



Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial

ISSN: 1676-2444

jbpm@sbpc.org.br, adagmar.andriolo@gmail.com

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial

Jenne Mímica, Lycia Mara; Ykko Ueda, Suely Mitoi; Valle Martino, Marines Dalla; Navarini, Alessandra; Julien Martini, Izabel
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, vol. 45, núm. 1, febrero, 2009, pp. 17-23
Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial
Rio de Janeiro, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=393541946005>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica
Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

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
<p>Diagnóstico de <i>Candida</i> spp.</p> <p>Suscetibilidade a antifúngicos</p> <p>Resistência a múltiplas drogas</p>	<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>

abstract	key words
<p>Background: Invasive infections by <i>Candida</i> 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 <i>Candida</i> species and evaluate the sensitivity pattern to different antifungal agents among the identified ones. Material and Methods: The identification of <i>Candida</i> species present in samples of different biological materials was conducted through CHROMagar® <i>Candida</i> culture and Nested-PCR. The sensitivity pattern was assessed using Etest®. Results: The culture of samples on CHROMagar® revealed 50% <i>Candida albicans</i>, 20.8% <i>Candida tropicalis</i>, 2.4% <i>Candida krusei</i>, and 26.9% other undetermined species. Samples of <i>Candida albicans</i> and <i>Candida tropicalis</i> were identified through CHROMagar® and N-PCR. Species that were not determined through CHROMagar® were characterized as <i>Candida parapsilosis</i> by N-PCR. Resistance to fluconazole, 5-fluocytosine was detected, respectively, in <i>Candida krusei</i> and <i>Candida tropicalis</i> samples. Both <i>Candida albicans</i> and <i>Candida tropicalis</i> 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 <i>Candida</i> species resistant to azole confirms the importance of monitoring possible changes in the distribution of pathogenic species and in the sensitivity pattern.</p>	<p>Diagnosis of <i>Candida</i> spp.</p> <p>Antifungal susceptibility</p> <p>Multidrug resistance</p>

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 patogenicidade 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-

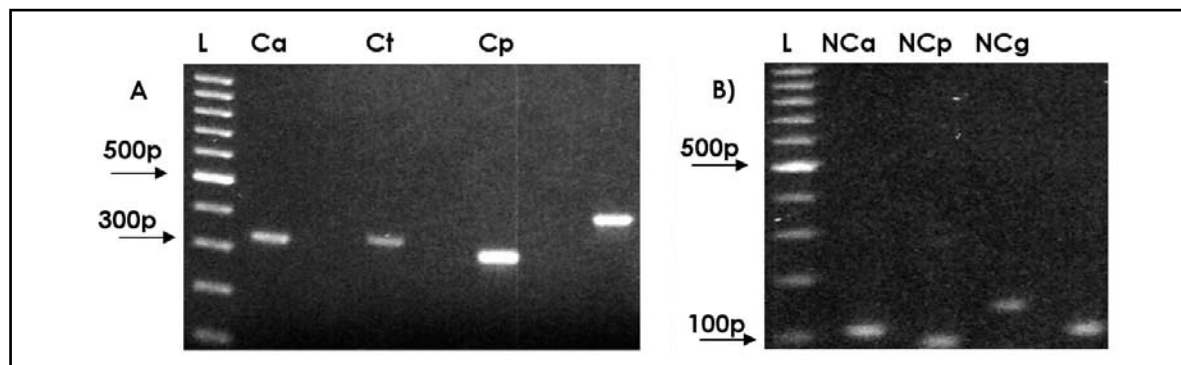


Figura – Gel de agarose a 1,5% para amostras de *Candida* submetidas à determinação de espécie pela reação de N-PCR. A) Reação de PCR. L: padrão de peso molecular de 100pb; Ca: amostra de *C. albicans*; Ct: amostra de *C. tropicalis*; Cp: amostra de *C. parapsilosis*; Cg: amostra de *C. glabrata*. B) 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 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 01221-020 – São Paulo-SP
Tel.: (11) 2176-7315
e-mail: smyyueda@gmail.com