incluídos porque ocorreram no período que abrange este estudo e com o intuito de fazerem parte da vigilância de resistência proposta no trabalho.

Os isolados clínicos de hemoculturas são provenientes de pacientes atendidos no

HC-UNICAMP durante o período de janeiro 2006 a dezembro 2010 e estavam armazenados pelo método de Castellani (54) sendo, portanto, conservados à temperatura ambiente em frascos de vidro contendo água destilada estéril. Foi selecionado apenas um isolado clínico de cada paciente.

Além destes, foram utilizados um isolado clínico proveniente de uma amostra de escovado esofágico (LIF-E10) e outro proveniente de uma amostra de cavidade bucal (LIF 12560). Ambos são de dois pacientes diferentes e foram obtidos nos anos de 2002 e 2014, respectivamente, estando previamente armazenados na Micoteca do LIF.

As cepas *C.albicans* ATCC 90028, *C.parapsilosis* ATCC 22019 e *C.krusei* ATCC 6258 foram empregadas para o controle de qualidade.

3.3. Reativação dos micro-organismos selecionados para o estudo

Para a etapa de reativação, os isolados armazenados em água destilada estéril nos frascos de vidro foram levemente agitados e uma alíquota de 1mL foi transferida para uma placa de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose (ASD). As placas contendo os repiques foram incubadas durante 24h a 35°C e, posteriormente, deixadas em temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$) por mais 48h para viabilizar o crescimento das colônias.

Para os isolados que não apresentaram crescimento após duas tentativas de reativação, foram adicionados, em tubo de vidro estéril, 5mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e o conteúdo remanescente do isolado mantido no frasco com água estéril, sendo posteriormente incubado durante 24h a 35°C. Após incubação, foi feita a semeadura deste material em placa de Petri contendo ASD com a finalidade de auxiliar os micro-organismos a acionar o metabolismo de crescimento.

3.4. Identificação dos isolados clínicos

Todos os isolados foram previamente identificados (gênero e espécie) no Laboratório de Micologia do HC-UNICAMP de acordo com metodologia clássica, que utilizou a combinação de características macroscópicas e micromorfológicas em provas como Tubo Germinativo e filamentação em ágar fubá (*Corn Meal*), bem como metodologia automatizada, que empregou os equipamentos Vitek[®] e Vitek[®] 2 (bioMérieux), antes do processo de armazenagem.

No ano de 2014, o Vitek[®] 2 foi substituído pelo equipamento BD Phoenix[®]. Desta forma, tornou-se necessária a reidentificação dos isolados deste projeto no BD

Phoenix[®], que está atualmente em uso na rotina do Laboratório de Microbiologia da Divisão de Patologia Clínica do HC-UNICAMP.

3.4.1. Identificação dos isolados clínicos utilizando o BD Phoenix[®]

Para a etapa de identificação dos isolados clínicos utilizando o equipamento BD Phoenix[®], as leveduras foram submetidas a crescimento em placa de Petri contendo ASD. As placas contendo os repiques foram incubadas em estufa bacteriológica durante 24h a 35°C.

Posteriormente, a partir da cultura, foi feita uma suspensão de cada levedura em caldo próprio para o equipamento (*Phoenix ID Broth*), ajustando a suspensão ao intervalo de 2.0 – 2.4 da escala de McFarland, com o auxílio do nefelômetro BD Phoenix Spec[®]. As suspensões foram depositadas nos painéis de identificação (*YST-ID Phoenix*) e, após o cadastramento dos códigos dos painéis no sistema da máquina, estes foram incubados no BD Phoenix[®] durante o período necessário para a identificação (aproximadamente 5h). Os isolados para os quais houve divergência de identificação entre os equipamentos Vitek[®] 2 e BD Phoenix[®] foram submetidos ao método de sequenciamento (item 4.5.) para comprovar a espécie a qual pertencem.

3.5. Sequenciamento dos isolados clínicos que apresentaram resultados divergentes entre os equipamentos

Dos 147 isolados clínicos, foi possível a reativação de 143. Dos 143 isolados submetidos ao equipamento BD Phoenix[®], 15 foram identificados por este como *Candida dubliniensis*, havendo assim a necessidade da realização da técnica de sequenciamento para que fosse confirmada a espécie a qual estes isolados pertencem. O sequenciamento utilizou os pares de iniciadores ITS4-ITS5 (região ITS1/ITS2) e NL1-NL4 (região D1/D2) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em duas reações distintas.

3.5.1. Extração de DNA

Para a extração do DNA foi utilizado o método de lise alcalina modificado (55, 56). Em um tubo de polipropileno de 1,5mL foram adicionados 50µL de água destilada estéril e uma alça com o micro-organismo. A essa suspensão foram adicionados 50µL de NaOH (100 mM). A amostra foi submetida à agitação vigorosa por 10 segundos e, após a agitação, submetida a uma temperatura de 95°C por 15 minutos em banho seco. Em

seguida, foram adicionados 11µL de Tris HCl (pH 7,0) à amostra, que foi então submetida a centrifugação a 5000 rotações por minuto (rpm) durante 2 minutos a temperatura de 20°C. O DNA da amostra (presente no sobrenadante) foi transferido para outro tubo para ser utilizado nas técnicas moleculares.

3.5.2. Amplificação do DNA alvo pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

A detecção de DNA fúngico foi realizada pela amplificação utilizando os iniciadores universais *forward* ITS5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e *reverse* ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') em uma reação, e os iniciadores universais *forward* NL4 (5' GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') e *reverse* NL1 (5' GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') em outra reação.

A amplificação das amostras por PCR foi realizada em um tubo de polipropileno de 200µL contendo 12,5µL de PCR *Master Mix* (Promega, Fitchburg, WI, EUA), que contém a enzima *Taq DNA polymerase* (50U/mL), 50mM de cada iniciador, 50ng de DNA e água milli-Q para um volume final de 25µL.

Cada reação continha 12,5µL de PCR *Master Mix* (Promega, Fitchburg, WI, EUA), 10mM de cada iniciador, 100ng de DNA e água milli-Q para um volume final de 25µL. Cada ciclo de reação de amplificação consistiu na desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 57°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, além de uma extensão final a 72°C por 2 minutos em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os produtos da reação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2%, em corrida a 100V por 25 minutos. O gel foi corado com brometo de etídio e as bandas de DNA foram observadas em iluminação ultravioleta.

3.5.3. Purificação dos produtos de PCR

Foi realizada a purificação dos produtos de PCR pela adição de 2µL da enzima *Exosap-IT* (USB® Corporation, Cleveland, OH, EUA) a cada 5µL de produto de PCR. A mistura foi mantida a 37°C por 30 minutos e a 80°C por 15 minutos para inativar a enzima *Exosap-IT*. A reação de purificação foi realizada em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2%, em corrida a 100V por 30 minutos. O

gel foi corado com brometo de etídio e as bandas foram observadas em iluminação ultravioleta.

3.5.4. Reação de sequenciamento

Os produtos de PCR foram sequenciados com os iniciadores ITS4/ITS5 e NL1/NL4 utilizando o *Big DyeTM Terminator* v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Para o sequenciamento, foram preparadas reações contendo 1µL de *Big Dye Terminator*, 1µL de tampão, 1µL dos iniciadores ITS4/ITS5 e NL1/NL4 (cada iniciador em tubo diferente) a 1,6mM, 2µL do produto de PCR purificado e água milli-Q para um volume final de 10µL.

O ciclo consistiu de desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto e 30 ciclos de 96°C por 10 segundos, 55°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Após a reação de sequenciamento, as amostras passaram por precipitação e lavagem com etanol. Na primeira etapa, em cada amostra foram adicionados 5µL de EDTA (125mM) e 60µL de etanol 100%. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm, a temperatura de 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, foram adicionados 60µL de etanol 70% às amostras que foram centrifugadas a 13.000 rpm, a temperatura de 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as amostras passaram por secagem a vácuo.

Após a precipitação e lavagem com etanol, foram acrescentados 10µL de formamida HI-DI[®] (Applied Biosystems, Warrington, UK) às amostras, que foram incubadas em banho seco a 95°C por 2 minutos. Em seguida, as amostras foram colocadas em gelo durante 2 minutos.

As amostras foram aplicadas na placa de sequenciamento e levadas ao Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho (LaCTAD) da UNICAMP. O sequenciamento foi realizado no sequenciador automático 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

3.5.5. Análise

As seqüências de DNA *forward* e *reverse* de cada isolado para cada um dos dois pares de iniciadores (ITS4/ITS5 e NL1/NL4) foram editadas e alinhadas no programa

Geneious[®] versão 9.0.2 (<http://www.geneious.com>) (57).

A sequência consenso foi alinhada com sequências padrão de *Candida albicans* com a ferramenta Clustal W (58) no próprio programa Geneious[®] e, posteriormente, foram inseridas nos bancos de dados GenBank, ISHAM (*International Society for Human and Animal Mycology ITS Database*) e CBS (*CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre*) para verificação da espécie.

3.6. Testes de suscetibilidade aos antifúngicos *in vitro* pelo método de microdiluição em caldo

A avaliação da suscetibilidade *in vitro* frente aos antifúngicos foi realizada de acordo com o documento M27-A3 (35) e de seu suplemento M27-S4 (49), do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), pelo método de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Os antifúngicos avaliados foram micafungina (MCFG), anfotericina B (AMB), 5-flucitosina (5-FC), fluconazol (FCL), voriconazol (VRC), itraconazol (ITC) e caspofungina (CASP).

3.6.1. Meio de cultura

Para todos os testes de suscetibilidade aos antifúngicos foi utilizado o meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio, tamponado com 0,165 M de ácido morfolinopropanossulfônico (MOPS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

3.6.2. Inóculo

3.6.2.1. Inóculo para testes em placa pré-preparada (*dry plate*)

Os testes de suscetibilidade frente aos antifúngicos micafungina (MCFG), anfotericina B (AMB), 5-flucitosina (5-FC), fluconazol (FLC), voriconazol (VRC) e itraconazol (ITC) foram realizados com a utilização de placas de microdiluição pré-preparadas (*dry plates*) (Eiken Chemical Co., Tokyo, Japan).

Após o crescimento fúngico de 24h a 35°C em placas de Petri contendo o meio de cultura ASD, o inóculo foi preparado adicionando-se 5mL de solução de salina 0,85% a um tubo de ensaio no qual foi acrescentada de uma a duas unidades formadoras de colônia (UFC) do micro-organismo. Esta suspensão foi equiparada visualmente à

turbidez de 0,5 da escala Mc Farland.

3.6.2.2. Inóculo para testes com caspofungina

O antifúngico caspofungina não faz parte da grade de antifúngicos da *dry plate*, portanto os testes foram feitos separadamente em placas de microdiluição estéreis.

Após o crescimento fúngico de 24h a 35°C em placas de Petri contendo o meio de cultura ASD, o inóculo foi preparado adicionando-se 5mL de solução de salina 0,85% a um tubo de ensaio no qual foi acrescentada de uma a duas UFC do micro-organismo. Posteriormente, foi realizada a contagem das leveduras no retículo central de uma câmara de Neubauer. O objetivo foi a obtenção de inóculo com a concentração final de 0,5 a 2,5x 10³UFC/mL.

3.6.3. Preparo das placas de microdiluição

3.6.3.1. Sistema *dry plate*

Nesse método, diluições seriadas dos agentes antifúngicos estão adsorvidas na base dos poços da placa de 96 poços. Duas colunas de poços não contêm antifúngicos e nessas colunas são dispostos os controles de qualidade positivo (contendo apenas o inóculo no meio de cultura RPMI) e negativo (contendo apenas o meio de cultura RPMI). Para os testes, foram adicionados 100μL do meio de cultura RPMI contendo o inóculo na concentração final de 0,5–2,5 x 10³UFC/mL, inclusive na coluna do controle positivo (11ª coluna). Na coluna do controle negativo (12ª) são adicionados 100μL de RPMI. Foram avaliados MCFG (faixa de concentração 0,015-8μg/mL), AMB (faixa de concentração 0,03-16μg/mL), 5-FC (faixa de concentração 0,125-64μg/mL), FLC (0,125-64μg/mL), VRC (faixa de concentração 0,015-8μg/mL) e ITC (faixa de concentração 0,015-8μg/mL).

3.6.3.2. Placas de microdiluição para caspofungina

O teste para determinação da CIM-CASP foi realizado separadamente, pois esse antifúngico não faz parte da grade de antifúngicos das *dry plate*. O antifúngico CASP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi preparado de acordo com a ficha de especificação do fabricante, ajustando-se na concentração desejada.

O teste foi realizado em placas de microdiluição com fundo em “U” estéreis, nas

quais foram transferidos todos os componentes preparados anteriormente da seguinte forma: 20µL do antifúngico diluído nas diferentes concentrações até a 10ª coluna; 160µL do meio de RPMI 1640 em todas as fileiras e mais 20µL de inóculo em todos os poços, exceto nos da 11ª coluna, que corresponde ao controle negativo. Na 12ª coluna, por se tratar do controle positivo de crescimento, não foi adicionado o antifúngico. Totalizou-se um volume final de 200µL, resultando em uma concentração final do inóculo de $0,5\text{--}2,5 \times 10^3 \text{UFC/mL}$. A faixa de concentração utilizada para CASP foi $\leq 0,015\text{--}8\mu\text{g/mL}$, seguindo recomendação do CLSI.

3.6.4. Leitura das CIM

As placas foram incubadas na temperatura de 35°C, sendo a leitura realizada após 24 e 48 horas de incubação. Para a leitura, comparou-se o crescimento fúngico de cada poço com o do controle positivo de acordo com os documentos M27-A3 e M27-S4 do CLSI, sendo esta leitura realizada com o auxílio de um espelho de leitura (Figura 6).

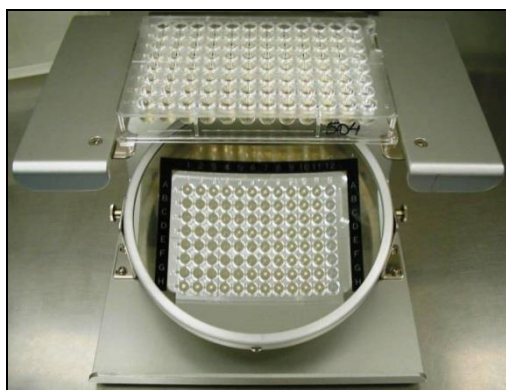


Figura 6: Espelho de leitura com placa de microdiluição posicionada (Laboratório de Investigação em Fungos – FCM/UNICAMP)

O crescimento dos micro-organismos estudados foi numericamente determinado de acordo com os seguintes critérios:

- *score* 4: quando não houve nenhuma redução no crescimento, ou seja, 100% de crescimento e 0 % de inibição do crescimento;
- *score* 3: quando ocorreu leve redução no crescimento – 80% de crescimento e apenas 20% de inibição de crescimento em comparação ao do obtido no controle positivo;
- *score* 2: quando houve significativa redução no crescimento, isto é 50% de crescimento em comparação com o controle positivo do teste e 50% de inibição de crescimento;

- *score* 1: quando ocorreu 20% de crescimento e 80% de inibição de crescimento em comparação ao crescimento obtido no controle positivo;
- *score* 0 (zero): para ausência de crescimento visível. Resultado esperado para antifúngicos com mecanismo de ação fungicida.

Segundo o documento M27-A3 do CLSI, a CIM para a AMB foi definida como sendo a menor concentração deste antifúngico capaz de inibir 100% do crescimento (*score* 0). As CIMs dos demais agentes antifúngicos (MCFG, 5-FC, FCL, VRC, ITC e CASP) foram determinadas como sendo a mais baixa concentração desses agentes que causou 50% (*score* 2) de inibição do crescimento.

3.6.5. Controle de Qualidade

Para validação dos testes com antifúngicos, foram utilizadas as cepas padrão de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258, como recomendado pelo CLSI. Para cada diluição de antifúngicos realizou-se o teste de suscetibilidade com as cepas padrão, tendo seus resultados de CIM comparados com os valores estabelecidos pelo documento M27-A3 do CLSI.

3.7. Sequenciamento do gene *ERG11* dos isolados LIF-E10 e LIF 12560

Os iniciadores utilizados para amplificar o gene *ERG11* de *C.albicans* (ERGSec1A/1B, ERGSec 2A/2B e ERGSec 3A/3B) foram descritos previamente por Xu e colaboradores (2008) e amplificam três regiões, com cerca de 480 pares de bases cada, conforme a Tabela 2.

Tabela 2: Descrição dos iniciadores utilizados

Espécie	Gene	Start/Stop Codon	Iniciadores	Região amplificada
<i>C.albicans</i> (GenBank 2503) (38)	1851pb	148/1734pb	ERGSec1A (5'- TTAGTGTTTTATTGGATTTCCTTGGTT-3') <i>forward</i>	295 a 777pb
			ERGSec1B (5'- TCTCATTTTCATCACCAAATAAAGATC-3') <i>reverse</i>	
			ERGSec2A (5'- ACCAGAAATTACTATTTTCACTGCTTCA-3') <i>forward</i>	723 a 1204pb
			ERGSec2B (5'- AAGTCAAATCATTCAAATCACCACCT-3') <i>reverse</i>	
			ERGSec3A (5'- AGGTGGTGATTGGAATGATTGACTT-3') <i>forward</i>	1179 a 1667pb
			ERGSec3B (5'- GAACTATAATCAGGGTCAGGCACTTT-3') <i>reverse</i>	

3.7.1. Extração de DNA

Vide item 3.5.1.

3.7.2. Amplificação do DNA alvo pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

A amplificação do DNA fúngico extraído foi realizada com a utilização dos iniciadores ERGSec1A/1B, ERGSec2A/2B e ERGSec3A/3B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

A PCR das amostras foi realizada em um tubo de polipropileno de 200µL contendo 12,5µL de PCR *Master Mix* (Promega, Fitchburg, WI, EUA), que contém a enzima *Taq DNA polymerase* (50U/mL), 50mM de cada iniciador, 50ng de DNA e água milli-Q para um volume final de 25µL.

Cada ciclo de reação de amplificação foi realizado segundo Xu e colaboradores (38) e consistiu em: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 33 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, 33 ciclos de anelamento (extensão) a 58°C por 1 minuto e a 72°C por 1 minuto, além de uma extensão final a 72°C por 7 minutos. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Os produtos da reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, em corrida a 100V por 25 minutos. O gel foi corado com brometo de etídio e as bandas foram observadas em iluminação ultravioleta.

3.7.3. Purificação dos produtos de PCR

Foi realizada a purificação dos produtos de PCR pela adição de 2μL da enzima *Exosap-IT* (USB[®] Corporation, Cleveland, OH, EUA) a cada 5μL de produto de PCR. A mistura foi mantida a 37°C por 30 minutos e a 80°C por 15 minutos para inativar a enzima *Exosap-IT*. A reação de purificação foi realizada em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2%, em corrida a 100V por 30 minutos. O gel foi corado com brometo de etídio e as bandas foram observadas em iluminação ultravioleta.

3.7.4. Reação de sequenciamento

Os produtos de PCR foram sequenciados com a utilização dos iniciadores ERGSec1A/1B, ERGSec2A/2B e ERGSec3A/3B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), utilizando o *Big DyeTM Terminator* v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Para o sequenciamento, foram preparadas reações contendo 1μL de *Big Dye Terminator*, 1μL de tampão, 1μL dos iniciadores ERGSec1A/1B, ERGSec2A/2B e ERGSec3A/3B (cada iniciador em tubo diferente) a 1,6mM, 2μL do produto de PCR purificado e água milli-Q para um volume final de 10μL.

O ciclo consistiu de desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto e 30 ciclos de 96°C por 10 segundos, 55°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Após a reação de sequenciamento, as amostras passaram por precipitação e lavagem com etanol. Na primeira etapa, em cada amostra foram adicionados 5μL de EDTA (125mM) e 60μL de etanol 100%. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm, a temperatura de 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, foram adicionados 60μL de etanol 70% às amostras que foram centrifugadas a 13.000 rpm, a temperatura de 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as

amostras passaram por secagem a vácuo.

Após a precipitação e lavagem com etanol, foram acrescentados 10µL de formamida HI-DI[®] (Applied Biosystems, Warrington, UK) às amostras, que foram incubadas em banho seco a 95°C por 2 minutos. Em seguida, as amostras foram colocadas em gelo durante 2 minutos.

As amostras foram aplicadas na placa de sequenciamento e levadas ao sequenciador do Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas (LEMDI/UNICAMP). O sequenciamento foi realizado no sequenciador automático ABI Prism[®]3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

3.7.5. Análise

As sequências de DNA *forward* e *reverse* de cada isolado para cada um dos três pares de iniciadores ERGSec foram editadas e alinhadas no programa Sequencher[®] versão 5.2.4 (Gene Codes, Ann Arbor, MI, EUA) para formação de uma sequência consenso.

A sequência consenso foi alinhada com a sequência obtida para a cepa *Candida albicans* ATCC 90028 com a ferramenta Clustal W (58) no *software* MEGA6 (59) para verificar as mutações que ocorreram nos nucleotídeos.

Com o programa Gene Runner (Hastings Software Inc., Hastings, NY, USA; <http://www.generunner.net/>), as sequências consensos foram transcritas para verificar as substituições que ocorreram nos aminoácidos resultantes e que são, portanto, consequentes de mutações ocorridas nos nucleotídeos.

4. RESULTADOS

4.1. Reativação dos isolados clínicos

Do total de 147 isolados clínicos provenientes de amostras de hemocultura, 143 foram reativados. Os quatro isolados não reativados tiveram ausência de crescimento ou contaminação por bactérias após sucessivas tentativas de reativação. Além dos isolados de hemocultura, os dois isolados LIF-E10 e LIF 12560 também foram reativados. Portanto, a taxa de recuperação dos 145 isolados clínicos (143 provenientes de amostras de hemocultura, um de amostra de escovado esofágico e um de amostra de cavidade bucal) foi equivalente a 97%.

4.2. Identificação dos isolados clínicos utilizando o BD Phoenix[®]

Dos 143 isolados clínicos que passaram pela etapa de identificação no BD Phoenix[®], 128 (89,5%) foram identificados pelo equipamento como *Candida albicans* e 15 (10,5%) foram identificados como *Candida dubliniensis* (como demonstrado no Anexo 1).

4.3. Sequenciamento dos isolados clínicos que apresentaram resultados divergentes entre os equipamentos

Dos 143 isolados clínicos submetidos ao equipamento BD Phoenix[®], 15 foram identificados por este como *Candida dubliniensis*, apresentando divergência em relação ao resultado do Vitek[®] 2, em que a espécie dos 143 isolados foi classificada como *C.albicans*. Desta forma, foi realizado o sequenciamento desses isolados para confirmação da espécie.

O resultado do sequenciamento confirmou que todos isolados pertencem à espécie *C.albicans*, como mostram as tabelas 3 e 4.

Tabela 3: Sequenciamento ITS4 e ITS5 – Comparação com Genbank, ISHAM e CBS

N° LIF	Sequenciamento ITS4 e ITS5	Genbank		ISHAM		CBS	
		N° acesso	Homologia (%)	N° acesso	Homologia (%)	N° acesso	Homologia (%)
7585	<i>C.albicans</i>	KJ651883	99.9	MTS464	100	CBS8838	100
7707	<i>C.albicans</i>	KJ651883	100	MTS464	100	CBS8838	100
7794	<i>C.albicans</i>	KJ651883	99.9	MTS464	100	CBS2698	100
8123	<i>C.albicans</i>	KP341542	100	MTS464	100	CBS5982	100
8780	<i>C.albicans</i>	KJ651883	100	MTS464	100	CBS8838	100
9564	<i>C.albicans</i>	KJ651883	100	MTS464	100	CBS8838	100
10007	<i>C.albicans</i>	KF241845	98.8	MTS446	98.8	PYCC3436	98.7
10159	<i>C.albicans</i>	KJ651883	100	MTS464	100	CBS8837	100
10593	<i>C.albicans</i>	KJ651883	100	MTS464	100	CBS8758	100
10599	<i>C.albicans</i>	KJ651883	100	MTS464	100	CBS6426	100
10681	<i>C.albicans</i>	KP341542	100	MTS459	100	CBS2690	100
10759	<i>C.albicans</i>	KC954541	100	MTS473	100	CBS5990	100
10951	<i>C.albicans</i>	KP341542	100	MTS459	100	CBS5982	100
11060	<i>C.albicans</i>	KP341542	99.9	MTS447	100	CBS5982	99.8
11080	<i>C.albicans</i>	KJ739863	100	MTS466	100	CBS8757	100

Tabela 4: Sequenciamento NL1 e NL4 – Comparação com Genbank e CBS

N° LIF	Sequenciamento NL1 e NL4	Genbank		CBS	
		N° acesso	Homologia (%)	N° acesso	Homologia (%)
7585	<i>C.albicans</i>	KM103003	100	CBS2249	100
7707	<i>C.albicans</i>	KM103003	100	CBS2249	100
7794	<i>C.albicans</i>	KJ651883	99.5	JN882314	100
8123	<i>C.albicans</i>	KJ624046	100	CBS5982	100
8780	<i>C.albicans</i>	KJ624050	100	CBS2691	100
9564	<i>C.albicans</i>	KJ624050	100	CBS2691	100
10007	<i>C.albicans</i>	KM102998	99.9	CBS2717	99.8
10159	<i>C.albicans</i>	KM103004	99.9	CBS2689	100
10593	<i>C.albicans</i>	KJ624062	100	CBS2691	100
10599	<i>C.albicans</i>	KJ624050	100	CBS2691	100
10681	<i>C.albicans</i>	L28817	100	CBS5982	100
10759	<i>C.albicans</i>	KF214331	100	CBS5703	100
10951	<i>C.albicans</i>	L28817	100	CBS5982	100
11060	<i>C.albicans</i>	KP780462	99.9	CBS2249	99.8
11080	<i>C.albicans</i>	L28817	99.8	CBS5703	99.6

4.4. Testes de suscetibilidade frente aos antifúngicos

4.4.1. Isolados obtidos de amostras de hemoculturas

Para os isolados de hemocultura, as faixas de intervalos de CIM encontradas para cada antifúngico avaliado podem ser observadas na Tabela 5. Além disso, também são descritos os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ dos antifúngicos, que correspondem aos valores de CIM em que 50 e 90% dos isolados foram inibidos, respectivamente.

Conforme as orientações interpretativas do CLSI, todos os isolados de

hemocultura foram caracterizados dentro da faixa suscetível (S) frente a todos os antifúngicos testados.

Tabela 5: Intervalos de leitura da concentração inibitória mínima e valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ dos isolados de hemocultura frente aos agentes antifúngicos micafungina, anfotericina B, 5-flucitosina, fluconazol, itraconazol, voriconazol e caspofungina

Antifúngicos	Intervalo de leitura 48h (µg/mL)	CIM ₅₀ (µg/mL)	CIM ₉₀ (µg/mL)
Micafungina	≤0,015 – 0,03	≤0,015	≤0,015
Anfotericina B	0,125 – 1,00	0,25	0,5
5-Flucitosina	≤0,125 – 1,00	≤0,125	0,25
Fluconazol	≤0,125 – 0,5	0,25	0,25
Itraconazol	≤0,015 – 0,125	0,03	0,06
Voriconazol	≤0,015 – 0,06	≤0,015	0,06
Caspofungina	≤0,015 – 0,125	0,06	0,125

4.4.2. Isolados LIF-E10 e LIF 12560

Para o isolado LIF-E10, foram obtidos os seguintes resultados de CIM: MCFG <0,015µg/mL; AMPH 0,25µg/mL; 5-FC <0,125µg/mL; FCL 64µg/mL; ITC 0,25µg/mL; VRC 1µg/mL. Segundo as orientações interpretativas do CLSI, o isolado clínico em questão é suscetível (S) frente aos antifúngicos MCFG e 5-FC, suscetível-dose dependente (S-DD) frente a ITC e resistente (R) frente a FCL e VRC. Não foi avaliado o antifúngico caspofungina para LIF-E10 (Tabela 6).

Já para o isolado LIF 12560 foram obtidos os seguintes resultados de CIM: MCFG 0,03µg/mL; AMPH 0,25µg/mL; 5-FC <0,125µg/mL; FCL 8µg/mL; ITC 0,125µg/mL; VRC 0,25µg/mL. Segundo as orientações interpretativas do CLSI, o isolado clínico em questão é suscetível (S) frente aos antifúngicos MCFG, 5-FC e ITC, suscetível-dose dependente (S-DD) frente a VCZ e resistente (R) frente a FCL. Não foi avaliado o antifúngico caspofungina para LIF 12560 (Tabela 6).

Tabela 6: Intervalos de leitura da concentração inibitória mínima dos isolados LIF 12560 e LIF-E10 frente aos agentes antifúngicos micafungina, anfotericina B, 5-flucitosina, fluconazol, itraconazol e voriconazol

Antifúngicos	CIM (µg/mL) LIF 12560	CIM (µg/mL) LIF-E10	Parâmetro suscetível (S) segundo o CLSI (µg/mL)
Micafungina	0,03	≤0,015	≤2
Anfotericina B	0,25	0,25	*
5-Flucitosina	<0,125	<0,125	≤4
Fluconazol	8 (R)	64 (R)	≤2
Itraconazol	0,125	0,25 (S-DD)	≤0,125
Voriconazol	0,25 (S-DD)	1 (R)	≤0,125

* A metodologia proposta pelo CLSI não permite a atribuição dos parâmetros S e S-DD para a anfotericina B e conclui que os isolados que apresentarem CIM >1µg/mL são tidos como provavelmente resistentes a tal antifúngico.

4.5. Sequenciamento do gene *ERG11* dos isolados LIF-E10 e LIF 12560

O sequenciamento do gene *ERG11* dos isolados LIF-E10 e LIF 12560 resistentes a fluconazol revelou um total de 10 mutações nucleotídicas, das quais 6 geram substituição no aminoácido resultante (Tabela 7). Todas essas substituições relatadas no presente estudo já foram descritas na literatura como associadas ao fenômeno de resistência de *C.albicans* a fluconazol.

No caso do isolado LIF 12560, foram encontradas as mutações E116D, T128K, E266D e A298V. Para o isolado LIF-E10 as mutações encontradas foram G448V e G464S.

Tabela 7: Mutações nucleotídicas e substituições correspondentes nos aminoácidos

Isolados	Posição do nucleotídeo no gene <i>ERG11</i>	Mutação nucleotídica	Substituição gerada no aminoácido resultante	Referências
LIF 12560	349	GAA→GAT (349A>T)	E116D	(60, 61)
	358	AAG→AAA (358A>G)	Sinônima (K/K, aa119)	---
	384	ACA→AAA (384A>C)	T128K	(60)
	550	CAT→CAC (550C>T)	Sinônima (H/H, aa183)	---
	799	GAA→GAC (799A>C)	E266D	(60, 62)
	894	GCT→GTT (894 C>T)	A298V	(63)
	1204	TAC→TAT (1204C>T)	Sinônima (Y/Y, aa401)	---
	1471	AAC→AAT (1471C>T)	Sinônima (N/N, aa490)	---
LIF E10	1343	GGG→GTG (1343G>T)	G448V	(38, 64)
	1390	GGT→AGT (1390G>A)	G464S	(64, 65)

5. DISCUSSÃO

Apesar dos avanços nas intervenções preventivas, no diagnóstico e na terapêutica, infecções fúngicas invasivas têm causado morbidade e mortalidade significativas em pacientes imunocomprometidos (66). O surgimento de resistência a antifúngicos em leveduras fornece um excelente exemplo de que a evolução desses micro-organismos teve profundas consequências para a saúde humana (29).

Ao mesmo tempo, nestes últimos anos, o conhecimento das bases moleculares da resistência antifúngica progrediu bastante, contribuindo para a identificação dos mecanismos responsáveis pela resistência aos antifúngicos em *Candida albicans* e outras espécies de *Candida* (67, 68).

5.1. Reativação dos isolados clínicos

Do total de 147 isolados clínicos provenientes de amostras de hemocultura, 143 foram reativados. Os quatro isolados não reativados tiveram ausência de crescimento ou contaminação por bactérias após sucessivas tentativas de reativação. Além dos isolados de hemocultura, os dois isolados LIF-E10 e LIF 12560 também foram reativados. Portanto, a taxa de recuperação dos 145 isolados clínicos (143 provenientes de amostras de hemocultura, um de amostra de escovado esofágico e um de amostra de cavidade bucal) foi equivalente a 97%.

Os isolados clínicos de *Candida albicans* selecionados para esse estudo estavam armazenados em água destilada estéril a temperatura ambiente. A preservação em água destilada estéril a temperatura ambiente, conforme descrito por Castellani em 1939 (54), é um método simples, rápido e barato de preservação, e demonstrou ser eficiente para a preservação dos isolados clínicos selecionados para o presente estudo. Odds (69), em seu estudo sobre preservação em água, a longo prazo, de 1583 leveduras de interesse médico, relatou uma taxa de recuperação equivalente a 97% após 5 anos de armazenamento e de 96% após 10 anos de armazenamento.

Para a preservação de isolados fúngicos por congelamento, o guia de micologia da ATCC recomenda o uso de glicerol ou DMSO como crioprotetores (ATCC® *Mycology Culture Guide*). Desta forma, todos os isolados reativados no presente trabalho, além de serem estocados novamente em água destilada estéril, foram armazenados em glicerol a 15%.

5.2. Identificação dos isolados que apresentaram divergência entre os equipamentos

A identificação de leveduras é baseada em várias provas que avaliam as características morfológicas e bioquímicas desses micro-organismos. Alguns testes são utilizados rotineiramente (produção do Tubo Germinativo, microcultivo em ágar fubá). Porém, os sistemas semiautomatizados e automatizados estão cada vez mais sendo implantados para auxiliar e facilitar a identificação das leveduras.

Até o início do ano de 2014, a rotina do Laboratório de Microbiologia da Divisão de Patologia Clínica do HC-UNICAMP contava com o equipamento Vitek[®] 2 para auxiliar na identificação dos micro-organismos isolados em culturas. Posteriormente, com a troca deste equipamento pelo BD Phoenix[®], fez-se necessária a reidentificação, neste equipamento, dos 143 isolados clínicos deste estudo que anteriormente passaram pelo Vitek[®] 2.

Dois estudos recentes demonstraram pequenas divergências entre as identificações realizadas por ambos os equipamentos. Posteraro e colaboradores (44) relatam que, de 140 amostras sabidamente conhecidas de *Candida albicans* submetidas às metodologias desses dois sistemas, 138 foram corretamente identificadas pelo BD Phoenix[®], uma foi identificada como pertencente ao complexo *C.parapsilosis* e uma não foi identificada. Já para o Vitek[®] 2, 135 das 140 amostras foram corretamente identificadas como *C.albicans*, quatro foram identificadas como outras espécies (não discriminadas pelos autores) e uma não foi identificada.

Won e colaboradores (70) relataram que, de 61 amostras conhecidas de *C.albicans*, 60 foram corretamente identificadas pelo BD Phoenix[®] e uma foi identificada como outra espécie (não discriminada pelos autores). Para o Vitek[®] 2, 59 das 60 amostras foram corretamente identificadas e duas não foram identificadas.

No presente trabalho, os equipamentos apresentaram 15 resultados divergentes dentre as 143 amostras, demonstrando uma taxa considerável de discrepância em relação aos dois estudos citados. Os testes realizados neste estudo com o BD Phoenix[®] revelaram um total de 128 amostras pertencentes a espécie *C.albicans* e 15 a espécie *C.dubliniensis* e, destas 15, nenhuma foi confirmada como *C.dubliniensis* pelo método molecular de sequenciamento.

Embora no momento existam pouquíssimas avaliações que comparem esses dois

equipamentos no processo de identificação de leveduras e tais avaliações creditem uma melhor taxa de identificação ao BD Phoenix[®], pôde-se observar que este equipamento não demonstrou uma performance superior ao Vitek[®] 2 nos testes realizados por este trabalho. Dessa forma, apesar de os nossos achados não corroborarem com os de Posteraro *et al.* e Won *et al.*, o número de falhas de identificação pelo BD Phoenix[®] é significativamente maior que o dos autores mencionados, resultando na necessidade de uma maior cautela com os laudos emitidos por este equipamento.

5.3. Teste de suscetibilidade frente aos antifúngicos

Os relatos de resistência *in vitro* de *C.albicans* provenientes de episódios de candidemia ainda não são muito frequentes, sendo que a resistência primária ocorre em pouquíssimos casos. Entretanto, o uso profilático de antifúngicos em pacientes com maior risco de desenvolver infecções fúngicas invasivas tem alterado o perfil de suscetibilidade dessas leveduras, fazendo-se necessária a vigilância desse perfil de isolados clínicos envolvidos nos episódios de candidemia.

No presente estudo, 100% dos 143 isolados de hemocultura foram caracterizados dentro da faixa suscetível (S) frente a micafungina, anfotericina B, 5-flucitosina, fluconazol, voriconazol, itraconazol e caspofungina, ressaltando a prevalência do perfil suscetível desta espécie (23, 71).

Bustamante e colaboradores (72) realizaram um estudo no Peru com 153 isolados de *Candida* sp. provenientes de hemocultura e, deste total, 61 (39,9%) correspondiam à espécie *C.albicans*. Apesar de utilizar pouco menos da metade da quantidade amostral comparada ao presente estudo, os autores também demonstraram uma alta taxa de episódios de candidemia causados por *C.albicans*.

Neste estudo de Bustamante *et al.* foram testados os antifúngicos anfotericina B, fluconazol e voriconazol por meio da técnica *in vitro* de microdiluição em caldo. A porcentagem de suscetibilidade frente a anfotericina B e a fluconazol foi equivalente a 100% – semelhante ao que constatou-se no presente trabalho – e frente a voriconazol foi equivalente a 95% (3 isolados pertenciam ao intervalo R).

Os autores relataram os seguintes valores: CIM₅₀ = 0,125µg/mL para anfotericina B; CIM₅₀ = 0,25µg/mL para fluconazol e CIM₅₀ = 0,03µg/mL para voriconazol. Quando comparado ao presente estudo, o valor de CIM₅₀ para fluconazol é equivalente. Já para anfotericina B e voriconazol, apesar de apresentarem valores de

CIM₅₀ diferentes, os isolados ainda pertencem ao intervalo considerado suscetível para tais antifúngicos.

Costa e colaboradores (73) realizaram um estudo no Brasil com 108 isolados de *Candida* sp. provenientes de hemocultura e, deste total, 27 (25%) correspondiam à espécie *C.albicans*. Diferentemente do presente estudo, os autores demonstraram uma taxa mais baixa de episódios de candidemia causados por *C.albicans*.

Foram testados os antifúngicos anfotericina B, fluconazol, voriconazol e itraconazol por meio da técnica *in vitro* de microdiluição em caldo. A porcentagem de suscetibilidade frente a itraconazol foi equivalente a 100%, semelhante ao que foi constatado no presente trabalho. Já para anfotericina B, fluconazol e voriconazol a porcentagem de suscetibilidade foi equivalente a 96,3% (1 isolado pertencia ao intervalo R para cada um dos três antifúngicos).

Os autores relataram os seguintes intervalos de leitura: 0,125–2µg/mL para anfotericina B; 0,125–64µg/mL para fluconazol; 0,015–0,5µg/mL para voriconazol e 0,015–0,125µg/mL para itraconazol. Quando comparados, os intervalos de leitura obtidos no presente estudo foram menores: 0,125–1µg/mL para anfotericina B; ≤0,125–0,5µg/mL para fluconazol; ≤0,015–0,06µg/mL para voriconazol e ≤0,015–0,125µg/mL para itraconazol. Mesmo assim é possível constatar que há um predomínio suscetível na espécie.

Um estudo realizado no Taiwan (71) por Huang e colaboradores com um total de 474 isolados de hemocultura de *Candida* sp. relatou 236 (49,8%) deles como pertencentes à espécie *C.albicans*, demonstrando uma alta taxa de episódios de candidemia causados por este micro-organismo.

Os antifúngicos testados por meio da técnica *in vitro* de microdiluição em caldo foram micafungina, anfotericina B, 5-flucitosina, fluconazol, voriconazol e itraconazol, assim como os que foram utilizados no presente estudo. Os autores relataram dois isolados resistentes para fluconazol, um para voriconazol e um para micafungina. De forma semelhante ao presente estudo, todos os isolados analisados por Huang *et al.* também eram sensíveis frente a anfotericina B, 5-flucitosina e itraconazol.

Em um estudo multicêntrico realizado em 2006 por Colombo *et al.* (74), abrangendo 11 centros médicos localizados em nove cidades brasileiras e compreendendo 712 amostras de *Candida* sp. isoladas de episódios de candidemia entre março de 2003 e dezembro de 2004, constatou-se que a espécie *C.albicans* foi a de

maior prevalência dentre os casos de candidemia, correspondendo a 291 (40,9%) deles. Foram testados anfotericina B, 5-flucitosina, fluconazol, voriconazol e itraconazol em testes *in vitro* de microdiluição em caldo.

No estudo citado, é interessante observar que, mesmo com uma quantidade alta de amostras de *C.albicans* submetida aos testes de suscetibilidade, nenhuma delas foi resistente a anfotericina B e apenas uma foi resistente a cada um dos azóis (fluconazol, voriconazol e itraconazol).

Assim como alguns dos trabalhos mencionados, este estudo traz a prevalência da espécie *C.albicans* nos episódios de candidemia registrados de 2006 a 2010 no HC-UNICAMP. Ademais, pode-se observar que os valores obtidos para os intervalos de leitura dos antifúngicos testados confirmam o perfil suscetível desta espécie.

Além dos testes de suscetibilidade frente aos antifúngicos por microdiluição em caldo realizados no presente estudo, há também os resultados dos testes de disco-difusão com discos de fluconazol, que foram executados no laboratório de rotina diagnóstica do Setor de Micologia da Divisão de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da UNICAMP. No procedimento de rotina, o laboratório de Micologia processa os testes de disco-difusão com fluconazol dos micro-organismos isolados a partir da semeadura do material de hemocultura. Dessa forma, o estudo em questão traz esses dados provenientes da rotina (Anexos 2A, 2B e 2C) a fim de complementar os resultados da microdiluição.

Durante os anos de 2006, 2007 e até o mês de setembro de 2008, por conta da falta de insumos no laboratório de Micologia (dentre eles, os discos de fluconazol), os testes de disco-difusão não foram realizados na rotina. Porém, nos meses de setembro, outubro e novembro de 2008 e também nos anos de 2009 e 2010, com insumos para a realização desses testes, foi possível constatar que os pacientes que possuíam mais de uma amostra positiva para *C.albicans* no sangue demonstraram todas suscetíveis a fluconazol na disco-difusão.

Apesar da descontinuidade, a verificação da permanência de um perfil suscetível de *C.albicans* é importante para a vigilância do desenvolvimento de resistência a fluconazol na espécie, principalmente quando esse antifúngico é administrado como profilaxia aos pacientes imunocomprometidos.

5.4. Mutações no gene *ERG11*

Mutações na sequência do gene *ERG11* que acarretam substituições de aminoácidos na proteína resultante representam um dos principais mecanismos que contribuem para a resistência aos azóis em isolados clínicos de *Candida* sp. Na literatura, até o presente, mais de 140 diferentes mutações foram relatadas em isolados de *Candida albicans* e grande parte destas foram comprovadamente associadas à resistência a antifúngicos (63).

As substituições de aminoácidos encontradas no presente estudo (G448V e G464S para o isolado LIF-E10, proveniente de escovado esofágico, e E116D, T128K, E266D e A298V para o isolado LIF 12560, proveniente de *swab* de cavidade bucal) já foram descritas previamente, e conferem redução na suscetibilidade ao fluconazol.

De acordo com os dados disponíveis relacionados ao isolado LIF-E10 (Anexo 3), trata-se de paciente HIV-positivo, que abandonou tratamento com antirretrovirais e fez uso de fluconazol em diferentes períodos ao longo de quase 7 anos, previamente ao isolamento do micro-organismo resistente. De acordo com a literatura, relatos de isolamento de *Candida albicans* resistentes a partir de mucosas oral e esofágica em pacientes HIV-positivo é bastante comum (20, 21). Kakati *et al.* (2015) relatam inclusive esofagite por *C.albicans* resistente em indivíduo imunocompetente (20).

A substituição G464S foi destacada por Marichal (75), em 1999, como a segunda mais frequente em *Candida albicans* resistente a azóis. Xiang e colaboradores (64) sugerem que a mutação G464S é um marcador preditivo da resistência a estes antifúngicos, ocorrendo em uma região altamente conservada da enzima-alvo dos azóis (14- α -desmetilase) e acentuando, desta forma, a inibição de afinidade entre eles e a enzima. Além disso, essa alteração é relatada como responsável pelos altos valores de CIM de fluconazol (60, 76, 77), explicando a alta CIM do isolado LIF-E10 frente a fluconazol (64 μ g/mL).

Apesar de ser frequentemente relatada, a substituição G464S não é exclusiva de isolados resistentes a fluconazol. Morio e colaboradores (63), em 2010, descreveram três isolados de *C.albicans* suscetíveis a fluconazol nos quais tal alteração estava presente. Em outras pesquisas (38, 65, 78), essa alteração é descrita em combinação com outras associadas à resistência aos azóis – como a G448V, também presente no isolado LIF-E10 deste estudo.

Chau e colaboradores (78) encontraram, em um total de 38 isolados de *Candida*

albicans, 17 deles resistentes e com valores altos de CIM para fluconazol ($\geq 64\mu\text{g/mL}$) e, concomitantemente, com resistência cruzada a voriconazol. Este fato também pode ser observado no isolado LIF-E10 do presente estudo, em que uma das substituições é responsável pela elevação da CIM de fluconazol (G464S) e a outra é associada à resistência cruzada com voriconazol, que apresentou CIM equivalente a $1\mu\text{g/mL}$ (valor classificado como resistente, segundo o CLSI). Assim como G464S, a substituição G448V também é considerada um marcador preditivo de resistência aos azóis (63). Além disso, ambas são denominadas substituições não conservativas, ou seja, o novo aminoácido alterado possui natureza química bem diferente ao antigo, o que pode levar a uma grave alteração na estrutura da proteína (60).

A substituição E266D já foi encontrada em isolados de *Candida albicans* suscetíveis e resistentes a fluconazol (63, 78). Em 2010, Morio e colaboradores realizaram um estudo com 73 isolados de *C.albicans*, dos quais 15 eram resistentes e 58 eram suscetíveis a fluconazol. Dentre os isolados suscetíveis, um possuía apenas a alteração E266D e, dentre os isolados resistentes, um possuía a substituição E266D em combinação com a V448I. Dessa forma, os autores sugeriram que é necessária a associação de E266D a outra alteração para ocasionar resistência. Como é o caso do isolado em estudo LIF 12560, a alteração E266D ocorre associada a outras três (E116D, T128K e A298V).

Por sua vez, E266D, E116D e A298V são denominadas substituições conservativas, ou seja, o novo aminoácido alterado é de natureza química similar ao anterior, diminuindo a chance de uma alteração grave na estrutura da proteína. Já a T128K é classificada como não conservativa (60).

As quatro substituições (E266D, E116D, A298V e T128K) presentes no isolado LIF 12560 constam também no estudo de Manavathu e colaboradores (1999) e, apesar de associadas ao fenômeno de resistência aos azóis, também foram encontradas em isolados de *Candida albicans* suscetíveis a estes agentes. Nenhuma delas é responsável pelo alto valor de CIM de fluconazol e também não foram associadas à resistência cruzada a voriconazol.

Apesar de já terem sido descritas, não é possível afirmar que a resistência seja unicamente atribuída à ocorrência das mutações, pois existem outros mecanismos de resistência que não foram identificados nesses isolados – como a superexpressão dos genes *MDR1*, *CDR1* e *CDR2*, que podem atuar concomitantemente e contribuir para o

aumento dos valores da concentração inibitória mínima frente ao fluconazol (79, 80).

6. CONCLUSÃO

- Foi possível reativar 97% dos isolados clínicos de *Candida albicans* provenientes de hemoculturas, indicando que o método de armazenamento é eficiente para as leveduras desta espécie. Além disso, a identificação realizada confirmou os micro-organismos como pertencentes à espécie *C.albicans*.
- Nos testes de suscetibilidade *in vitro* frente aos antifúngicos, todos os isolados de hemocultura demonstraram ser suscetíveis a todos os antifúngicos testados, confirmando o perfil sensível de *C.albicans*.
- O isolado LIF-E10 demonstrou ser resistente a fluconazol e voriconazol e suscetível-dose dependente a itraconazol. Já o isolado LIF 12560 demonstrou ser resistente a fluconazol e suscetível-dose dependente a voriconazol. Ambos provenientes de pacientes com HIV ou SIDA, tendo primeiro histórico de tratamento prévio, situações respaldadas na literatura.
- O sequenciamento do gene *ERG11* de LIF-E10 e LIF 12560 evidenciou dez mutações nucleotídicas das quais seis causam substituição no aminoácido resultante. As alterações já foram descritas como possíveis responsáveis pela resistência de *C.albicans* a fluconazol.
- Não foi realizado o sequenciamento do gene *ERG11* dos isolados de hemocultura, pois em nenhum deles foi encontrada resistência *in vitro* a fluconazol.

7. ANEXOS

ANEXO 1: Identificação dos isolados de hemocultura nos sistemas Vitek[®] 2 (bioMérieux) e BD Phoenix[®]

LIF	ANO	Identificação Vitek [®] 2	Identificação BD Phoenix [®]
7585	2006	<i>C.albicans</i>	<i>C.dubliniensis</i>
7635	2006	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
7653	2006	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
7662	2006	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
7664	2006	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
7677	2006	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
7680	2006	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
7707	2006	<i>C.albicans</i>	<i>C.dubliniensis</i>
7709	2006	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
7794	2006	<i>C.albicans</i>	<i>C.dubliniensis</i>
7835	2006	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
7866	2006	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
7874	2006	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
7882	2006	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
8072	2006	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
8123	2006	<i>C.albicans</i>	<i>C.dubliniensis</i>
8144	2006	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
8210	2006	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
8228	2006	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
8244	2006	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
8381	2006	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
8399	2006	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
8407	2006	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
8432	2006	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
8438	2006	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
8462	2006	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
8548	2007	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
8550	2007	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
8671	2007	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
8704	2007	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
8733	2007	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
8737	2007	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
8777	2007	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
8780	2007	<i>C.albicans</i>	<i>C.dubliniensis</i>
8982	2007	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
8991	2007	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9028	2007	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9044	2007	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9050	2007	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9059	2007	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9197	2007	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9211	2007	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9213	2007	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9215	2007	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9309	2007	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9316	2007	<i>C.albicans</i>	não recuperada na etapa de reativação
9317	2007	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9334	2007	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9418	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9484	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9494	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9515	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9560	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9564	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.dubliniensis</i>

Continuação – ANEXO 1: Identificação dos isolados de hemocultura nos sistemas Vitek® 2 (bioMérieux) e BD Phoenix®

LIF	ANO	Identificação Vitek® 2	Identificação BD Phoenix®
9566	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9580	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9717	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9731	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9734	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9735	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9760	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9770	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9777	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9789	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9831	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9840	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9846	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9891	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9923	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9940	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9968	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9984	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9994	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
9996	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10007	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.dubliniensis</i>
10012	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10014	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10020	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10027	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10031	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10032	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10042	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10043	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10058	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10159	2008	<i>C.albicans</i>	<i>C.dubliniensis</i>
10440	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10449	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10450	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10459	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10480	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10497	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10504	2009	<i>C.albicans</i>	não recuperada na etapa de reativação
10531	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10534	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10563	2009	<i>C.albicans</i>	não recuperada na etapa de reativação
10588	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10593	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.dubliniensis</i>
10594	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10599	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.dubliniensis</i>
10604	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10619	2009	<i>C.albicans</i>	não recuperada na etapa de reativação
10681	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.dubliniensis</i>
10691	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10696	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10721	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10737	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10739	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10759	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.dubliniensis</i>
10771	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10776	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10798	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10803	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10807	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10851	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10875	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>

Continuação – ANEXO 1: Identificação dos isolados de hemocultura nos sistemas Vitek® 2 (bioMérieux) e BD Phoenix®

LIF	ANO	Identificação Vitek® 2	Identificação BD Phoenix®
10913	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10918	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10927	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10950	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10951	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.dubliniensis</i>
10985	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
10988	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
11018	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
11027	2009	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
11054	2010	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
11060	2010	<i>C.albicans</i>	<i>C.dubliniensis</i>
11067	2010	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
11072	2010	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
11080	2010	<i>C.albicans</i>	<i>C.dubliniensis</i>
11081	2010	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
11087	2010	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
11088	2010	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
11093	2010	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
11106	2010	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
11109	2010	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
11112	2010	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
11125	2010	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
11133	2010	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
11144	2010	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
11153	2010	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
11192	2010	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
11197	2010	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
11199	2010	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
11202	2010	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
11208	2010	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
11215	2010	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
11245	2010	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>

ANEXO 2A: Dados de testes de suscetibilidade a fluconazol por disco-difusão – vigilância de resistência ano 2008.

LIF	PACIENTE	DATA	DISCO DIFUSÃO
9777	ACSB	14/mai	
9717	AO	10/abr	
9718	AO	10/abr	
9984	ASC	29/set	
9985	ASC	29/set	
10020	AVEO	18/out	S
10043	CAO	24/out	S
9923	CDFA	29/ago	
9494	CMS	11/fev	
9496	CMS	14/fev	
9770	CVS	07/mai	
9778	CVS	09/mai	
9891	DLS	04/ago	
9892	DLS	04/ago	
9894	DLS	07/ago	
9895	DLS	07/ago	
10027	DRA	20/out	S
10028	DRA	20/out	S
10029	DRA	21/out	S
10031	EPS	21/out	S
9789	ESJ	19/mai	
9794	ESJ	29/mai	
10032	FFS	20/out	S
10033	FFS	20/out	S
10012	GC	13/out	S
10013	GC	13/out	S
9731	GDO	16/abr	
9735	HSJ	17/abr	
10159	IFP	30/nov	S
9580	JAJ	30/mar	
9707	JAJ	31/mar	
9418	JAM	01/jan	
9994	JEMA	05/out	
9515	JES	23/fev	
9566	LACS	19/mar	
9996	LL	07/out	
9997	LL	07/out	

LIF	PACIENTE	DATA	DISCO DIFUSÃO
9484	MALS	09/fev	
10014	MCBL	12/out	S
10022	MCBL	17/out	S
10023	MCBL	17/out	S
10024	MCBL	17/out	S
9734	MF	18/abr	
9564	MG	18/mar	
9968	MLS	21/set	
9973	MLS	23/set	
9982	MLS	29/set	
9986	MLS	29/set	
9972	MLS	23/set	
9560	MR	15/mar	
9760	NLSS	05/mai	
9761	NLSS	05/mai	
10042	NMA	24/out	S
9940	NPA	10/set	
9941	NPA	10/set	
9831	OSLR	24/jun	
9832	OSLR	24/jun	
9834	OSLR	25/jun	
9836	OSLR	25/jun	
9840	PMA	03/jul	
10058	rnTLMG	07/nov	S
10059	rnTLMG	07/nov	S
10064	rnTLMG	12/nov	S
10065	rnTLMG	12/nov	S
10073	rnTLMG	17/nov	S
10074	rnTLMG	17/nov	S
10007	SCB	17/out	S
9846	WAB	04/jul	
9847	WAB	04/jul	
9870	WAB	16/jul	
9871	WAB	16/jul	
9872	WAB	23/jul	
9874	WAB	23/jul	
9875	WAB	23/jul	

ANEXO 2B: Dados de testes de suscetibilidade a fluconazol por disco-difusão – vigilância de resistência ano 2009.

LIF	PACIENTE	DATA	DISCO DIFUSÃO
11018	AB	23/dez	S
11019	AB	23/dez	S
11020	AB	23/dez	S
11032	AB	26/dez	S
11033	AB	26/dez	S
10776	ACCD	14/ago	S
10777	ACCD	14/ago	S
10450	ACP	07/jan	S
10455	ACP	09/jan	S
10456	ACP	09/jan	S
10565	ACP	03/mar	S
10566	ACP	03/mar	S
10567	ACP	03/mar	S
10449	ADM	08/jan	S
10458	ADM	09/jan	S
10721	AMB	09/jul	S
10722	AMB	09/jul	S
10480	MAS	17/jan	S
11027	ARS	26/dez	S
10985	CAC	07/dez	S
10986	CAC	07/dez	S
10995	CAC	09/dez	S
10681	CB	08/jun	S
10682	CB	08/jun	S
10988	CDM	08/dez	S
10989	CDM	08/dez	S
10807	CR	12/set	S
10593	CZM	23/mar	S
10595	CZM	23/mar	S
10440	ECC	08/jan	S
10696	ECG	25/jun	S
10697	ECG	25/jun	S
10534	EMO	13/fev	S
10951	EOB	27/nov	S
10952	EOB	27/nov	S
10619	FCL	23/abr	S
10950	GHOM	26/nov	S
10913	IG	23/out	S
10496	IOB	29/jan	S
10497	IOB	29/jan	S

LIF	PACIENTE	DATA	DISCO DIFUSÃO
10759	JAF	05/ago	S
10760	JAF	05/ago	S
10918	JCFS	30/out	S
10493	JCL	27/jan	S
10504	JV	30/jan	S
10588	LEA	18/mar	S
10927	LIN	04/nov	S
10935	LIN	09/nov	S
10936	LIN	12/nov	S
10937	LIN	12/nov	S
10798	LMR	26/ago	S
10594	LSFR	26/mar	S
10599	MLLC	04/abr	S
10531	NATF	12/fev	S
10803	NMC	26/set	S
10804	NMC	26/set	S
10816	NMC	09/set	S
10826	NMC	16/set	S
10563	NSF	03/mar	S
10851	NSH	22/set	S
10858	NSH	28/set	S
10859	NSH	28/set	S
10867	NSH	02/out	S
10894	NSH	08/out	S
10895	NSH	08/out	S
10737	PRD	20/jul	S
10738	PRD	20/jul	S
10459	RFSM	09/jan	S
10461	RFSM	10/jan	S
10875	SGC	26/set	S
10739	THS	23/jul	S
10740	THS	23/jul	S
10741	THS	23/jul	S
10742	THS	23/jul	S
10747	THS	28/jul	S
10748	THS	28/jul	S
10691	TS	18/jun	S
10604	VAS	09/abr	S
10605	VAS	09/abr	S
10771	ZAL	10/ago	S

ANEXO 2C: Dados de testes de suscetibilidade a fluconazol por disco-difusão – vigilância de resistência ano 2010.

LIF	PACIENTE	DATA	DISCO DIFUSÃO
11198	AABF	29/set	S
11199	AABF	29/set	S
11125	ADSS	26/abr	S
11126	ADSS	27/abr	S
11144	AVD	24/mai	S
11145	AVD	24/mai	S
11208	BBS	26/out	S
11209	BBS	26/out	S
11072	CFP	18/fev	S
11080	EVC	06/mar	S
11245	FAA	10/dez	S
11197	IGS	24/set	S
11192	IGS	17/set	S
11193	IGS	18/set	S
11195	IGS	24/set	S
11196	IGS	24/set	S
11133	ITF	12/mai	S
11134	ITF	12/mai	S
11141	ITF	21/mai	S
11054	JCR	30/jan	S
11055	JCR	30/jan	S
11061	JCR	08/fev	S
11062	JCR	08/fev	S
11063	JCR	08/fev	S
11064	JCR	08/fev	S
11065	JCR	08/fev	S
11088	LMF	19/mar	S
11109	MAAS	09/abr	S
11081	MCBF	07/mar	S
11093	MS	22/mar	S
11153	OP	12/jun	S
11154	OP	12/jun	S
11106	OTS	07/abr	S
11067	RF	12/fev	S
11112	RVSS	09/abr	S
11120	RVSS	15/abr	S
11060	SMJKC	01/fev	S
11087	SOF	16/mar	S
11215	TGM	30/out	S
11216	TGM	30/out	S
11202	TJFP	07/out	S
11203	TJFP	07/out	S
11205	TJFP	11/out	S
11206	TJFP	11/out	S

ANEXO 3: Dados disponíveis dos pacientes dos quais foram isolados respectivamente as amostras LIF E-10 (A) e LIF 12560 (B).

A. LIF E-10 (Parecer CEP:13132011 / CAAE 1218.0.146.000-11) Este micro-organismo foi isolado após coleta de material clínico autorizado por este parecer e faz parte da tese de Doutorado de Cristiane Kibune Nagasako Vieira da Cruz).

Paciente feminina de 22 anos, HIV, sem uso de TARV (abandono de tratamento), com disfagia/odinofagia e monilíase oral CD4 148 CV 17.000. Fez uso prévio de antifúngico. O histórico da paciente chama a atenção, pois tinha um quadro de monilíase oral e disfagia recidivante e uso de vários antifúngicos. Paciente fazia uso de TARV (TDF,3TC, LPV,R), porém no momento do exame estava sem medicação (abandono de tratamento). Já tinha feito uso de antifúngico por diversas vezes:

21/11/05 Fluco 150/7dias (m. oral e disfagia)

31/01/08 Fluco 150/semana/6 meses (onicomicose)

10/03/09 Fluco 150/14 dias (m. oral e disfagia)

03/08/09 Fluco 200/14 dias (m. oral)

29/05/2012 - Isolamento de *C.albicans* a partir de escovado esofágico.

05/06/12 Fluco 200/d/3 semanas

26/07/12 Fluco 200 12/12hs/14 dias+nistatina oral (m. oral e disfagia)

09/08/12 Anfotericina B 0,8mg/kg/7 dias (m. oral e disfagia)

28/08/12 Itraconazol 200 mg/d/14dias (m. oral)

24/09/12 Itraconazol 200 mg/d (m. oral)

EDA dela o grau da monilíase era máximo (grau IV-infecção severa).

B. LIF 12560

Este micro-organismo foi isolado durante cultura de rotina diagnóstica, a partir de secreção de boca em paciente com diagnóstico de SIDA e monilíase oral.

8. REFERÊNCIAS

1. Hurley R. Acute dissaminated (septicaemic) moniliasis in adults and children. *Postgrad Med J*. 1964;40:644-53.
2. Hurley R, Winner HI. Pathogenicity in the genus *Candida*. *Mycopathol Mycol Appl*. 1964;24:337-46.
3. Sidrim JJC, Rocha MFG. *Micologia Médica À Luz de Autores Contemporâneos*. 1.ed. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan; 2004. 408 p.
4. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2004;12(7):317-24.
5. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-vaccari EM, M. NT. *Tratado de Micologia Médica Lacaz*. 9.ed. Brasil: Sarvier; 2002. 1120 p.
6. Barbedo LS, Sgarbi DBG. Candidíase. *Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*. 2010;22(1):22-38.
7. Molero G, Díez-Orejas R, Navarro-García F, Monteoliva L, Pla J, Gil C, *et al*. *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. *Int Microbiol*. 1998;1(2):95-106.
8. Costa CR, Hasimoto e Souza LK, Ataídes FS, Ferri PH, Costa MP, Fernanades OeF, *et al*. Molecular analysis and dimorphism of azole-susceptible and resistant *Candida albicans* isolates. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(6):740-4.
9. Carvalho VO. Identificação e análise de mutações no gene *ERG11* de isolados de *Candida* susceptíveis e resistentes ao fluconazol [Master's Program]. Brasil: Universidade de São Paulo; 2010.
10. Colombo AL, Guimarães T, Camargo LF, Richtmann R, Queiroz-Telles F, Salles MJ, *et al*. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *Braz J Infect Dis*. 2013;17(3):283-312.
11. Delaloye J, Calandra T. Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. *Virulence*. 2013;5(1):01-09.
12. Lepak A, Andes D. Fungal sepsis: optimizing antifungal therapy in the critical care setting. *Crit Care Clin*. 2011;27(1):123-47.
13. Lockhart SR, Daniels KJ, Zhao R, Wessels D, Soll DR. Cell biology of mating in

Candida albicans. Eukaryot Cell. 2003;2(1):49-61.

14. Alangaden GJ. Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection control, and prevention. Infect Dis Clin North Am. 2011;25(1):201-25.
15. Shareck J, Belhumeur P. Modulation of morphogenesis in *Candida albicans* by various small molecules. Eukaryot Cell. 2011;10(8):1004-12.
16. Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. Microbiol Mol Biol Rev. 2011;75(2):213-67.
17. Pfaller M, Neofytos D, Diekema D, Azie N, Meier-Kriesche HU, Quan SP, *et al*. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance[®]) registry, 2004-2008. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;74(4):323-31.
18. Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, *et al*. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. Clin Infect Dis. 2009;48(12):1695-703.
19. Ford CB, Funt JM, Abbey D, Issi L, Guiducci C, Martinez DA, *et al*. The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. Elife. 2015;4:e00662.
20. Kakati B, Kotwal A, Biswas D, Sahu S. Fluconazole Resistant *Candida* Oesophagitis in Immunocompetent Patients: Is Empirical Therapy Justifiable? J Clin Diagn Res. 2015;9(12):DC16-DC18.
21. Salari S, Khosravi AR, Mousavi SA, Nikbakht-Brojeni GH. Mechanisms of resistance to fluconazole in *Candida albicans* clinical isolates from Iranian HIV-infected patients with oropharyngeal candidiasis. J Mycol Med. 2015;26(1):35-41.
22. Quinto-Aleman D, Canerina-Amaro A, Hernández-Abad LG, Machín F, Romesberg FE, Gil-Lamaignere C. Yeasts acquire resistance secondary to antifungal drug treatment by adaptive mutagenesis. PLoS One. 2012;7(7):e42279.
23. Colombo AL, Guimarães T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36(5):599-607.
24. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK, Calandra TF, Edwards JE, *et al*. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2009;48(5):503-35.
25. Badiie P, Hashemizadeh Z. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management. Indian J Med Res. 2014;139(2):195-204.

26. Yapar N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag.* 2014;10:95-105.
27. Moretti ML, Trabasso P, Lyra L, Fagnani R, Resende MR, de Oliveira Cardoso LG, *et al.* 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.* 2013;51(3):225-30.
28. Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW. *Manual Of Clinical Microbiology.* 10, editor. Washington, DC: American Society For Microbiology; 2011.
29. Vandeputte P, Ferrari S, Coste AT. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *Int J Microbiol.* 2012;2012:713687.
30. Mansfield BE, Oltean HN, Oliver BG, Hoot SJ, Leyde SE, Hedstrom L, *et al.* Azole drugs are imported by facilitated diffusion in *Candida albicans* and other pathogenic fungi. *PLoS Pathog.* 2010;6(9):e1001126.
31. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ. In vitro susceptibilities of *Candida* spp. to caspofungin: four years of global surveillance. *J Clin Microbiol.* 2006;44(3):760-3.
32. Kurtz MB, Abruzzo G, Flattery A, Bartizal K, Marrinan JA, Li W, *et al.* Characterization of echinocandin-resistant mutants of *Candida albicans*: genetic, biochemical, and virulence studies. *Infect Immun.* 1996;64(8):3244-51.
33. Feng LJ, Wan Z, Wang XH, Li RY, Liu W. Relationship between antifungal resistance of fluconazole resistant *Candida albicans* and mutations in *ERG11* gene. *Chin Med J (Engl).* 2010;123(5):544-8.
34. Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med.* 2012;125(1 Suppl):S3-13.
35. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Third Edition, M27-A3. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008. p. 40.
36. Sasse C, Dunkel N, Schäfer T, Schneider S, Dierolf F, Ohlsen K, *et al.* The stepwise acquisition of fluconazole resistance mutations causes a gradual loss of fitness in *Candida albicans*. *Mol Microbiol.* 2012;86(3):539-56.
37. Mishra NN, Prasad T, Sharma N, Payasi A, Prasad R, Gupta DK, *et al.* Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. A

review. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2007;54(3):201-35.

38. Xu Y, Chen L, Li C. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* species to fluconazole and detection of *Candida albicans* *ERG11* mutations. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61(4):798-804.
39. Kanafani ZA, Perfect JR. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis*. 2008;46(1):120-8.
40. Mímica LMJ, Ueda SMY, Martino MDV, Navarini A, Martini IJ. Diagnóstico de infecção por *Candida*: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2009;45(1):17-23.
41. Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, *et al*. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PLoS One*. 2013;8(3):e59373.
42. Koneman EW, Allen SD, Winn WC, Janda WM, Procop GW, Schreckenberger PC, *et al*. *Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido*. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan; 2010. 1565 p.
43. Crocker J, Burnett D. *The Science of Laboratory Diagnosis*. 2 ed. Nova Jersey, EUA: Wiley; 2005. 564 p.
44. Posteraro B, Ruggeri A, De Carolis E, Torelli R, Vella A, De Maio F, *et al*. Comparative evaluation of BD Phoenix and Vitek 2 systems for species identification of common and uncommon pathogenic yeasts. *J Clin Microbiol*. 2013;51(11):3841-5.
45. Moreira-Oliveira MS, Mikami Y, Miyaji M, Imai T, Schreiber AZ, Moretti ML. Diagnosis of candidemia by polymerase chain reaction and blood culture: prospective study in a high-risk population and identification of variables associated with development of candidemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005;24(11):721-6.
46. Wengenack NL, Binnicker MJ. Fungal molecular diagnostics. *Clin Chest Med*. 2009;30(2):391-408, viii.
47. Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J Clin Microbiol*. 1997;35(5):1216-23.
48. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Second Edition, M27-A2. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2002. p. 51.

49. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement - M27-S4. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012. p. 32.
50. Pfaller MA, Rex JH, Rinaldi MG. Antifungal susceptibility testing: technical advances and potential clinical applications. *Clin Infect Dis.* 1997;24(5):776-84.
51. Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Bartlett MS, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, *et al.* Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of *in vitro-in vivo* correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Clin Infect Dis.* 1997;24(2):235-47.
52. Sanglard D. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2002;20(9):462-9; quiz 70, 79.
53. MacCallum DM, Coste A, Ischer F, Jacobsen MD, Odds FC, Sanglard D. Genetic dissection of azole resistance mechanisms in *Candida albicans* and their validation in a mouse model of disseminated infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(4):1476-83.
54. Rodrigues EG, Lirio VS, Lacaz CaS. Preservation of fungi and actinomycetes of medical importance in distilled water. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1992;34(2):159-65.
55. Kulski JK, Pryce T. Preparation of mycobacterial DNA from blood culture fluids by simple alkali wash and heat lysis method for PCR detection. *J Clin Microbiol.* 1996;34(8):1985-91.
56. Millar BC, Jiru X, Moore JE, Earle JA. A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. *J Microbiol Methods.* 2000;42(2):139-47.
57. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, *et al.* Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics.* 2012;28(12):1647-9.
58. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007;23(21):2947-8.
59. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013;30(12):2725-9.

60. Manavathu EK, Kallakuri S, Arganoza MT, Vázquez JA. Amino acid variations of cytochrome P-450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from fluconazole resistant clinical isolates of *Candida albicans*. Rev Iberoam Micol. 1999;16(4):198-203.
61. Mane A, Vidhate P, Kusro C, Waman V, Saxena V, Kulkarni-Kale U, *et al*. Molecular mechanisms associated with Fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* isolates from India. Mycoses. 2016;59(2):93-100.
62. Manastır L, Ergon MC, Yücesoy M. Investigation of mutations in *ERG11* gene of fluconazole resistant *Candida albicans* isolates from Turkish hospitals. Mycoses. 2011;54(2):99-104.
63. Morio F, Loge C, Besse B, Hennequin C, Le Pape P. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* *ERG11* protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010;66(4):373-84.
64. Xiang MJ, Liu JY, Ni PH, Wang S, Shi C, Wei B, *et al*. *ERG11* mutations associated with azole resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. FEMS Yeast Res. 2013;13(4):386-93.
65. Kelly SL, Lamb DC, Loeffler J, Einsele H, Kelly DE. The G464S amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase causes fluconazole resistance in the clinic through reduced affinity. Biochem Biophys Res Commun. 1999;262(1):174-9.
66. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev. 2007;20(1):133-63.
67. Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Tanabe K, Niimi M, *et al*. *Candida albicans* drug resistance - another way to cope with stress. Microbiology. 2007;153(Pt 10):3211-3217.
68. Klepser ME. *Candida* resistance and its clinical relevance. Pharmacotherapy. 2006;26(6 Pt 2):68S-75S.
69. Odds FC. Long-term laboratory preservation of pathogenic yeasts in water. J Med Vet Mycol. 1991;29(6):413-5.
70. Won EJ, Shin JH, Kim MN, Choi MJ, Joo MY, Kee SJ, *et al*. Evaluation of the BD Phoenix system for identification of a wide spectrum of clinically important yeast species: a comparison with Vitek 2-YST. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014;79(4):477-80.

71. Huang YT, Liu CY, Liao CH, Chung KP, Sheng WH, Hsueh PR. Antifungal susceptibilities of *Candida* isolates causing bloodstream infections at a medical center in taiwan, 2009-2010. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(7):3814-9.
72. Bustamante B, Martins MA, Bonfietti LX, Szeszs MW, Jacobs J, Garcia C, *et al*. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* isolates from bloodstream infections in Lima, Peru. *J Med Microbiol*. 2014;63(Pt 6):855-60.
73. da Costa VG, Quesada RM, Abe AT, Furlaneto-Maia L, Furlaneto MC. Nosocomial bloodstream *Candida* infections in a tertiary-care hospital in South Brazil: a 4-year survey. *Mycopathologia*. 2014;178(3-4):243-50.
74. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, *et al*. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol*. 2006;44(8):2816-23.
75. Marichal P, Koymans L, Willemsens S, Bellens D, Verhasselt P, Luyten W, *et al*. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14alpha-demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology*. 1999;145 (Pt 10):2701-13.
76. Casalnuovo IA, Di Francesco P, Garaci E. Fluconazole resistance in *Candida albicans*: a review of mechanisms. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2004;8(2):69-77.
77. Franz R, Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE, Ruhnke M, Morschhäuser J. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(12):3065-72.
78. Chau AS, Mendrick CA, Sabatelli FJ, Loebenberg D, McNicholas PM. Application of real-time quantitative PCR to molecular analysis of *Candida albicans* strains exhibiting reduced susceptibility to azoles. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(6):2124-31.
79. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(2):382-402.
80. Espinel-Ingroff A, Montero D, Martin-Mazuelos E. Long-term preservation of fungal isolates in commercially prepared cryogenic microbank vials. *J Clin Microbiol*. 2004;42(3):1257-9.