

Diagnóstico de infecção por *Candida*: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade

Primeira submissão em 08/05/08
Última submissão em 20/02/09
Aceito para publicação em 20/02/09
Publicado em 20/02/09

Candida infection diagnosis: evaluation of *Candida* species identification and characterization of susceptibility profile

Lycia Mara Jenne Mímica¹; Suely Mitoi Ykko Ueda²; Marines Dalla Valle Martino³; Alessandra Navarini⁴; Izabel Julien Martini⁵

unitermos	resumo
Diagnóstico de <i>Candida</i> spp.	<p>Introdução: Infecções invasivas provocadas por <i>Candida</i> são importantes causas de morbidade e mortalidade. O sucesso do tratamento dessas infecções depende da identificação da espécie e do padrão de sensibilidade aos antifúngicos. Portanto, diagnóstico rápido e específico é fundamental para a precoce introdução de terapêutica adequada. Objetivos: Avaliar diferentes métodos diagnósticos de determinação de espécies de <i>Candida</i> e caracterizar, entre as espécies identificadas, o padrão de sensibilidade aos diferentes antifúngicos. Material e métodos: A identificação das espécies de <i>Candida</i> presentes em amostras de diferentes materiais biológicos foi realizada pelo cultivo em CHROMagar® <i>Candida</i> e pela técnica de reação em cadeia da polimerase tipo Nested (N-PCR). O padrão de sensibilidade das amostras foi avaliado pela utilização de Etest®. Resultado: CHROMagar® caracterizou 50% das amostras como <i>Candida albicans</i>; 20,8%, <i>Candida tropicalis</i>; 2,4%, <i>Candida krusei</i> e 26,9%, outras espécies (não determinadas). As cepas de <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i> foram caracterizadas por CHROMagar® e N-PCR. Porém cepas de outras espécies, indeterminadas em CHROMagar®, caracterizaram-se como <i>C. parapsilosis</i> em N-PCR. Cepas de <i>C. krusei</i> e <i>C. tropicalis</i> apresentaram perfil de resistência a, respectivamente, fluconazol e 5-fluocitosina. Quanto ao itraconazol, observou-se padrão de resistência em cepas de <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i>. Discussão: As técnicas metodológicas utilizadas são de fácil reprodutibilidade e alta especificidade, fornecendo diagnóstico complementar, e o emprego do Etest® viabiliza a precoce introdução de tratamento específico. Conclusão: O crescente aparecimento de espécies de <i>Candida</i> resistentes aos azólicos confirma a importância de monitorar possíveis mudanças na distribuição das espécies patogênicas e dos padrões de sensibilidade.</p>
Suscetibilidade a antifúngicos	
Resistência a múltiplas drogas	

abstract

key words

Background: Invasive infections by *Candida* are an important cause of morbidity and mortality. The successful treatment of these infections depends on the identification of the species and on the sensitivity pattern to antifungal agents. A quick and specific diagnosis is essential to introduce appropriate therapy. **Objectives:** Assess different diagnostic methods to determine *Candida* species and evaluate the sensitivity pattern to different antifungal agents among the identified ones. **Material and Methods:** The identification of *Candida* species present in samples of different biological materials was conducted through CHROMagar® *Candida* culture and Nested-PCR. The sensitivity pattern was assessed using Etest®. **Results:** The culture of samples on CHROMagar® revealed 50% *Candida albicans*, 20.8% *Candida tropicalis*, 2.4% *Candida krusei*, and 26.9% other undetermined species. Samples of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* were identified through CHROMagar® and N-PCR. Species that were not determined through CHROMagar® were characterized as *Candida parapsilosis* by N-PCR. Resistance to fluconazole, 5-fluocytosine was detected, respectively, in *Candida krusei* and *Candida tropicalis* samples. Both *Candida albicans* and *Candida tropicalis* samples showed resistance to itraconazole. **Discussion:** The methods applied are easily reproducible and highly specific, which allows complementary diagnosis. The determination of the susceptibility profile by Etest® enables the early introduction of specific treatment. **Conclusion:** The growing appearance of *Candida* species resistant to azole confirms the importance of monitoring possible changes in the distribution of pathogenic species and in the sensitivity pattern.

Diagnosis of Candida spp.

Antifungal susceptibility

Multidrug resistance

1. Doutora em Medicina pela Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSCSP); médica diretora do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar (SCIH) da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo; professora adjunta e coordenadora da disciplina de Microbiologia do Departamento de Ciências Patológicas da FCMSCSP; orientadora e coordenadora de cursos de pós-graduação em Ciências da Saúde da Santa Casa de São Paulo.

2. Doutora em Farmacologia pela Universidade de São Paulo (USP); professor assistente da FCMSCSP; médica assistente do SCIH da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

3. Doutora em Medicina pela FCMSCSP; título de especialista conferido pela Sociedade Brasileira de Patologia Clínica (SBPC); professora adjunta da disciplina de Microbiologia do Departamento de Ciências Patológicas da FCMSCSP.

4. Mestra em Ciências da Saúde pela FCMSCSP; Bióloga da FCMSCSP.

5. Mestra em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP); pesquisadora da FCMSCSP.

Introdução

Infecções fúngicas invasivas são importantes causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, particularmente em pacientes com imunodeficiências congênitas ou adquiridas^(6, 21). Entre as espécies de fungos relacionadas com manifestações clínicas, o gênero *Candida* apresenta-se como principal responsável por infecções associadas a fungemias hospitalares, principalmente em setores críticos, como as unidades de terapia intensiva (UTIs)⁽¹²⁾.

Infecções invasivas causadas por essas leveduras associam-se a internação prolongada (três a 30 dias), alta taxa de mortalidade (10% a 49%) e elevado custo hospitalar^(11, 13). Em casos de infecção grave e sistêmica, a melhora ou até a sobrevivência do paciente depende da rápida identificação do patógeno e, conseqüentemente, da introdução precoce da terapia antifúngica.

Porém, o diagnóstico das espécies de *Candida* spp. pode ser problemático por ausência de sintomas clínicos específicos e demora em obter resultado pelos métodos diagnósticos tradicionais. Além disso, a positividade em hemoculturas pode ser baixa: até 50% dos pacientes com infecção invasiva apresentam exame microbiológico negativo e, em infecções bacterianas concomitantes, há menor probabilidade de isolamento da levedura. Esse quadro facilita a disseminação do fungo por múltiplos órgãos, resultando em piora clínica do paciente, ampliação dos efeitos adversos, administração medicamentosa prolongada e, conseqüentemente, aumento dos custos hospitalares^(12, 13).

Em infecções fúngicas provocadas por *Candida*, a identificação de sua espécie é essencial, uma vez que a patogenidade e o perfil de sensibilidade a um determinado antifúngico são variáveis entre as diferentes espécies. Apesar de a *Candida albicans* ser a espécie mais comumente isolada nas infecções superficiais ou invasivas, a incidência de infecções provocadas por *Candida* não-*albicans* é crescente e, em alguns casos, associada a altas taxas de mortalidade^(5, 7, 10). Estudos recentes apontam as espécies de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei* como as espécies não-*albicans* mais frequentes em processos infecciosos^(6, 7, 10).

A identificação das espécies de *Candida* também é necessária na investigação de surtos e pseudosurtos de infecção e na caracterização epidemiológica das espécies patogênicas. As infecções podem ser endógenas ou exógenas, transmitidas por outros pacientes ou pelos profissionais da saúde⁽⁵⁾. A identificação dessas características é fundamental para localizar a fonte das infecções e monitorar o

tratamento clínico, reduzindo o tempo de internação e os custos hospitalares.

Diante da variedade e das manifestações clínicas que as infecções por *Candida* spp. podem apresentar, a utilização de diferentes métodos diagnósticos e esquemas terapêuticos torna-se fundamental. Entre as ferramentas diagnósticas utilizadas, os testes cromogênicos, como CHROMagar® *Candida*, os testes quantitativos de avaliação do perfil de sensibilidade, como Etest®, e a reação em cadeia da polimerase (PCR) são metodologias clinicamente úteis, pois fornecem resultados rápidos, são de fácil realização e altamente específicos, além de auxiliarem na indicação de terapia antifúngica e na monitoração dos padrões de resistência existentes^(1, 18, 23).

Neste trabalho foram estudados 100 isolados de leveduras do gênero *Candida* obtidos de diferentes materiais biológicos. Visando a rápida e precisa identificação das espécies de leveduras, o meio cromogênico CHROMagar® *Candida* e a técnica da PCR foram utilizados como testes diagnósticos. A análise do perfil de suscetibilidade das espécies de *Candida* identificadas foi feita com a utilização do Etest®. O conjunto de resultados desses testes diagnósticos possibilitou a introdução rápida e adequada de terapêutica clínica.

Objetivos

Considerando-se a importância clínica, epidemiológica e laboratorial das infecções provocadas pelas diferentes espécies de *Candida* spp., os objetivos deste trabalho foram avaliar a especificidade e a sensibilidade de duas metodologias laboratoriais para a identificação de espécies de *Candida* spp. e a detecção dos padrões de suscetibilidade das espécies identificadas a diferentes antifúngicos.

Material e método

Identificação das cepas por CHROMagar® *Candida* (CHROMagar® Company, Paris, França)

Diferentes materiais biológicos com suspeita de infecção por *Candida* foram encaminhados para confirmação de diagnóstico por análise da morfologia das colônias em ágar sangue e caracterização na coloração de Gram. Todos os 100 isolados positivos para *Candida* spp. foram cultivados em CHROMagar® *Candida* e incubados em estufa a 37°C por 48 horas.

Identificação das cepas pela PCR

Seleção das amostras

Diante da gravidade do quadro clínico que as candidemias podem apresentar, apenas as 42 amostras oriundas de infecções sanguíneas e positivas em CHROMagar® *Candida* foram submetidas à extração de DNA da levedura.

Extração do DNA genômico das cepas de *Candida*

O DNA genômico das cepas de *Candida* foi realizado de acordo com as recomendações de Sandhu *et al.*⁽²²⁾. Cada isolado foi diluído em 200 µl de água deionizada estéril tratada com 1% de dietilpirucarbonato (H₂O DEPC). A esse volume adicionaram-se 500 µl de tiocianato de guanidina 6M (GTP) dissolvidos em 50 mM de fenol tamponado em Tris-HCl (pH = 8), mantendo as amostras em banho-maria (105°C) por 20 minutos. Seguiu-se com adição de 250 µl de clorofórmio-álcool-isoamil (24:1) seguida pela centrifugação, por 15 minutos, a 14.000 rpm. Adicionaram-se 500 µl de isopropanol a 100% à fase aquosa, submetendo a mistura à temperatura de -20°C por 24 horas. Ao final desse período ocorreram nova centrifugação a 14.000 rpm, por 20 minutos, descarte do sobrenadante e adição de 500 µl de etanol a 70%. Seguiu-se com nova centrifugação a 14.000 rpm, por 10 minutos, e ressuspensão do DNA extraído em 25 µl de H₂O DEPC.

Reação de semi-N-PCR

Foram seguidas as recomendações de Ahmad *et al.*⁽¹⁾. Na primeira etapa da reação (PCR), ocorreu a amplificação das porções 5.8S e 28S (incluindo a porção ITS2) do DNA ribossômico, conservada entre as diferentes espécies de fungos. Seguiu-se, então, com a segunda reação (N-PCR), que utilizou um par de iniciadores internos à região ITS2, objeti-

vando amplificar regiões genômicas variáveis, características das espécies de *Candida*, de acordo com a **Figura**.

Para as duas reações foi preparada mistura de reagentes em H₂O DEPC contendo: tampão PCR-1x (Fermentas), 2 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂) (Fermentas), 200 µM desorribonucleotídeo trifosfatado (dNTP) (Fermentas), 1 U de Taq DNA polimerase (Fermentas), 1 µl de albumina sérica bovina (Molecular Biology – Grade-Fermentas). Na PCR utilizou-se 0,2 µM dos pares de iniciadores (*primers* consenso) CTSF e CTSR, além de 1 µl do produto da extração de DNA da levedura. Na reação de N-PCR foram incluídos 5 pmols do *primer* CTSR com 5 pmols de um dos quatro *primers* espécie-específicos: *C. albicans* (CATED), *C. parapsilosis* (CPDET), *C. tropicalis* (CTDET') e *C. glabrata* (CGDET). As reações de amplificação ocorreram a 95°C por 1 minuto, seguidas por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. Por fim, a extensão do amplificado ocorreu a 72°C por 8 minutos e incubação das amostras a 4°C (Perkin Elmer Gene Amp. PCR System). Todos os produtos de amplificação foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5%.

Teste de suscetibilidade aos antifúngicos – Etest® (AB BIODISK, Suécia)

De cada cepa de *Candida*, de espécie identificada por CHROMagar®, foi feita uma suspensão de 0,5 na escala nefelométrica de McFarland. A partir dessa suspensão realizou-se a semeadura da superfície do meio ágar MOPS + RPMI com colocação das fitas de Etest® para os seguintes antifúngicos: anfotericina B e fluconazol, itraconazol e 5-fluocitosina. As leituras das placas foram realizadas após 48 horas de incubação em estufa a 37°C. Os padrões utilizados na leitura foram valor da concentração inibitória mínima (CIM) e local de inserção do halo de inibição (elipse). O critério utilizado para interpretação dos resultados foi a recomendação des-

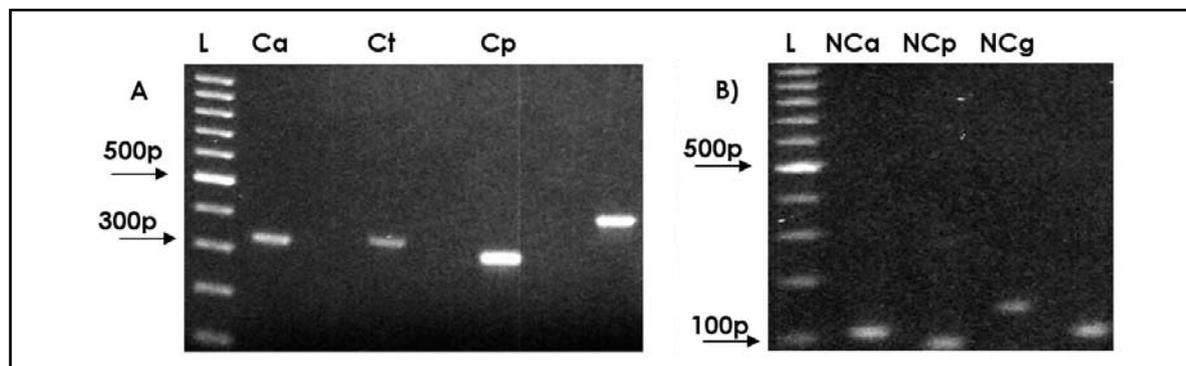


Figura – Gel de agarose a 1,5% para amostras de *Candida* submetidas à determinação de espécie pela reação de N-PCR. A) Reação de PCR. L: padrão de peso molecular de 100pb; Ca: amostra de *C. albicans*; Ct: amostra de *C. tropicalis*; Cp: amostra de *C. parapsilosis*; Cg: amostra de *C. glabrata*. B) Reação de N-PCR. L: padrão de peso molecular de 100 pb; NCa: amostra de *C. albicans*; NCp: amostra de *C. parapsilosis*; NCg: amostra de *C. glabrata* e NCT: amostra de *C. tropicalis*

Tabela 1 Critério para classificação de suscetibilidade a antifúngico, de acordo com o CLSI

Antibiótico	S	S-DD	I	R
Anfotericina	≤ 0,5 mm	–	–	–
5-Fluocitosina	≤ 4 mm	–	8-16 mm	≥ 32 mm
Fluconazol	≤ 8 mm	16-32 mm	–	≥ 64 mm
Itraconazol	≤ 0,125 mm	0,25-0,5 mm	–	≥ 1 mm

S = sensível; S-DD = sensível dose-dependente; I = intermediário; R = resistente.

crita pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)⁽⁴⁾, de acordo com a **Tabela 1**.

Resultados

Foram avaliadas 100 cepas de *Candida* spp. isoladas entre outubro de 2006 e novembro de 2007 no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas e do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar da Santa Casa de São Paulo (FCM/SCIH/SCSP). Essas amostras foram isoladas de diferentes materiais biológicos, como sangue (51,2%; 42 amostras), urina (34,1%; 28 amostras), secreções diversas (6,1%; cinco amostras), *swab* anal (4,9%; quatro amostras), *swab* oral (2,4%, duas amostras), escarro e fezes (1,2%; uma amostra).

Entre as 100 amostras de *Candida* isoladas, 82 apresentaram crescimento satisfatório no meio cromogênico, enquanto 18 não exibiram bom crescimento e caracterização. Considerando o padrão de crescimento dos 82 isolados em CHROMagar® *Candida*, as amostras foram identificadas como 50% da espécie *C. albicans* (41 amostras), 20,8% de *C. tropicalis* (17 amostras), 2,4% de *C. krusei* (duas amostras) e 26,9% de outras espécies (22 amostras), não diferenciadas pelo meio cromogênico.

Entre as 82 amostras identificadas pelo CHROMagar® *Candida*, todas aquelas provenientes de infecções sanguíneas (42 amostras; 51,2%) foram selecionadas e submetidas à reação de

semi-N-PCR para identificação do gênero e da espécie de levedura. Entre essas, 15 amostras de *C. albicans* e de *C. tropicalis* selecionadas em CHROMagar® foram identificadas como pertencentes às mesmas espécies em N-PCR (35,8% de cada espécie).

Dez amostras classificadas como pertencentes a outras espécies pelo teste do CHROMagar® também foram ensaiadas por N-PCR e todas foram identificadas como *C. parapsilosis* (23,9%). As duas amostras reconhecidas como *C. krusei* por CHROMagar® (4,8%) não foram identificadas em N-PCR, uma vez que o protocolo utilizado não possui par de iniciadores específicos para essa espécie de levedura.

Amostras isoladas em CHROMagar® *Candida* e ensaiadas pela reação de N-PCR foram submetidas ao teste de suscetibilidade (Etest®) para os principais antifúngicos utilizados em tratamento clínico: anfotericina B, fluconazol, 5-fluocitosina (42 amostras) e itraconazol (33 amostras). Todas as amostras testadas com anfotericina B apresentaram sensibilidade à ação desse antifúngico e 95,2% se mostraram sensíveis à ação do fluconazol (40 amostras). Em duas amostras, uma de *C. krusei* e uma de *C. parapsilosis*, foi possível detectar resistência (4,8%) para esse antifúngico. Em 90,4% delas foi detectada sensibilidade à ação da 5-fluocitosina (38 amostras), e em 8,6%, perfil de resistência (quatro amostras), sendo todas de *C. tropicalis*. Trinta e três amostras foram testadas com itraconazol e 84,8% apresentaram sensibilidade à ação desse antifúngico. Contudo 15,2% das amostras testadas (cinco) apresentaram perfil de resistência, sendo duas de *C. albicans* e *C. krusei* e uma de *C. tropicalis* (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Distribuição do perfil de sensibilidade aos diferentes antifúngicos de amostras de *Candida* spp. isoladas na ISCMSP no período de outubro de 2006 e novembro de 2007

Espécie	Anfotericina			Fluconazol			5-Fluocitosina			Itraconazol		
	n	S	%	n	S	%	n	S	%	n	S	%
<i>C. albicans</i>	15	15	100	15	15	100	15	15	100	12	10	83,3
<i>C. tropicalis</i>	15	15	100	15	15	100	15	11	73,3	12	11	91,7
<i>C. parapsilosis</i>	10	10	100	10	10	100	10	10	100	7	7	100
<i>C. krusei</i>	2	2	100	2	0	0	2	2	100	2	1	50
Total	42	42	100	42	40	95,2	42	38	90,4	33	29	87,9

ISCMSP: Irmandade da Santa Casa da Misericórdia de São Paulo; n = número de amostras testadas; S = número de amostras sensíveis.

Discussão

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, a *C. albicans* é a mais associada a infecções, principalmente em casos de candidemia e candidíase monocutânea^(6, 20). Apesar disso, recentes estudos apontam a incidência crescente de infecções provocadas por espécies de *C. não-albicans*, como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*, consideradas, atualmente, espécies emergentes de infecções invasivas^(6, 7, 10).

Em determinadas manifestações clínicas, as espécies não-*albicans* podem ser frequentemente encontradas. Fungemias causadas por *C. parapsilosis* são comuns em pacientes com cateter vascular e nutrição parenteral, e *C. tropicalis* em pacientes com câncer e neutropenia. Já as infecções provocadas por *C. glabrata* e *C. krusei* associam-se a usuários de antifúngicos azólicos⁽⁶⁾.

Estudos em países da Europa e da América do Norte relatam a baixa identificação de *C. tropicalis* (2% a 10% na Europa e 10% a 12% nos EUA e Canadá), sendo a *C. glabrata* a principal espécie não-*albicans* envolvida em infecções^(2, 16, 23). Na América Latina, principalmente no Brasil, estudos demonstram que *C. albicans* também aparece como a espécie mais frequente em candidemia. Contudo, destaca-se a crescente identificação de infecções sanguíneas provocadas por outras espécies, sendo a *C. tropicalis* e a *C. parapsilosis* as mais comuns (70% das infecções provocadas por espécies não-*albicans*). Além disso, em desacordo com estudos realizados em outras partes do mundo, infecções por *C. glabrata* são raras em nosso país^(6, 7, 10).

Em nosso estudo, a identificação das espécies por CHROMagar® revelou *C. albicans* como a espécie mais comum, presente em 50% das amostras. Contudo, em metade dos isolados foram identificadas outras espécies de *Candida*, principalmente *C. tropicalis* (20,8%). Amostras de *C. krusei* foram detectadas em apenas 1,4% dos isolados e não ocorreram casos de candidemia por *C. glabrata*.

As leveduras do gênero *Candida* são patógenos oportunistas capazes de provocar grande variedade de doenças. Porém, as infecções sanguíneas são mais frequentes e de maior importância clínica, principalmente pela alta taxa de mortalidade associada (30%). Candidemias são a quarta causa de morte em

casos de infecções do sangue e associam-se a longo período de hospitalização e elevado custo de tratamento. Contudo, o diagnóstico de candidíase invasiva ainda é problemático, uma vez que os sintomas clínicos não são específicos e que os métodos de cultivo tradicional podem demorar de três a 15 dias para fornecer o diagnóstico^(11, 13).

Além disso, a suscetibilidade a antifúngicos pode variar entre as diferentes espécies de *Candida*. Portanto, a sobrevivência de pacientes com candidemia e em estado crítico associa-se diretamente à precoce identificação da espécie envolvida no processo infeccioso. Assim, a utilização de metodologia rápida que resulte na precisa identificação da espécie e do seu perfil de sensibilidade é fundamental para o tratamento clínico^(14, 24). Entre essas metodologias estão os meios cromogênicos, a reação de semi-N-PCR e o Etest®, ensaios com altas sensibilidade e especificidade, resultando em diagnóstico rápido e direto^(1, 19, 24).

Em nosso estudo foi dada prioridade à análise de materiais oriundos de infecções do sangue (51,2% das amostras), em que os testes para identificação das espécies (CHROMagar® e PCR) e de sensibilidade (Etest®) são de grande utilidade clínica. Reforça-se o fato de que um dos objetivos desse trabalho foi a comparação entre métodos laboratoriais disponíveis para a identificação das espécies de *Candida*. A utilização do CHROMagar® forneceu resultados rápidos e diretos, com grande praticidade de leitura e alta relação com os resultados obtidos em N-PCR. Todas as amostras caracterizadas no meio cromogênico, como *C. albicans* e *C. tropicalis*, também obtiveram o mesmo diagnóstico em N-PCR.

Contudo, a técnica de N-PCR foi capaz de identificar *C. parapsilosis* em isolados não classificados pelo CHROMagar®, caracterizando-a como a terceira espécie mais frequente (23,8%). Esses dados estão de acordo com diferentes estudos realizados no Brasil e no mundo, que apontam a *C. parapsilosis* entre as espécies não-*albicans* mais comuns em processos infecciosos invasivos^(6, 7, 10). Assim, a utilização das duas metodologias forneceu resultados complementares e altamente específicos, garantindo a rápida e precisa identificação da espécie causadora da infecção e, conseqüentemente, a precoce introdução do tratamento.

C. albicans, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* apresentam boa suscetibilidade aos antifúngicos polienos, fluocitosinas, azólicos e equinocandinas. A *C. glabrata* é menos suscetível à ação de fluconazol e anfotericina B, porém possui alta sensibilidade a antifúngicos, como equinocandinas, voriconazol e posaconazol. A *C. krusei*, por sua vez, é intrinsecamente resistente ao fluconazol e geralmente menos sensível à ação da anfotericina B. Contudo, possui boa suscetibilidade a antifúngicos como equinocandinas e azólicos de espectro estendido^(9, 15).

Associados a essas características estão os resultados de diversos estudos que demonstram o aparecimento de resistência a antifúngicos em diferentes espécies de *Candida*. Em pacientes com infecções recorrentes, cepas anteriormente sensíveis passam a demonstrar perfil de sensibilidade alterado, principalmente após longa exposição do hospedeiro ao mesmo antifúngico. O uso intensivo de azólicos, como fluconazol, tem resultado em aumento no número de isolados de cepas resistentes^(7, 20).

Diante desse quadro, a realização de testes que demonstrem o perfil de sensibilidade das cepas de *Candida* envolvidas em processos infecciosos torna-se fundamental para a aplicação de tratamento adequado. De acordo com o CLSI⁽⁴⁾, o teste de suscetibilidade padrão é o método de microdiluição, porém trata-se de metodologia trabalhosa, demorada e de difícil implantação em rotina laboratorial. A utilização do Etest[®], portanto, aparece como método alternativo confiável para a determinação direta do perfil de sensibilidade e de fácil aplicabilidade⁽¹⁹⁾.

Embora muitos estudos demonstrem o aparecimento de cepas de *Candida* com resistência à ação de antifúngicos, em nosso estudo os isolados de infecção sanguínea apresentaram sensibilidade a todos os antifúngicos testados. Esses resultados estão de acordo com outros estudos realizados no Brasil e em diferentes países^(6, 7, 10). Entre as 42 cepas de espécies identificadas em CHROMagar[®] e N-PCR e submetidas ao Etest[®], todas foram sensíveis à ação da anfotericina B.

A suscetibilidade dos isolados à ação da 5-fluocitosina foi de 90,4%, demonstrando atividade contra todos os isolados de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*. Todavia, quatro isolados de *C. tropicalis* apresentaram resistência à 5-fluocitosina (Tabela 2). Estudo de Pfaller et al.⁽²¹⁾ demonstra que, entre cepas de *C. tropicalis*, é possível encontrar baixa porcentagem de resistência (8%) à 5-fluocitosina, no entanto outros estudos demonstram taxas de resistência de até 30%^(3, 23).

Entre os azólicos, o fluconazol foi o antifúngico com maior espectro de ação: apenas as cepas de *C. krusei*, intrinsecamente resistentes à ação desse antifúngico, não apresentaram suscetibilidade. Resultados similares foram observados em estudos realizados na América do Sul e no mundo^(6, 18). Contudo, a frequência de resistência ao itraconazol foi a maior entre todos os antifúngicos testados (12,1%): somente os isolados de *C. parapsilosis* apresentaram suscetibilidade (Tabela 2).

A presença de resistência ao itraconazol em isolados de *C. krusei* é esperada, uma vez que essa espécie possui menor sensibilidade aos antifúngicos azólicos⁽¹⁵⁾. Entretanto, a detecção de resistência em isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* demonstra a tendência, observada nos últimos 10 anos, ao

aumento do espectro de resistência a esse antifúngico por diferentes espécies⁽¹⁷⁾. Docz et al.⁽⁸⁾, em estudo com leveduras isoladas de infecções sanguíneas, evidenciaram taxa de resistência ao itraconazol (24%) superior à de resistência ao fluconazol (15,7%).

Embora a *C. albicans* permaneça como a espécie de levedura mais comum em infecções invasivas, metade dos casos de candidemia reportados ao redor do mundo é provocada por outras espécies de *Candida*. Em nosso estudo, assim como em toda a América Latina, a *C. tropicalis* e a *C. parapsilosis* são as espécies não-*albicans* mais comumente identificadas, porém com perfil de sensibilidade variável. A maioria dos isolados continua com boa sensibilidade aos antifúngicos mais utilizados na terapia clínica. No entanto, o crescente aparecimento de diferentes espécies de *Candida* resistentes aos antifúngicos azólicos confirma a necessidade de estudos epidemiológicos que possam monitorar possíveis mudanças na distribuição dessas espécies ou nos padrões de suscetibilidade.

Conclusão

A utilização de metodologias diagnósticas que determinem as espécies e o perfil de sensibilidade de amostras de *Candida* envolvidas em processos infecciosos tornam-se fundamentais para a aplicação de tratamento adequado. Os testes cromogênicos, como o CHROMagar[®] *Candida*, os testes quantitativos de avaliação do perfil de sensibilidade, como Etest[®], e a PCR são metodologias diagnósticas clinicamente úteis, pois fornecem resultados rápidos, são de fácil reprodutibilidade e altamente específicas. O conjunto diagnóstico possibilita a introdução precoce de tratamento específico, resultando em uso racional de antimicrobianos e diminuição do tempo de internação e dos custos hospitalares. Além disso, o crescente aparecimento de diferentes espécies de *Candida* resistentes aos antifúngicos azólicos confirma a importância da monitoração de possíveis mudanças na distribuição das espécies envolvidas nos processos infecciosos, assim como alterações de seus padrões de sensibilidade.

Agradecimentos

Agradecemos ao Núcleo de Apoio à Publicação (NAP) da FCMSCSP o suporte técnico-científico à publicação deste manuscrito.

Referências

1. AHMAD, S. *et al.* Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. *J Clin Microbiol*, v. 40, n. 7, p. 2483-9, 2002.
2. ALONSO-VALLE, H. *et al.* Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology and factors influencing mortality. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 22, n. 4, p. 254-7, 2003.
3. BEDINI, A. *et al.* Epidemiology of candidemia and antifungal susceptibility patterns in an Italian tertiary-care hospital. *Clin Microbiol Infect*, v. 12, n. 1, p. 75-80, 2005.
4. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. 2004. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline. Document M44. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
5. COLOMBO, A. L.; GUIMARAES, T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.
6. COLOMBO, A. L. *et al.* Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol*, v. 44, n. 8, p. 2816-23, 2006.
7. DA MATTA, D. A. *et al.* Antifungal susceptibility of 1,000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 57, n. 4, p. 399-404, 2007.
8. DOCZI, I. *et al.* Aetiology and antifungal susceptibility of yeast bloodstream infections in a Hungarian university hospital between 1996 and 2000. *J Med Microbiol*, v. 51, n. 8, p. 677-81, 2002.
9. DODDS ASHLEY, E. S. *et al.* Pharmacology of systemic antifungal agents. *Clin Infect Dis*, v. 43, p. S28-S39, 2006.
10. GODOY, P. *et al.* Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 98, p. 401-5, 2003.
11. GUDLAUGSSON, O. *et al.* Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis*, v. 37, n. 9, p. 1172-7, 2003.
12. KAUFFMAN, C. A. Fungal infections. *Proc Am Thorac Soc*, v. 3, n. 1, p. 35-40, 2006.
13. MORGAN, J. *et al.* Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: a case-control study using data from population-based candidemia surveillance. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 26, n. 6, p. 540-7, 2005.
14. MORRELL, M.; FRASER, V. J.; KOLLEF, M. H. Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 49, n. 9, p. 3640-5, 2005.
15. ODDS, F. C.; BROWN, A. J.; GOW, N. A. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol*, v. 11, n. 6, p. 272-9, 2003.
16. PAPPAS, P. G. *et al.* A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis*, v. 37, n. 5, p. 634-43, 2003.
17. PASSOS, X. S. *et al.* Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* spp. bloodstream isolates from a Brazilian tertiary care hospital. *Mycopathologia*, v. 163, n. 3, p. 145-51, 2007.
18. PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Role of sentinel surveillance of candidemia: trends in species distribution and antifungal susceptibility. *J Clin Microbiol*, v. 40, n. 10, p. 3551-7, 2002.
19. PFALLER, M. A. *et al.* Evaluation of the Etest method for determining fluconazole susceptibilities of 402 clinical yeast isolates by using three different agar media. *J Clin Microbiol*, v. 36, n. 9, p. 2586-9, 1998.
20. PFALLER, M. A.; PAPPAS, P. G.; WINGARD, J. R. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. *Clin Infect Dis*, v. 43, p. S3-S14, 2006.
21. PFALLER, M. A. *et al.* In vitro activities of 5-fluorocytosine against 8,803 clinical isolates of *Candida* spp.: global assessment of primary resistance using National Committee for Clinical Laboratory Standards susceptibility testing methods. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 46, n. 11, p. 3518-21, 2002.
22. SANDHU, G. S. *et al.* Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J Clin Microbiol*, v. 33, n. 11, p. 2913-9, 1995.
23. TORTORANO, A. M. *et al.* Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents*, v. 27, n. 5, p. 359-66, 2006.
24. WEIG, M.; BROWN, A. J. Genomics and the development of new diagnostics and anti-*Candida* drugs. *Trends Microbiol*, v. 15, n. 7, p. 310-7, 2007.

Endereço para correspondência

Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo
Rua Dr. Cesário Mota Junior, 112 – Santa Cecília
CEP 01221020 – São Paulo-SP
Tel.: (11) 2176-7315
e-mail: smyyueda@gmail.com