



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

VIVIANE GEVEZIER DA COSTA

**EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES HEMATOGENICAS
POR *Candida spp.* NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA E AVALIAÇÃO
DE ANTIFÚNGICOS E BAICALEÍNA NA SUSCETIBILIDADE
FÚNGICA**

VIVIANE GEVEZIER DA COSTA

**EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES HEMATOGENICAS
POR *Candida spp.* NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA E AVALIAÇÃO
DE ANTIFÚNGICOS E BAICALEÍNA NA SUSCETIBILIDADE
FÚNGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito final a obtenção do título de mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Márcia Cristina Furlaneto.

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Bibliotecas Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C837e Costa, Viviane Gevezier da.
Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida spp.* no Hospital
Universitário da Universidade Estadual de Londrina e avaliação de antifúngicos e
baicaleína na suscetibilidade fúngica . Viviane Gevezier da Costa. – Londrina,
2013.
85f. : il.

Orientador: Márcia Cristina Furlaneto.
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia, 2013.
Inclui bibliografia.

1. Candida – Epidemiologia – Teses. 2. Fungos patogênicos – Teses. 3. Agentes
antifúngicos – Teses. 4. Flavonóides – Teses. 5. Microbiologia médica – Teses. I.
Furlaneto, Márcia Cristina. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579:582.28

VIVIANE GEVEZIER DA COSTA

**EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES HEMATOGÊNICAS POR *Candida*
spp. NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA E AVALIAÇÃO DE ANTIFÚNGICOS E
BAICALEÍNA NA SUSCEPTIBILIDADE FÚNGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito final a obtenção do título de mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Márcia Cristina Furlaneto
UEL – Londrina – PR

Profa. Dra. Melyssa Fernanda Norman Negri
UEM – Maringá – PR

Profa. Dra. Luciana Furlaneto-Maia
UTFPR – Londrina – PR

Londrina, 26 de fevereiro de 2013.

*Aos que me fizeram o que sou hoje, meus pais Maria
Helena e Paulo, minha irmã Keli e àquele que
hoje me molda: meu marido, Flávio.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter aberto os caminhos certos em minha direção e ter me dado à força necessária para conquistar meus objetivos.

À Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade de uma formação pública gratuita.

À minha orientadora Márcia Cristina Furlaneto, por acreditar em mim e me permitir fazer parte de sua equipe de trabalho desde a iniciação científica.

À professora Regina Mariuza Borsato Quesada e a Carolina Higashi pela parceria que juntamente com o Hospital Universitário de Londrina permitiram a realização deste trabalho.

Aos professores Gerson Nakazato e Ricardo Sergio Couto de Almeida pela contribuição no processo de qualificação.

Às professoras Melyssa Fernanda Norman Negri e Luciana Furlaneto-Maia que aceitaram fazer parte da realização deste trabalho.

Às professoras Maria Helena Fungaro e Maria Angélica Watanabe pela disponibilidade de equipamentos em seus laboratórios.

A CAPES, CNPq e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

A todos os funcionários do laboratório de microbiologia e SAME do Hospital Universitário de Londrina que me receberam com grande carinho e em especial a Dona Lourdes que por longos dias dispôs seu tempo na procura dos inúmeros prontuários necessários para realização deste trabalho.

Aos técnicos Oswaldo, da microbiologia, e ao João, do LAPA, por sempre me auxiliara no que foi necessário para a realização deste trabalho.

Às minhas amigas de graduação Angélica Ishikawa, Stéphaney Watzel, Vanessa França, Vanessa Michelan, minhas grandes companheiras que me inspiraram a chegar até aqui.

À amiga Vivian Cervantes por sua solicitude em me ajudar com os testes estatísticos, mesmo não fazendo parte do nosso laboratório.

Aos colegas de laboratório Daiane, Daniel, Helena, Hugo, Kátia, Luiz, Marcinha e Thalita, pela ajuda prestada, pelos momentos de descontração, pelas risadas soltas, enfim por terem partilhado esse momento tão importante em minha vida. Em especial

as amigas Alane e Manu, que me mostraram que a amizade pode ultrapassar as barreiras do laboratório e se fortalecer no compartilhamento da vida.

Aos meus pais que foram meus grandes guias, meu exemplo de força e persistência. Os responsáveis pelo “ponta pé” inicial.

Ao meu marido, meu grande conselheiro, meu melhor amigo, meu eterno companheiro que esteve ao meu lado em todos os momentos, sim, em todos. Tornou-se além de tudo meu companheiro de laboratório, que apesar de cansado ao sair do trabalho, por vezes, foi me fazer companhia tarde da noite, foi cuidar de mim. Esse título meu amor, também é seu.

A todos que de uma maneira ou de outra cruzaram meu caminho, pois deixaram um pouquinho de si e o que sou ou o que faço também pertence a vocês.

Muito obrigada!

COSTA, Viviane Gevezier da. **Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina e avaliação de antifúngicos e baicaleína na suscetibilidade fúngica**. 2013. 85p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

Espécies do gênero *Candida* são os principais patógenos fúngicos envolvidos em infecções humanas. Frente a emergência de espécies de *Candida* não-*albicans* e a ocorrência de resistência intrínseca e adquirida destas leveduras, é necessário um estudo contínuo para analisar possíveis mudanças no perfil de resistência e frequência de espécies, assim como, surge a necessidade de busca de drogas antifúngicas eficazes. Neste estudo os objetivos foram avaliar a frequência de espécies de *Candida* obtidas de hemoculturas de pacientes internados no Hospital Universitário de Londrina nos anos de 2010 e 2011, analisar a suscetibilidade fúngica por meio da técnica de Microdiluição em Caldo proposta pelo AFST-EUCAST (2008) e avaliar a atividade antifúngica do flavonoide baicaleína frente a isolados de *Candida parapsilosis* sensíveis e resistentes ao fluconazol. Um total de 68 episódios de candidemia ocorreu nos anos de 2010 e 2011. *Candida tropicalis* foi a espécie mais frequente (30,9%) seguida por *C. albicans* (27,9%), *C. parapsilosis* (22,1%) e *C. glabrata* (10,3%). Vários fatores de risco parecem estar associados aos episódios de candidemia, destacando o uso prévio de antibióticos (96,5%), a ventilação mecânica (77,2%), e o internamento em unidade de terapia intensiva (75,4%). Os agentes antifúngicos utilizados nos testes de suscetibilidade foram: anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol. Com relação à anfotericina B, apenas um isolado de *C. albicans* foi resistente (0,98%) entre todos isolados testados. No geral, houve alta suscetibilidade aos azóis, sendo *C. glabrata* e *C. krusei* as espécies que apresentaram as maiores Concentrações Inibitória Mínima (CIM). A atividade antifúngica da baicaleína sobre 15 isolados clínicos de *C. parapsilosis* e o isolado ATCC 22019 foi avaliada por meio da análise de suscetibilidade fúngica e por meio da avaliação da viabilidade celular. A baicaleína apresentou valores de IC₅₀ de 8 µg/mL para isolados resistentes ao fluconazol e de 4-8 µg/mL para os sensíveis. Já com relação ao CIM₈₀ foi observada uma variação de 8-32 µg/mL e de 16-32 µg/mL para os isolados sensíveis e resistentes ao fluconazol, respectivamente. O uso combinado de fluconazol e baicaleína resultou em sinergismo para o isolado 357.10 em termos de CIM₅₀. Já em termos de CIM₈₀ sinergismo foi observado para 2 isolados (262.10 e 357.10). Houve redução de 4 vezes na concentração de ambas substâncias para o primeiro isolado e de até 32 vezes para o último. Com relação ao teste de viabilidade celular, os melhores resultados foram obtidos para o isolado 357.10 (resistente a fluconazol) que apresentou viabilidade celular de apenas 15,74% com relação ao controle frente a 32 µg/mL de baicaleína. Os dados obtidos reforçam o aumento de *Candida* não-*albicans* no Brasil, entretanto a resistência a anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol entre isolados sanguíneos de *Candida* ainda é incomum. Os dados obtidos sugerem, ainda, que o flavonoide baicaleína apresenta atividade antifúngica contra isolados de *C. parapsilosis* independente dos mesmos apresentarem resistência ao fluconazol.

Palavras-chave: *Candida* spp. Candidemia. Epidemiologia. Agentes antifúngicos. Baicaleína. Suscetibilidade.

COSTA, Viviane Gevezier da. **Epidemiology of hematogenous infections by *Candida spp.* at the University Hospital of the State University of Londrina and evaluation of antifungal agents and baicalein in the fungal susceptibility.** 2013. 85p. Dissertation (Master's Degree in Microbiology) – State University of Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

Candida species are the main fungal pathogens involved in human infections. Considering the emergence of non-*albicans* *Candida* species and the occurrence of intrinsic and acquired resistance of this yeast is necessary a continuous study to analyze possible changes in resistance and frequency of species, as well as, the need arises to search for effective antifungal drugs. In this study the objectives were to evaluate the frequency of *Candida* species from blood cultures obtained from patients admitted to the University Hospital of Londrina in the years 2010 and 2011, to evaluate the fungal susceptibility by broth microdilution technique proposed by AFST-EUCAST (2008) and to evaluate the antifungal activity of the flavonoid baicalein against isolates of *Candida parapsilosis* susceptible and resistant to fluconazole. A total of 68 episodes of candidemia occurred in the years 2010 and 2011. *Candida tropicalis* was the most frequent (30.9%) followed by *C. albicans* (27.9%), *C. parapsilosis* (22.1%) and *C. glabrata* (10.3%). Several risk factors seem to be associated with episodes of candidemia, highlighting the use of antibiotics (96.5%), mechanical ventilation (77.2%), and hospitalization in the intensive care unit (75.4%). The antifungal agents used in these susceptibility tests were: amphotericin B, fluconazole, itraconazole and voriconazole. Regarding to amphotericin B, only one isolate of *C. albicans* was resistant (0.98%) among all isolates tested. Overall, there was a high susceptibility to azoles. *C. glabrata* and *C. krusei* exhibited the highest minimal inhibitory concentrations (MIC). The antifungal activity of baicalein was evaluated by the employment of fungal susceptibility tests and by cell viability over 15 clinical isolates of *C. parapsilosis* and ATCC 22019. The baicalein showed IC50 values of 8µg/mL for fluconazole resistant strains and of 4-8µg/mL for susceptible strains. With regard to CIM80 it varied between 8-32 µg/mL and 16-32 µg/mL for fluconazole susceptible and resistant strains, respectively. The combined use of fluconazole and baicalein resulted in synergism for strain 357.10 in terms of MIC50. In terms of CIM80 synergism was observed for two strains (262.10 and 357.10). There was a reduction of 4 times the concentration of both substances to the former strain and up to 32 times to the latter strain. Regarding cell viability, the best results were obtained for the strain 357.10 (fluconazole resistant) that exhibited cell viability of only 15.74% compared to the control when exposed to 32 µg/mL baicalein. The obtained data reinforce the increase of non-*albicans* *Candida* species in Brazil, however, resistance to amphotericin B, fluconazole, itraconazole and voriconazole among blood strains of *Candida* is still rare. The data also suggest that the flavonoid baicalein has antifungal activity against isolates of *C. parapsilosis* independent of their resistance to fluconazole.

Keywords: *Candida spp.* Candidemia. Epidemiology. Antifungal agents. Baicalein. Susceptibility.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1** – Modelo esquemático da organização das regiões gênicas 18S, 5.8S, 26S e as regiões ITS 1 e ITS 2, do DNA ribossômico, reproduzido a partir de LI et al. (2003). As letras Cgl, Ck, Ca, Ct e Cp representam respectivamente regiões espécie específicas das espécies *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e complexo *C. parapsilosis*. ITS4 representa um iniciador reverso universal 19
- Figura 2** – Estrutura química do antifúngico Anfotericina B..... 28
- Figura 3** – Estrutura química dos antifúngicos azólicos fluconazol, voriconazol e itraconazol 29
- Figura 4** – Estrutura química da baicaleína..... 33

PARTE I

- Figura 1** – Perfil comparativo da distribuição de espécies do gênero *Candida*, de isolados sanguíneos, Hospital Universitário de Londrina, nos períodos 2006-2007 e 2010-2011 52
- Figura 2** – Frequência de isolados sanguíneos de *C. parapsilosis* e *C. glabrata* com relação à idade dos pacientes internados no Hospital Universitário de Londrina, 2010-2011 55

LISTA DE TABELAS

PARTE I

- Tabela 1** – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na identificação de *Candida spp.* 48
- Tabela 2** – Características demográficas e clínicas de pacientes com candidemia do Hospital Universitário de Londrina (n=57) 54
- Tabela 3** – Concentração Inibitória Mínima (CIM) de isolados sanguíneos de *Candida spp.* do Hospital Universitário de Londrina..... 60
- Tabela 4** – Frequência de resistência entre 102 isolados sanguíneos do gênero *Candida* de pacientes do Hospital Universitário de Londrina..... 61

PARTE II

- Tabela 1** – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na identificação de *Candida parapsilosis*..... 72
- Tabela 2** – Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do fluconazol e baicaleína (de forma isolada e em combinação) contra 15 isolados clínicos de *Candida parapsilosis* e a cepa de referência 22019 78
- Tabela 3** – Concentração Inibitória Mínima da baicaleína contra *C. parapsilosis* (resistente e sensível ao fluconazol) e o efeito na viabilidade celular 80

LISTA DE SIGLAS

AFST-EUCAST	<i>Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CBP	ponto de corte clínico (do inglês <i>Clinical Breakpoints</i>)
ECV	ponto de corte epidemiológico (do inglês <i>Epidemiological Cutoff Values</i>)
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
FICI	<i>Fractional Inhibitory Concentration Index</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
MOPS	ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Rpm	rotações por minuto
RPMI	Meio de cultura celular desenvolvido pelo Instituto Roswell Park Memorial (do inglês <i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
UFC/mL ⁻¹	Unidades Formadoras de Colônia por mililitro
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
µg/mL ⁻¹	Microgramas por mililitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	GÊNERO <i>CANDIDA</i>	15
2.2	IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES.....	17
2.3	CANDIDEMIA.....	19
2.4	EPIDEMIOLOGIA.....	20
2.4.1	Distribuição de Espécies de <i>Candida</i> Associados à Candidemia.....	20
2.4.2	Doenças de Base e Fatores de Risco Associados à Episódios de Candidemia.....	24
2.5	ANTIFÚNGICOS, MECANISMOS DE AÇÃO E RESISTÊNCIA.....	27
2.5.1	Anfotericina B.....	27
2.5.2	Antifúngicos Azólicos.....	29
2.6	FLAVONOIDES.....	32
2.6.1	Baicaleína.....	32
	REFERÊNCIAS	35
	PARTE I	45
	EPIDEMIOLOGIA, DISTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE FÚNGICA DE ISOLADOS SANGUÍNEOS DE <i>Candida spp.</i> DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA	45
1	INTRODUÇÃO	45
1.1	OBJETIVOS.....	46
2	MATERIAIS E MÉTODOS	47
2.1	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....	47
2.2	MATERIAIS BIOLÓGICOS.....	47
2.3	IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES.....	47

2.4	AGENTES ANTIFÚNGICOS E TESTES DE SUSCETIBILIDADE	48
2.5	CRITÉRIOS DE INTERPRETAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	49
2.6	MÉTODOS ESTATÍSTICOS	50
2.7	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	50
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
3.1	IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS	51
3.2	DISTRIBUIÇÕES DE ESPÉCIES	51
3.3	DADOS DEMOGRÁFICOS E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....	53
3.4	TESTE DE SUSCETIBILIDADE	57
	REFERÊNCIAS	63
	PARTE II	69
	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO FLAVONOIDE BAICALEÍNA CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>Candida parapsilosis</i> STRICTO SENSO	69
1	INTRODUÇÃO	69
1.1	OBJETIVOS.....	71
2	MATERIAIS E MÉTODOS	72
2.1	MATERIAIS BIOLÓGICOS	72
2.2	TESTE DE SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA	72
2.3	AVALIAÇÃO DA COMBINAÇÃO ENTRE A BAICALEÍNA E O FLUCONAZOL.....	73
2.4	VIABILIDADE CELULAR	74
2.5	MÉTODOS ESTATÍSTICOS	75
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
3.1	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	76
3.2	AÇÃO ANTIFÚNGICA DA BAICALEÍNA EM COMBINAÇÃO COM FLUCONAZOL.....	77
3.3	VIABILIDADE CELULAR FRENTE AO FLAVONOIDE BAICALEÍNA.....	79
4	CONCLUSÕES	81
	REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

As leveduras do gênero *Candida* têm grande importância pela alta frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano. Entre as infecções causadas pelo gênero *Candida* salienta-se a relevância clínica dos casos de infecções de corrente sanguínea, conhecida como candidemia ou candidíase hematogênica. As leveduras de *Candida spp.* são os principais patógenos fúngico envolvidos em infecções sanguíneas humanas (MARRA et al., 2011).

A relevância das infecções fúngicas por *Candida* em ambiente hospitalar passou a ganhar importância a partir da década de 80 (revisado por COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; RIBEIRO et al., 2004), porém até o momento, ainda são escassos os estudos relativos à candidemia no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina que é centro de referência regional para o Sistema Único de Saúde (SUS).

A espécie *Candida albicans* ainda é a mais associada a tais infecções, porém nos últimos anos têm se observado um aumento na ocorrência de espécies de *Candida* não-*albicans* (COLOMBO et al., 2007; CHANG et al., 2008; HINRICHSEN et al., 2009; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010) que apresentam propensão à resistência ou são menos suscetíveis aos antifúngicos comumente utilizados na rotina clínica (BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010).

Diante da emergência de espécies de *Candida* não-*albicans* surge à necessidade de buscar alternativas para o controle destes micro-organismos. Neste contexto, destacam-se substâncias naturais, de origem vegetal, que têm sido fonte particularmente rica de agentes anti-infecciosos (revisado por CUSHNIE; LAMB, 2005; RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2010).

O flavonoide baicaleína, tem se apresentado como alternativa promissora na inibição de diversos micro-organismos (revisado por HU et al., 2005; CUSHNIE; LAMB, 2005). A combinação de compostos vegetais com os antifúngicos comumente utilizados, atuando em sinergismo também vem sendo estudada com sucesso na inibição do crescimento destes patógenos (HUANG et al., 2008; FU et al., 2010).

Desta forma, o presente trabalho teve por objetivos o estudo da distribuição de espécies de *Candida spp.* obtidas de infecções hematogênicas de pacientes internados no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina nos anos de 2010 e 2011 e avaliação quanto à suscetibilidade aos antifúngicos mais comumente utilizados na prática

clínica, bem como de doenças subjacentes e fatores de risco associados aos episódios de candidemia. O presente trabalho teve também por objetivo avaliar o potencial antifúngico do flavonoide baicaleina, assim, como o efeito sinérgico do mesmo em conjunto com fluconazol sobre isolados de *C. parapsilosis* stricto sensu.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GÊNERO *CANDIDA*

O gênero *Candida* compreende mais de 200 espécies, no entanto, poucas são patogênicas ao homem (revisado por WARNOCK, 2007). Aproximadamente 65% das espécies de *Candida* são incapazes de proliferação a 37°C, o que impede estas espécies de serem agentes patogênicos bem sucedidos ou mesmo comensais em humanos (revisado por SILVA et al., 2012). No início da década de 60 eram conhecidas apenas cinco espécies patogênicas de *Candida* sendo que atualmente são conhecidas mais de dezessete espécies, no entanto, 90% das infecções invasivas por *Candida spp.* são atribuídas a cinco espécies, sendo estas *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* (revisado por COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; PFALLER; DIEKEMA, 2007).

Espécies de *Candida* são mais frequentemente isoladas da cavidade oral, via vulvovaginal e via urinária. São detectados em cerca de 31 a 55% dos indivíduos saudáveis (revisado por SILVA et al., 2012). A convivência levedura hospedeiro ocorre durante toda a vida (revisado por RIBEIRO et al., 2004), no entanto, estes micro-organismos comensais podem se tornar patogênicos caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro.

A espécie *C. albicans* apresenta potencial patogênico bastante conhecido, sendo a mais frequentemente isolada de infecções superficiais e invasivas em diferentes sítios anatômicos e em casuísticas de todas as partes do mundo, inclusive permanece como a maior causa de candidemia, apesar de grandes variações descritas conforme a região demográfica (revisado por COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; WARNOCK, 2007). Contudo, nos últimos anos têm se observado um aumento na ocorrência de espécies de *Candida* não-*albicans* (BASSETTI et al., 2006; COLOMBO et al., 2007; CHANG et al., 2008; HINRICHSEN et al., 2009; POIKONEM et al., 2010; DIEKEMA et al., 2012).

O aumento no número de espécies de *Candida* não-*albicans* pode, em parte, estar relacionado com a melhoria dos métodos de diagnóstico, assim como, pode ser um reflexo do seu nível mais elevado de resistência a certos antifúngicos em comparação com *C. albicans* (revisado por SILVA et al., 2012).

Entre as espécies de *Candida* não-*albicans*, *C. parapsilosis* é caracterizada por alta ocorrência em crianças e recém-nascidos prematuros (ALMIRANTE et al., 2006; SPILIOPOULOU et al., 2010; TRAGIANNIDIS et al., 2012). No Brasil, *C. parapsilosis* é responsável por 20-30% dos episódios de candidemia, com prevalência similar entre populações adulta e pediátrica (BRITO et al., 2006). Caracteristicamente, *C. parapsilosis* tem uma elevada afinidade por nutrição parenteral, tem grande capacidade de produzir biofilme em superfícies abióticas e frequentemente coloniza as mãos de profissionais da saúde (CLARCK et al., 2004; BONASSOLI et al., 2005; revisado por TROFA et al., 2008).

Em 2005, foi revista a classificação do complexo *C. parapsilosis*, sendo proposto duas novas espécies, *Candida orthopsilosis* e *Candida metapsilosis* para substituir as espécies anteriormente designadas como *C. parapsilosis* grupo II e III, respectivamente (TAVANTI et al., 2005). Ainda são poucos os estudos relativos a estas duas espécies. Segundo estes autores, testes relacionados a caracterização fenotípica, assimilação de açúcares, testes de suscetibilidade fúngica e formação de biofilme não apontaram diferenças significativas entre as três espécies do complexo *C. parapsilosis* (TAVANTI et al., 2005).

Já a espécie *C. tropicalis* representa de 3 a 66% dos isolados sanguíneos do gênero *Candida* em todo o mundo, sendo que sua frequência está sujeita à localização geográfica, onde se observa uma prevalência notável em regiões de climas tropicais (revisado por CHAI et al., 2010). *C. tropicalis* possui considerável potencial como agente oportunista quando o hospedeiro encontra-se neutropênico (revisado por WARNOCK, 2007), quando há supressão da microbiota pelo uso de antimicrobianos e danos na mucosa gastrointestinal (revisado por COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). Colonização gastrointestinal por *C. tropicalis* é comum em indivíduos saudáveis (até 30%), sendo um fator de risco reconhecido para o desenvolvimento de candidíase invasiva (revisado por CHAI et al., 2010). Além da colonização gastrointestinal *C. tropicalis* pode ser encontrada na pele, trato geniturinário, trato respiratório e também pode ser recuperado a partir do meio ambiente, em particular a partir de superfícies em ambientes médicos (revisado por NEGRI et al., 2012).

Estudos experimentais em humanos demonstraram que *C. tropicalis* foi capaz de sobreviver, por até 24 horas, nas mãos de voluntários, assim como, em superfícies inanimadas. Desta forma, tem sido sugerido que há potencial de transmissão cruzada de *C. tropicalis* entre os profissionais de saúde e pacientes (revisado por CHAI et al., 2010).

A incidência das espécies *C. glabrata* e *C. krusei* também está associada à localização geográfica, sendo que em hospitais brasileiros ocorrem em baixa frequência. *C.*

glabrata tem se tornado a segunda espécie mais comum em casos de candidemia na América do Norte (revisado por WARNOCK, 2007). Sua maior ocorrência está associada a pacientes idosos (revisado por COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; TORTORANO et al., 2006; WARNOCK, 2007). Até recentemente, poucos estudos avaliaram os fatores de risco independentes associados à aquisição nosocomial de *C. glabrata* (revisado por SILVA et al., 2012). Já *C. krusei* tem-se mostrado como um patógeno hospitalar ocasional, particularmente, em pacientes portadores de doenças hematológicas malignas e/ou submetidos a transplante de medula óssea (revisado por COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). Segundo dados da literatura (revisão de PFALLER; DIEKEMA, 2007), embora *C. krusei* apresente resistência intrínseca ao fluconazol esta espécie tem representado, mundialmente, não mais do que 2% a 4% das infecções sanguíneas por *Candida*, apesar do uso generalizado de fluconazol.

2.2 IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES

Diferenças de virulência entre as espécies de *Candida*, bem como em sua suscetibilidade a drogas antifúngicas tornam a identificação ao nível de espécie importante para o estabelecimento de um diagnóstico definitivo. Além disso, a identificação ao nível de espécie é fundamental para permitir a escolha da melhor abordagem terapêutica a ser adotada na prática clínica (ELLEPOLA; MORRISON, 2005).

Espécies de *Candida* podem ser identificados com base na assimilação de hidratos de carbono, testes de fermentação e por características morfológicas, tais como desenvolvimento de tubo germinativo e produção de clamidósporos. A maioria dos métodos utilizados para a identificação de *Candida spp.* são aqueles com base na assimilação de carboidratos e/ou detecção de enzimas a partir de kits disponíveis comercialmente (ELLEPOLA; MORRISON, 2005). Esses métodos tornaram o processo de identificação mais rápido e menos trabalhoso e permitem a identificação das espécies mais comuns de *Candida*, enquanto a identificação de determinadas espécies de *Candida* como, por exemplo, a diferenciação de *C. dubliniensis* de *C. albicans*, muitas vezes requer a utilização de testes bioquímicos complementares ou morfológicos para a identificação definitiva (revisado por SILVA et al., 2012).

Meios de cultura diferenciais comercialmente disponíveis podem ser utilizados para diferenciação das espécies de leveduras. Dentre eles, o meio CHROMagar® *Candida* (CHROMagar, Paris, França) que é um meio seletivo e diferencial que tem como

base o contraste da cor das colônias, produzidas por reações de enzimas espécie-específica com substrato cromogênico (ODDS; BERNAERTS, 1994; SPOLIDORIO et al., 2009). O meio CHROMagar permite a identificação específica de *C. albicans* (colônias de coloração verde) *C. tropicalis* (colônias de coloração azul), e *C. krusei* (colônias de coloração rosa e aparência aveludada) (BAUMGARTNER et al., 1996). Dadas as diferenças significativas na suscetibilidade aos azólicos e outras drogas entre essas três espécies, um método que permita a sua detecção e identificação simultânea pode facilitar o uso adequado de agentes antifúngicos em pacientes de alto risco (PFALLER et al., 1996).

Apesar da alta sensibilidade e especificidade, sendo superiores a 99% (ODDS; BERNAERTS, 1994), a identificação presuntiva apresenta algumas limitações como a identificação de um número limitado de espécies. Por esse fato, métodos adicionais são necessários para confirmação destas espécies e para a identificação de outras espécies de *Candida* de importância clínica (SHIN et al., 1997). As limitações descritas acima levaram ao desenvolvimento alternativo da utilização de métodos moleculares. Esses sistemas oferecem o potencial para a identificação mais rápida e específica de *Candida spp.* em comparação aos tradicionais métodos fenotípicos (ELLEPOLA; MORRISON, 2005).

Uma das alternativas, entre os métodos moleculares, compreende a reação em cadeia da polimerase (PCR), que consiste na amplificação de milhões de cópias de fragmentos específicas de DNA em apenas algumas horas (PIERCE, 2004). O princípio desta abordagem se baseia na utilização de sequências iniciadoras específicas que não permitem a amplificação de DNA do hospedeiro ou de outros micro-organismos. A técnica tem sido utilizada para a detecção rápida e específica de espécies de *Candida* envolvidas em processos infecciosos, com sensibilidade de até 100% (LUO; MITCHELL, 2002).

Regiões altamente conservadas de DNA ribossomal têm sido os alvos mais comuns utilizados para a amplificação por PCR e incluem as regiões 5.8S, 18S e 26S do gene rRNA. Outro alvo amplamente utilizado inclui as regiões espécie-específica, “internal transcribed spacer” (ITS) posicionadas entre as regiões conservadas, acima citadas (ELLEPOLA; MORRISON, 2005). Como pode ser observado na Figura 1, os amplicons apresentarão comprimentos distintos e podem ser eficazmente separados e reconhecidos por eletroforese (LI et al., 2003).

Figura 1 – Modelo esquemático da organização das regiões gênicas 18S, 5.8S, 26S e as regiões ITS 1 e ITS 2, do DNA ribossômico, reproduzido a partir de LI *et al.* (2003). As letras Cgl, Ck, Ca, Ct e Cp representam respectivamente regiões espécie específicas das espécies *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e complexo *C. parapsilosis*. ITS4 representa um iniciador reverso universal.



2.3 CANDIDEMIA

A ocorrência de casos de candidemia em hospitais terciários aumentou substancialmente nas últimas décadas em diferentes partes do mundo. Estudo realizado em um período de 05 anos em um hospital na Itália apontou um aumento na incidência de candidemia de 1,25 em 1999 para 3,06 episódios por 10000 pacientes/ano em 2003 (BASSETTI *et al.*, 2006). Mais recentemente, Fórtun e colaboradores (2012) em estudo realizado em um período de 10 anos em um hospital na Espanha registrou um aumento na incidência de candidemia de 0,57 em 2000 para 1,59 em 2009 por 1000 admissões/ano. Aumento na incidência de candidemia também foi observado na Austrália, de 0,2 em 1999 para 0,69 em 2008 por 10000 pacientes/dia (PLAYFORD *et al.*, 2010). No Brasil, Colombo e colaboradores (2006) registraram uma incidência de 2,49 casos de candidemia por 1000 admissões e 0,37 casos por 1000 pacientes/dia.

As razões para a elevada incidência de candidemia em hospitais brasileiros não são claras, mas pode estar relacionada a uma combinação de fatores, incluindo diferenças em recursos disponíveis para atendimento médico e programas de treinamento, dificuldades na implementação de programas de controle de infecção em hospitais de países em desenvolvimento, um número limitado de profissionais de saúde disponíveis para atender os pacientes em UTIs, e as práticas menos agressivas de profilaxia e tratamento antifúngico empírico (NUCCI *et al.*, 2010).

Em países como Taiwan e Estados Unidos o gênero *Candida* é apontado como o quarto patógeno mais frequentemente encontrado em amostras sanguíneas (WISPLINGHOFF *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2010). Já na Austrália, *Candida spp.* foi

apontada como o sétimo micro-organismo causador de infecção sanguínea (PLAYFORD et al., 2010).

Estudo realizado em diversos hospitais brasileiros apontou *Candida spp.* como o sétimo micro-organismo mais prevalente em pacientes que apresentavam infecção sanguínea. Dentre as infecções causadas por fungos, 92,6% foram associadas a espécies de *Candida* (MARRA et al., 2011).

Acredita-se que a maioria dos casos de candidemia seja adquirida por via endógena, pela translocação do patógeno através do trato gastrointestinal, devido alguma variável que provoque desequilíbrio da microbiota ou lesão da mucosa gastrointestinal (revisado por COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). Infecções hematogênicas por *Candida* também podem ser adquiridas por via exógena, pelo contato das mãos mal higienizadas de profissionais de saúde com pacientes portadores de cateter vasculares central, implantes de próteses contaminadas, bem como pela administração parenteral de soluções contaminadas (revisado por RIBEIRO et al., 2004).

As doenças fúngicas invasivas estão associadas com uma alta taxa de mortalidade e o tratamento é de alto custo (HASSAN et al., 2009; KETT et al., 2011). Estudo brasileiro que analisou pacientes que apresentavam infecção sanguínea causada por diversos micro-organismos apontou as taxas de morte causadas por *Candida spp.* entre as maiores observadas, sendo de até 85,9% em pacientes de UTI (Unidade de Terapia Intensiva) (MARRA et al., 2011). Kett e colaboradores (2011), em estudo realizado com pacientes de UTI, observaram que as taxas de morte de pacientes que apresentavam infecção sanguínea por *Candida* (42,6%) foram maiores do que as taxas dos pacientes que apresentavam bacteremia por Gram-positivas (25,3%) e Gram-negativas (29,1%).

2.4 EPIDEMIOLOGIA

2.4.1 Distribuição de Espécies de *Candida* Associados à Candidemia

Em países da América do Norte como Canadá e Estados Unidos, *C. albicans* é a espécie mais prevalente entre os episódios de candidemia, sendo *C. glabrata* a mais frequente entre as espécies de *Candida* não-*albicans* (PAPPAS et al., 2003; LAUPLAND et al., 2005; St-GERMAIN et al., 2008; DIEKEMA et al., 2012). A média da frequência de ocorrência de *C. albicans*, segundo esses autores, foi de 56,6% no Canadá (LAUPLAND et al., 2005; St-GERMAIN et al., 2008) e de 46% nos Estados Unidos

(PAPPAS et al., 2003; DIEKEMA et al., 2012). Para *C. glabrata* a frequência também foi variável, sendo que a menor encontrada foi de 17% (St-GERMAIN et al., 2008) e a maior foi de 29% (DIEKEMA et al., 2012). Ainda entre as espécies de *Candida* não-*albicans*, *C. parapsilosis* é a terceira mais frequente e *C. tropicalis* está na quarta posição. *C. krusei*, no geral, aparece como a quinta mais frequente (PAPPAS et al., 2003; LAUPLAND et al., 2005; St-GERMAIN et al., 2008; DIEKEMA et al., 2012).

Predomínio de *C. albicans* entre isolados sanguíneos do gênero *Candida*, também é observado em países Europeus, porém diferenças na distribuição de espécies de *Candida* não-*albicans* podem ser observadas. Semelhantemente ao que ocorre na América do Norte, alguns países Europeus (Ucrânia, Alemanha, Áustria e Suíça) apresentam *C. glabrata* como a mais frequente entre as espécies de *Candida* não-*albicans* (MARCHETTI et al., 2004; DAS et al., 2011; SCHMALRECK et al., 2012). Porém, perfil diferente pode ser observado em países como Espanha e Itália onde há um predomínio de *C. parapsilosis*, sendo que *C. glabrata*, no geral, ocupa a terceira posição (CAGGIANO et al., 2008; CISTERNA et al., 2010; BASSETTI et al., 2011; TORTORANO et al., 2012; FÓRTUN et al., 2012; PÉMAN et al., 2012).

No continente Asiático grande variação pode ser encontrada. Em países como a Índia e a Tunísia já pode ser observado a prevalência de *Candida* não-*albicans* sobre *C. albicans* (SELLAMI et al., 2010; AWASTHI et al., 2011). Segundo estes autores, *C. tropicalis* tem sido a espécie mais frequente, sendo de 37,7% a proporção encontrada por Sellami et al. (2010) e de 71,5% a encontrada por Awasthi et al. (2011). *C. albicans* ocupou a segunda posição nos dois estudos. Já em países como Turquia e Taiwan, *C. albicans* ainda é apontada como a mais prevalente (CHEN et al., 2009; GÜRCÜOĞLU et al., 2010; CHEN et al., 2011) sendo que *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foram observadas com maior frequência entre as *Candida* não-*albicans*.

Variação no padrão etiológico também tem sido observada em estudos realizados na América Latina, em especial, nos hospitais terciários brasileiros. Análise da distribuição de espécies de *Candida* de isolados sanguíneos em hospitais argentinos aponta *C. albicans* como a mais prevalente sendo *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* as mais frequentes entre as *Candida* não-*albicans* (CUENCA-ESTRELLA et al., 2002; CÓRDOBA et al., 2011). Godoy e colaboradores (2003) em trabalho realizado em hospitais da América Latina, incluindo Venezuela, Peru, Argentina e Brasil encontrou perfil semelhante, *C. albicans* foi a

mais frequente sendo *C. tropicalis* a mais representada entre as espécies de *Candida* não-*albicans*, seguida por *C. parapsilosis*.

Quanto aos estudos realizados no Brasil podemos encontrar diferenças etiológicas não apenas em âmbito regional, mas também em âmbito institucional. De modo geral, os estudos brasileiros apontam *C. albicans* como a mais frequentemente isolada de sangue, ficando *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* como as mais prevalentes entre as *Candida* não-*albicans* que ora são relatadas como segunda ora como a terceira mais frequente, conforme a instituição de estudo (AQUINO et al., 2005; COLOMBO et al., 2006; COLOMBO et al., 2007; CHANG et al., 2008; FRANÇA et al., 2008; HINRICHSEN et al., 2008; BONFIETTI et al., 2012). Porém, perfil diferente foi observado por Medrano et al. (2006) e Bruder-Nascimento et al. (2010) em hospitais localizados nas regiões, Central e Nordeste brasileiros, respectivamente. Segundo estes autores, *C. parapsilosis* foi a espécie mais frequente seguida de *C. albicans*. Em trabalho posterior, realizado na região Sul, *C. tropicalis* foi a espécie mais frequente em isolados sanguíneos, seguido de *C. albicans* e *C. parapsilosis* com as mesmas frequências (FURLANETO et al., 2011).

Quanto a *C. glabrata*, no geral, tem sido relatada como a quarta espécie mais frequente em hospitais brasileiros, independente da região de estudo (AQUINO et al., 2005; COLOMBO et al., 2006; COLOMBO et al., 2007; CHANG et al., 2008; FRANÇA et al., 2008; HINRICHSEN et al., 2008; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010; BONFIETTI et al., 2012).

Considerando as espécies do complexo *C. parapsilosis*, estudos realizados até o momento têm revelado baixa frequência de *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* comparativamente a *C. parapsilosis* stricto sensu. Um estudo abrangente que envolveu 29 países representando os seis continentes demonstrou que *C. parapsilosis* stricto sensu representou 91,3% dos isolados, sendo que *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* representaram 1,8% e 0,8%, respectivamente (LOCKHART et al., 2008). No Brasil, em um estudo multicêntrico foi demonstrado que do total dos isolados do complexo *C. parapsilosis* reidentificados, 88% foi representado por *C. parapsilosis* stricto sensu, 9% por *C. orthopsilosis* e 3% por *C. metapsilosis* (GONÇALVES et al., 2010).

São muitas as especulações relativas aos fatores que influenciam a distribuição de espécies do gênero *Candida* ao redor do mundo. Alguns fatores como idade, aumento no uso do fluconazol e até mesmo de antibióticos, assim como alguns fatores de

risco são apontados por estarem relacionados com maiores ou menores frequências de determinadas espécies de *Candida*.

A prevalência de *C. parapsilosis*, entre as espécies de *Candida* não-*albicans*, em amostras de infecção sanguínea de neonatos e crianças, foi observada por diversos autores (PAPPAS et al., 2003; COLOMBO et al., 2006; TRAGIANNIDIS et al., 2012; SPILIOPOULOU et al., 2012). Outros autores relatam ainda, a prevalência de *C. parapsilosis* até mesmo sobre *C. albicans* (MATSUMOTO et al., 2001; ALMIRANTE et al., 2006). Em contrapartida *C. glabrata* vem sendo relacionada com maior frequência à pacientes idosos (MALANI et al., 2010). Revisão apresentada por Tortorano e colaboradores (2006) apontou que com o aumento da idade dos pacientes houve uma redução na porcentagem de *C. parapsilosis* e um aumento paralelo de espécies de *C. glabrata*.

Nos últimos anos, vem aumentando o número de infecções invasivas causadas por espécies de *Candida* não-*albicans* em diversas partes do mundo (revisado por WARNOCK, 2007; NUCCI et al., 2010). O aumento no uso de fluconazol, ocorrido durante a década de 90, é considerado como o provável fator responsável pelo aumento na frequência de *C. glabrata* a partir deste período (TRICK et al., 2002). Lortholary e colaboradores (2011) também observaram mudanças significativas na frequência de espécies de *Candida spp.* quando houve exposição prévia dos pacientes aos antifúngicos fluconazol e caspofungina. Com relação à pré-exposição ao fluconazol o autor relatou um aumento na frequência de *C. glabrata* e *C. krusei* frente à queda de *C. albicans*. Já frente à pré-exposição à caspofungina houve um aumento na frequência de *C. parapsilosis*, bem como de *C. glabrata* e *C. krusei*.

No entanto, Diekema et al. (2012) notou um aumento progressivo de *C. glabrata* apesar de não ter havido aumento nas taxas de resistência desta espécie ao fluconazol. Poikonen e colaboradores (2010) também não encontraram correlação do aumento de *C. glabrata* com o aumento do uso do fluconazol em estudo realizado nos anos de 2004-2007. Os autores, acima mencionados, sugerem que outros fatores, além do uso prévio de fluconazol, podem estar relacionados ao aumento de *C. glabrata*. Alguns autores defendem que a exposição prévia a determinados antibióticos, pode estar mais associada com o desenvolvimento de *C. glabrata*, do que com o uso prévio do fluconazol (LIN et al., 2005).

Em estudo realizado *in vivo* foram demonstradas diferenças significativas na patogenicidade relativa entre as várias espécies de *Candida* envolvidas em infecções humanas (Arendrup et al., 2002). As oito espécies estudadas foram divididas em três grupos de virulência de acordo com a redução da patogenicidade observada: I: *C. albicans* e *C.*

tropicalis, II: *C. glabrata*, *C. lusitaniae* e *C. kefyr* e III: *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*. Os mesmos autores correlacionaram a incidência de espécies com o ranking de patogenicidade encontrado. Porém, como anteriormente mencionado, outros fatores estão relacionados com a distribuição de espécies como a faixa etária, a região geográfica e o tratamento utilizado. Os estudos mostram, cada vez mais, uma inter-relação destes fatores na determinação da distribuição das espécies.

2.4.2 Doenças de Base e Fatores de Risco Associados a Episódios de Candidemia

Alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro como mudanças fisiológicas características da infância (prematuridade) e envelhecimento ou mais frequentemente associadas a doenças degenerativas, neoplásicas, imunodeficiências congênitas ou adquiridas e imunodepressão adquiridas e imunossupressão induzida por atos médicos pode tornar estes micro-organismos comensais em patogênicos (revisado por COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Da mesma forma, fatores que aumentem a colonização intestinal por *Candida*, como o uso de antibiótico, ou que determinem atrofia ou lesão de mucosa intestinal como nutrição parenteral total e quimioterapia, pode potencializar o fenômeno de translocação no tubo gastrointestinal destes micro-organismos, até os capilares mesentéricos, devido ao desequilíbrio da microbiota ou lesão da mucosa gastrointestinal causado (revisado por COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). A patogenicidade destes micro-organismos está diretamente relacionada ao estado imunológico do hospedeiro.

Dentre os fatores de risco, de maior frequência, relatados entre os pacientes diagnosticados com candidemia está o uso de antibiótico, englobando até 97% dos pacientes (FRANÇA et al., 2008). Valores semelhantes foram encontrados por outros autores (AQUINO et al., 2005; ALMIRANTE et al., 2006; HINRICHSEN et al., 2008). A exposição ao uso múltiplo e prolongado de antibióticos de largo espectro, foi apontada com um fator de risco independente para candidemia. A razão para isso é que muitos dos antibióticos levam à depleção da microbiota normal, resultando em crescimento excessivo de fungos (revisado por GIRI; KINDO, 2012).

Outro fator de risco prevalente nos estudos é o uso de cateter venoso central. As taxas de pacientes com candidemia, que utilizam cateter venoso central, variam de 36% a 71,8% (AQUINO et al., 2005; MEDRANO et al., 2006; HINRICHSEN et al., 2008; CHANG

et al., 2008; ORTEGA et al., 2011). Labelle e colaboradores (2008) verificaram que a manutenção do cateter venoso central em pacientes que foram diagnosticados com candidemia caracterizava a presença de fungemia persistente. O mesmo autor apontou a relação da não retirada do processo invasivo com o aumento da mortalidade hospitalar, em pacientes com infecções da corrente sanguínea por *Candida*. Análise realizada nos anos de 2005-2009, por Fórtun e colaboradores (2012), demonstrou a infecção relacionada a cateter, como a principal fonte de candidemia.

Dentre os fatores de risco relacionados à candidemia, ainda podem-se destacar a nutrição parenteral, cirurgia prévia, ventilação mecânica, e longo período de internação (MEDRANO et al., 2006; COLOMBO et al., 2007; CHANG et al., 2008; HINRICHSEN et al., 2008; CISTERNA et al., 2010; CHEN et al., 2011). Os dados apontam a candidemia como uma complicação tardia devido à hospitalização do paciente (COLOMBO et al., 2006).

A utilização de Nutrição Parenteral Total (NPT) foi demonstrada ser um fator de risco independente para candidemia. As espécies de *Candida* podem crescer bem nestas soluções parenterais nutritivas (revisado por GIRI; KINDO, 2012). Da mesma forma, as intervenções cirúrgicas no trato gastrointestinal, também são referidas como um fator de risco, pois a ruptura da mucosa pode causar a semeadura da corrente sanguínea por espécies de *Candida*, que colonizam o intestino (revisado por GIRI; KINDO, 2012).

Levantamento realizado em 11 hospitais terciários localizados em regiões brasileiras distintas revelou que 46% dos pacientes diagnosticados com candidemia, estavam internados em unidade de terapia intensiva (UTI), incluindo a unidade de terapia intensiva neonatal (COLOMBO et al., 2006). Altas taxas de internamento em UTI em pacientes com infecção sanguínea causada por *Candida spp.* têm sido relatadas (CHANG et al., 2008; FRANÇA et al., 2008; HINRICHSEN et al., 2009) demonstrando a importância da colocação das UTIs na epidemiologia de candidemia (COLOMBO et al., 2006).

Estudo multicêntrico realizado por Pfaller e colaboradores (2011) apontou que a frequência de pacientes internados em UTI diagnosticados com infecção sanguínea devido ao gênero *Candida* foi maior na América Latina (56,5%) em comparação com a Europa (44,4%) e América do Norte (39,6%). Os autores observaram, ainda, que os casos de candidemia em pacientes de UTI estão se deslocando para alas distintas no caso de hospitais localizados na América Latina e do Norte. O autor conclui que os resultados indicam que a candidemia não pode mais ser considerada apenas uma infecção relacionada à pacientes de

UTI e, por isso, os esforços para projetar estratégias preventivas e de diagnóstico deve ser expandido para incluir outras populações de risco dentro dos hospitais.

Além dos fatores de risco que parecem estar associados à capacidade destes micro-organismos comensais se tornarem patogênicos, têm-se algumas doenças de base que hoje são tratadas como fatores de risco para o processo infeccioso sanguíneo devido a *Candida* spp.

Entre as doenças de base citadas por diversos autores estão a pulmonar, neurológica, cardíaca, diabetes, prematuridade e doenças gastrointestinais. Também são citados os diversos tipos de câncer como a leucemia, linfoma e neoplasias (AQUINO et al., 2005; LAUPLAND et al., 2005; MEDRANO et al., 2006; COLOMBO et al., 2007; HINRICHSEN et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2012). Além destes fatores, grupos de pacientes muito jovens (< 1 ano) ou idosos (> 75 anos), também são considerados de alto risco (LAUPLAND et al., 2005). Guimarães e colaboradores (2012) ao comparar as taxas de morte de pacientes com candidemia, idosos (≥ 60 anos) e jovens (>14 anos) relatou uma porcentagem de 70% para o primeiro grupo e de 45% para o segundo.

As taxas de mortalidade entre pacientes com candidemia são geralmente altas, acometendo uma média de 53,98% dos pacientes (AQUINO et al., 2005; LAUPLAND et al., 2005; COLOMBO et al., 2007; FRANÇA et al., 2008; HINRICHSEN et al., 2009).

Segundo a literatura existem variações na taxa de mortalidade entre os pacientes acometidos com as diferentes espécies de *Candida*. Pappas e colaboradores (2003) encontraram alta taxa de mortalidade, entre adultos com candidemia, associada à espécie de *C. albicans* (47%) enquanto que as mortes associadas à espécie de *C. parapsilosis* foram menores (24%). Almirante e colaboradores (2006) também encontraram menores taxas de morte relacionadas à *C. parapsilosis* (23%) quando comparado a *C. albicans* (43%). Revisão apresentada por Tortorano e colaboradores (2006) mostra que *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* parecem ser particularmente severas, visto os resultados desfavoráveis apresentados com relação às taxas de morte relacionados a essas espécies, acometendo mais de 40% dos pacientes. Mais recentemente, Ortega e colaboradores (2011) destacaram a alta taxa de morte ocorrida entre pacientes que apresentavam candidemia por *C. krusei* (39%) com relação a *C. parapsilosis* (23%).

2.5 ANTIFÚNGICOS, MECANISMOS DE AÇÃO E RESISTÊNCIA

Em comparação com os antibióticos, o desenvolvimento de agentes antifúngicos tem sido relativamente limitado. O fato pode ser atribuído a vários fatores, incluindo problemas na identificação de um agente eficaz que apresente toxicidade seletiva contra células fúngicas. Por quase 30 anos, o antifúngico anfotericina B, conhecido como causa de significativa nefrotoxicidade, foi à única droga disponível no controle das infecções fúngicas (revisado por GHANNOUM; RICE, 1999).

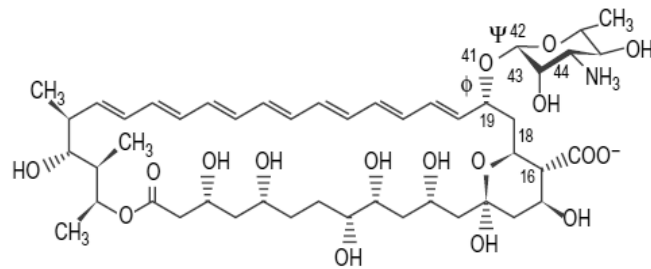
No final dos anos 80 foram aprovadas novas drogas, os imidazóis e triazóis que apresentaram alta eficácia e segurança no tratamento de infecções fúngicas locais e sistêmica. Devido ao alto perfil de segurança, os triazóis, em particular, o fluconazol tornou-se amplamente utilizado (revisado por GHANNOUM; RICE, 1999).

O aumento na disponibilidade de diferentes tipos de antifúngicos tem levado ao aumento no uso dos mesmos, levando a pressão seletiva e resistência emergente (RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2010). Resistência microbiológica pode ser primária (intrínseco) ou secundária (adquirida). A resistência primária é encontrada naturalmente entre certos fungos, sem exposição prévia ao fármaco. Já a resistência secundária se desenvolve entre as linhagens anteriormente suscetíveis, que após a exposição ao agente antifúngico se tornam resistentes. Geralmente é dependente de alteração na expressão gênica (KANAFANI; PERFECT, 2008).

2.5.1 Anfotericina B

O antifúngico anfotericina B (Fig. 2), possui ação fungicida e um espectro amplo de ação, sendo ativa para a maior parte das espécies causadoras de micoses sistêmicas (revisado por GERGOPAPADAKOU, 1998; ALONSO et al., 2005). Atua nas membranas celulares que contem ergosterol, se ligando aos mesmos (revisado por ALONSO et al., 2005). O ergosterol é um importante componente das membranas celulares de fungos sendo necessário para a integridade da célula e crescimento fúngico (revisado por ELEWSKI; OHIO, 1993).

Figura 2 – Estrutura química do antifúngico Anfotericina B.



O complexo formado entre anfotericina B e ergosterol nas membranas fúngicas formará poros através da membrana resultando em uma alteração da permeabilidade, perda de componentes citoplasmáticos vitais e por fim a morte do micro-organismo (revisado por GHANNOUM; RICE, 1999). O interesse clínico na anfotericina B está relacionado ao fato de ainda ser rara a resistência de isolados a esta droga. Porém sua baixa habilidade em diferenciar o ergosterol fúngico do colesterol em células de mamíferos, explicando sua toxicidade renal, limita seu uso (revisado por ALONSO et al., 2005; CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006).

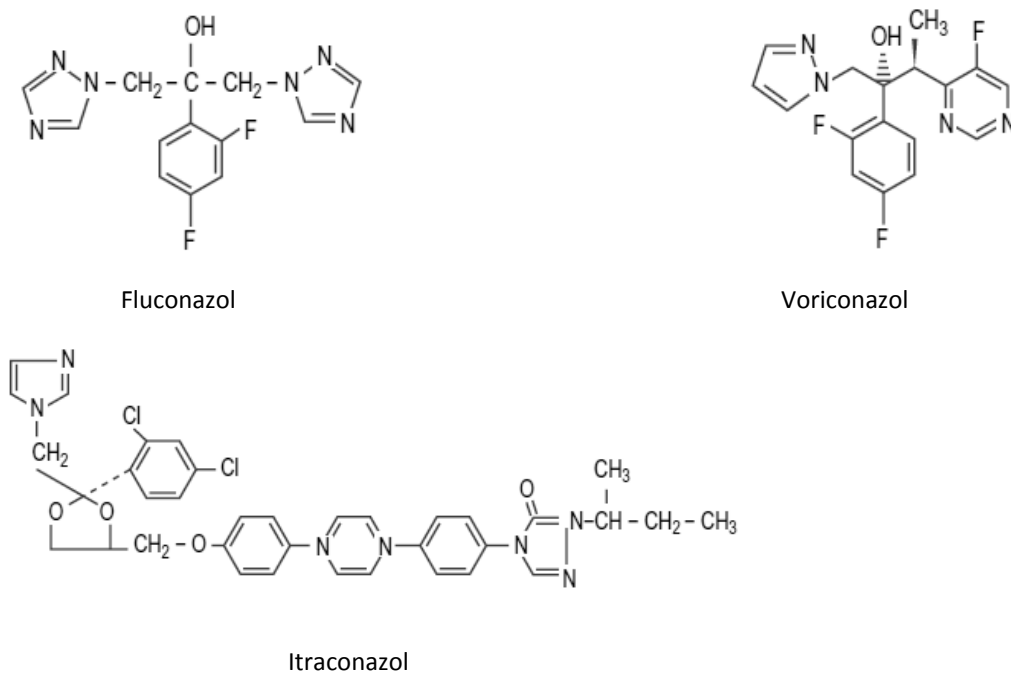
Resistência à polienos acredita ser resultado da produção de uma membrana celular com composição ou quantidade de esteróis alterada. Mutações nos genes ERG 3 (promove decréscimo produção de ergosterol); ERG 11 (gene que codifica a enzima alvo) e no gene ERG 6 (necessário para a função normal da membrana, mas não é essencial para a biossíntese de esterol) podem resultar em resistência ao polieno (GUBBINS; ANAISSIE, 2009).

Embora haja pouca variação temporal ou geográfica na suscetibilidade de espécies de *Candida* à anfotericina B, tem sido observado que tanto *C. glabrata* quanto *C. krusei* exibem diminuição da suscetibilidade a este antifúngico em comparação com *C. albicans* (revisado por PFALLER; DIEKEMA, 2007). Embora *C. lusitaniae* desenvolva resistência clínica a anfotericina B, a mesma parece ser suscetível a este agente, no isolamento inicial de sangue. Assim, a resistência à anfotericina B parece não ser inata nesta espécie, mas desenvolve secundariamente durante o tratamento (revisado por PFALLER; DIEKEMA, 2007).

2.5.2 Antifúngicos Azólicos

Este grupo de fármacos também tem sido historicamente importante, tanto no tratamento de micoses superficiais como profundas. Os antifúngicos azólicos (Fig. 3), mais especificamente o fluconazol e itraconazol surgiram na década de 90. Posteriormente, 2002, o voriconazol também entrou no mercado de antifúngicos (revisado por ALONSO et al., 2005; e SHALINI et al., 2011). Comparado aos imidazóis (cetoconazol, miconazol e clotrimazol), os triazóis são menos susceptíveis a degradação metabólica, apresentam maior especificidade, maior potencial e maior espectro de ação (revisado por SHALINI et al., 2011).

Figura 3 – Estrutura química dos antifúngicos azólicos fluconazol, voriconazol e itraconazol.



Os antifúngicos azólicos são fungistáticos com espectro de ação amplo, sendo o mecanismo de ação baseado na via de biossíntese do ergosterol (revisado GERGOPAPADAKOU, 1998; CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006). A droga inibe a enzima lanosterol 14-alfa esterol-dimetilase dependente do citocromo P-450, envolvidas na conversão do lanosterol para ergosterol. Desta forma, há uma diminuição do ergosterol e acúmulo de precursores, resultando em uma membrana plasmática com estrutura e função alteradas (revisado por SAAG; DISMUKES, 1988; GHANNOUM; RICE, 1999). Os azóis diferem nas

suas afinidades para com seu alvo, o que pode explicar as diferenças nos seus espectros de atividade (KANAFANI; PERFECT, 2008).

A síntese do colesterol em mamíferos também é bloqueada pelos azóis na etapa 14-alfa demetilação, porém as doses requeridas para afetar o mesmo nível de inibição são muito maiores do que aquelas requeridas para o fungo (revisado por GHANNOUM; RICE, 1999).

Várias linhas de estudo apontam que a modificação da qualidade ou quantidade de 14-alfa demetilase é responsável pela resistência de isolados aos antifúngicos azólicos (revisado por GHANNOUM; RICE, 1999). Mutações pontuais no gene ERG11, que está relacionado com a codificação da enzima alvo, promove alterações no alvo. Estas alterações resultam em uma afinidade reduzida ou até mesmo uma incapacidade de ligação dos azóis. Este mecanismo pode ser agravado se houver super-expressão da enzima alvo alterada (PFALLER, 2012).

Revisão apresentada por Kanafani e Perfect (2008) revela que a exposição aos compostos azólicos promove o acúmulo do produto tóxico, 14 α -metil-3,6-diol, promovendo a interrupção do crescimento celular. Porém uma mutação no gene ERG 3, impede a formação destes produtos tóxicos a partir do precursor 14 α - metilfecosterol. O mesmo autor relata, ainda, que a substituição do ergosterol por este último produto origina membranas funcionais e anula a ação dos azóis na via biossintética do ergosterol. Alguns autores defendem que a inibição fúngica está mais relacionada com o acúmulo de intermediários tóxicos do que com a ausência do ergosterol na membrana (revisado por CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006).

Genes envolvidos na expressão de bombas de efluxo também parecem estar relacionados à resistência aos azóis (revisado por GHANNOUM; RICE, 1999). O desenvolvimento de bombas de efluxo ativas resulta em concentrações diminuídas de droga no local de ação. As bombas de efluxo nas espécies de *Candida* são codificadas por duas famílias de genes: as *CDR* e *MDR*. Os genes *CDR* conferem resistência a quase todos os azóis, enquanto que as bombas de efluxo codificadas pelos genes *MDR* tem um espectro mais restrito, específico para fluconazol (KANAFANI; PERFECT, 2008).

Mais de um mecanismo de resistência pode estar associado com um determinado isolado, e as alterações que conduzem à resistência podem ocorrer em sequência e pode ter efeitos aditivos ou causar resistência cruzada (PFALLER, 2012).

Revisão apresentada por Pfaller e Diekema (2007) aponta que da mesma forma que a frequência de isolados de *C. glabrata* é variável de acordo com a região geográfica, a frequência de resistência ao fluconazol também varia. Nas regiões onde a *C. glabrata* é menos comum (Ásia-Pacífico e América Latina), os isolados são menos resistentes ao fluconazol (10,6% para 13,2%) enquanto que na América do Norte, a região com a maior frequência de *C. glabrata*, mostra taxa mais elevada de resistência (18,0%).

Assim como a frequência de isolamento de *C. rugosa* tem aumentado nos últimos anos, a sua resistência ao fluconazol também aumentou de 30% em 2001 para 61% em 2003. *C. rugosa* também apresentou um aumento nas taxas de resistência ao voriconazol de 3,1% em 2001 para 38,0% em 2002 e 2003 (revisado por PFALLER; DIEKEMA, 2007).

Segundo Gubbins e Anaissie (2009) o antifúngico voriconazol é um agente ativo contra todas as espécies de *Candida*, incluindo as resistentes ao fluconazol, *C. glabrata* e *C. krusei*. Favalessa e colaboradores (2010) verificaram que o antifúngico voriconazol apresentou boa atividade *in vitro* contra *C. krusei*. Segundo estes autores, não foram detectados isolados resistentes, mostrando ação efetiva a isolados intrinsecamente resistentes ao fluconazol. Perfil semelhante foi observado por Uzun et al. (2000) onde valores de MICs frente ao voriconazol foram baixos para isolados de *C. krusei*.

Em trabalhos recentes onde foram adotados os novos pontos de corte clínicos para o fluconazol foi relatado um aumento moderado de isolados de *C. parapsilosis* resistentes a esta droga (CANTÓN et al., 2011; PFALLER et al., 2011; PEMÁN et al., 2012). Segundo Pfaller e colaboradores (2011) é necessário cuidado na escolha dos agentes antifúngicos, visto que a Sociedade de Doenças Infecciosas da America (IDSA) recomenda que os pacientes com candidíase invasiva por *C. parapsilosis* deve ser tratado com formações lipídicas de Anfotericina B ou fluconazol.

Com exceção de *C. glabrata*, o itraconazol apresenta atividade de moderada a alta contra a maioria das espécies de *Candida*, suscetíveis e resistentes ao fluconazol (revisado por GUBBINS; ANAISSIE, 2009).

A resistência cruzada entre fluconazol e os triazóis voriconazol, posaconazol, e itraconazol está bem descrita entre isolados de *C. glabrata*, e está associada com a expressão aumentada dos genes CgCDR1 e CgCDR2, que codificam as bombas de efluxo CDR (revisado por PFALLER; DIEKEMA, 2007). Em contraste ao que ocorre com *C. glabrata*, a resistência cruzada entre fluconazol e voriconazol, *in vitro*, é incomum para *C.*

krusei. O voriconazol se liga de forma mais eficaz ao alvo (enzima 14-alfa esterol-dimetilase) do que o fluconazol para esta espécie (revisado por PFALLER; DIEKEMA, 2007).

2.6 FLAVONOIDES

Resistência aos antimicrobianos tem se tornado um problema global, levando a necessidade de busca de drogas eficazes. Modificações estruturais de antimicrobianos já existentes têm provado ser uma forma efetiva de estender o tempo de vida dos mesmos, como ocorrido com os antifúngicos azólicos. Porém o espectro de alternativas vem diminuindo, e uma opção seria o uso de produtos naturais que têm sido fonte particularmente rica de agentes anti-infecciosos (revisado por CUSHNIE; LAMB, 2005).

Neste contexto, os flavonoides, produtos naturais de origem vegetal, vêm se tornando objeto de pesquisas médicas, decorrente de suas diferentes propriedades. Ensaios biológicos revelam que possuem atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, antialérgica, antitumoral, anti-hipertensivo e inibição enzimática (revisado por CUSHNIE; LAMB, 2005; MACHADO et al., 2008).

Os flavonoides representam um dos grupos de maior diversidade entre os produtos de origem vegetal e estão amplamente distribuídos, sendo as angiospermas, o grupo que apresenta a maior abundância e diversidade estrutural de flavonoides (ZUANAZZI et al., 2004). São formados por compostos de baixo peso molecular que comportam um esqueleto comum (C6-C3-C6), que consiste de três anéis sendo dois de benzeno e um central heterocíclico (Fig. 4) (revisado por MARTINEZ-FLÓREZ et al., 2002; CUSHNIE; LAMB, 2005). As atividades bioquímicas dos flavonoides e de seus metabólitos dependem de sua estrutura química, que podem variar com substituições incluindo hidrogenação, hidroxilações, metilações, glicosilações entre outros (revisado por MACHADO et al., 2008).

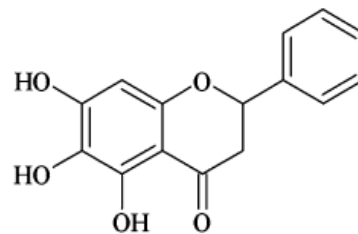
2.6.1 Baicaleína

Baicaleína (Fig. 4) é um flavonoide derivado da raiz de *Scutellaria baicalensis*, uma tradicional erva medicinal chinesa, que tem sido utilizada há centenas de anos (revisado por HU et al., 2005; CUSHNIE; LAMB, 2005). A Baicaleína tem sido relatada por ter várias propriedades benéficas, tais como antivirais (CHEN et al, 2011; JOHARI et al., 2012; ZANDI et al, 2012), antibacteriana (CHAN et al., 2011) e antifúngica, contra espécies

do gênero *Candida* (CAO et al., 2008; HUANG et al., 2008; DAI et al., 2009; KANG et al., 2010; FU et al., 2011).

O primeiro trabalho a relatar atividade antifúngica da baicaleína contra o gênero *Candida* foi realizado por Cao e colaboradores (2008). Os autores analisaram o efeito da baicaleína nas formações de biofilme por *C. albicans* e encontraram inibições na formação dos mesmos, sendo superiores a 70%. Imagens de microscopia eletrônica demonstraram que o tratamento com baicaleína inibiu a formação de hifas verdadeiras, a principal estrutura observada em biofilmes, contribuindo para a formação de uma arquitetura menos estruturada.

Figura 4 – Estrutura química da baicaleína.



Ainda no mesmo ano, Huang e colaboradores (2008) descreveram a ação da baicaleína em células planctônicas, assim como, a ação sinérgica entre o fluconazol e baicaleína contra 30 isolados clínicos de *C. albicans* resistentes ao fluconazol. Tanto o fluconazol quanto a baicaleína mostraram baixa atividade antifúngica quando testados sozinhos, porém a interação dos mesmos promoveu uma acentuada diminuição nos valores de CIM (Concentração Inibitória Mínima). O mesmo autor demonstrou, ainda, que a baicaleína reduziu a extrusão da droga pelas células de levedura por meio da inibição de bombas de efluxo. Mais recentemente, a investigação de atividades antibacterianas da baicaleína, em associação com vários antibióticos contra cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes, demonstrou que a baicaleína inverteu significativamente a resistência ao antibiótico ciprofloxacina, possivelmente pela inibição de bombas de efluxo (CHAN et al., 2011).

O primeiro relato de que a baicaleína poderia induzir a apoptose em *C. albicans* foi feito por Dai e colaboradores (2009). Em trabalho posterior foi demonstrado que o potencial de induzir a apoptose, pelo flavonoide baicaleína, foi potencializado ao ser combinado com o antifúngico anfotericina B, indicando sinergismo dos dois compostos na

indução da apoptose em *C. albicans*. Sinergismo também foi observado no teste de suscetibilidade fúngica (FU et al., 2011). Hirunuma e colaboradores (2011) observaram que em resposta ao dano mecânico, raízes da planta *Scutellaria baicalensis* (fonte baicaleína) sofrem morte celular em 24 horas e curiosamente a baicaleína foi identificada como sendo o fator de regulação da apoptose nas raízes danificadas desta planta. O flavonoide, após o dano celular, é imediatamente translocado para o núcleo, que conduz a apoptose.

Além da verificação do fenômeno de apoptose propriamente dita Dai et al. (2009) e Fu et al. (2010) verificaram alguns mecanismos intimamente relacionados a apoptose como a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Porém Kang e colaboradores (2010), os primeiros a analisarem o efeito da baicaleína em espécies de *Candida* não-*albicans*, ao avaliar a atividade antifúngica do flavonoide contra a espécie *C. krusei*, concluíram que os mecanismos responsáveis por levar a morte da levedura diferem daqueles ocorridos na espécie *C. albicans*. Mecanismos sinalizadores da apoptose, como a produção de espécies reativas de oxigênio e a fragmentação do DNA não foram observadas para *C. krusei*, assim como ocorrido para *C. albicans*. Porém a baicaleína, no teste de suscetibilidade fúngica, apresentou maior potencial antifúngico contra a espécie de *C. krusei* do que para a espécie de *C. albicans*.

Serpa e colaboradores (2012) foram os primeiros autores que avaliaram a atividade antifúngica, *in vitro*, da baicaleína contra *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Entre as espécies de *Candida* analisadas, houve grande variação na sensibilidade, sendo que, os isolados de *C. tropicalis* foram os menos suscetíveis, com relação, aos de *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Efeito sinérgico entre a baicaleína e o fluconazol foi observado para *C. parapsilosis*. O trabalho também reportou a alta perda de viabilidade celular, frente à baicaleína, nas três espécies estudadas.

REFERÊNCIAS

- ALMIRANTE, B.; RODRÍGUEZ D.; CUENCA-ESTRELLA, M.; ALMELA, M.; SANCHEZ, F.; AYATS, J.; ALONSO-TORRES, C.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; PAHISSA, A. Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: Case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1681-1685, 2006.
- ALONSO, R. F.; GARCIA, E. G.; GARCIA, J. F.; PIORNO, J. C. P. Fármacos antifúngicos. Situación actual y pautas para sua administración. **Clinical and Translational Oncology**, v. 7, n. 9, p. 377-388, 2005.
- AQUINO, V. R.; LUNARDI, L. W.; GOLDANI, L. Z.; BARTH, A. L. Prevalence, Susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in Southern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 5, p. 411-418, 2005.
- ARENDRUP, M.; HORN, T.; FRIMODT-MOLLER, N. In vivo pathogenicity of eight medically relevant *Candida* species in an animal model. **Infection**, v. 30, n. 5, p. 286-291, 2002.
- AWASTHI, A. K.; JAIN, A.; AWASTHI, S.; AMBAST, A.; SINGH, K.; MISHRA, V. Epidemiology and microbiology of nosocomial pediatric candidemia at a Northern Indian tertiary care hospital. **Mycopathologia**, v. 172, n. 4, p. 269-277, 2011.
- BASSETTI, M.; RIGHI, E.; COSTA, A.; FASCE, R.; MOLINARI, M. P.; ROSSO, R.; PALLAVICINI, F. B.; VISCOLI, C. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. **BMC Infectious Diseases**, v. 6, n. 21, 2006.
- BASSETTI, M.; TARAMASSO, L.; NICCO, E.; MOLINARI, M. P.; MUSSAP, M.; VISCOLI, C. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility and outcome of nosocomial candidemia in a Tertiary Care Hospital in Italy. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24198, 2011.
- BAUMGARTNER, C.; FREYDIERE, A.; GILLE, Y. Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using Albicans ID and CHROMagar *Candida* plates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 454-456, 1996.
- BONASSOLI, L. A.; BERTOLI, M.; SVIDZINSKI, T. I. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. **The Journal of Hospital Infection**, v. 59, n. 2, p. 159-162, 2005.
- BONFIETTI, L. X.; SZESZS, M. W.; CHANG, M. R.; MARTINS, M. A.; PUKINSKAS, S. R. B. S.; NUNES, M. O.; PEREIRA, G. H.; PANIAGO, A. M. M.; PURISCO, S. U.; MELHEM, M. S. C. Ten-year study of species distribution and antifungal susceptibilities of *Candida* bloodstream isolates at a Brazilian Tertiary Hospital, **Mycopathologia**, [Epub ahead of print], 2012.

BRITO, L. R.; GUIMARÃES, T.; NUCCI, M.; ROSAS, R. C.; ALMEIDA, L. P.; MATTA, D. A.; COLOMBO, A. L. Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *Candida parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. **Medical Mycology**, v. 44, n. 3, p. 261-266, 2006.

BRUDER-NASCIMENTO, A.; CAMARGO C. H.; SUGIZAKI, M. F.; SADATSUNE, T.; MONTELLI, A. C.; MONDELLI, A. L.; BAGAGLI, E. Species distribution and susceptibility profile of *Candida* species in a Brazilian public tertiary hospital, **Research Notes**, v. 3, n. 1, p. 1-5, 2010.

CAGGIANO, G.; IATTA, R.; LANEVE, A.; MANCA, F.; MONTAGNA, M. T. Observational study on candidaemia at a university hospital in southern Italy from 1998 to 2004. **Mycoses**, v. 51, n. 2, p. 123-128, 2008.

CANTÓN, E.; PEMÁN, J.; QUINDÓS, G.; ERASO, E.; MIRANDA-ZAPICO, I.; ÁLVAREZ, M.; MERINO, P.; CAMPOS-HERRERO, I.; MARCO, F.; DE LA PEDROSA, E. G. G.; YAGÜE, G.; GUNA, R.; RUBIO, C.; MIRANDA, C.; PAZOS, C.; VELASCO, D. Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 12, p. 5590-5596, 2011.

CAO, Y. Y.; DAI, B.; WANG, Y.; HUANG, S.; XU, Y.; CAO, Y.; GAO, P.; ZHU, Z. Y.; JIANG, Y. Y. In vitro activity of baicalein against *Candida albicans* biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, n. 1, p. 73-77, 2008.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; GIUSIANO, G.; EZKURRA, P. A.; QUINDÓS, G. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. **Revista Espanola de Quimioterapia**, v. 19, n. 2, p. 130-139, 2006.

CHAI, L. Y.; DENNING, D. W.; WARN, P. *Candida tropicalis* in human disease. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 282-298, 2010.

CHAN, B. C.; IP, M.; LAU, C. B.; LUI, S. L.; JOLIVALT, C.; GANEM-ELBAZ, C.; LITAUDON, M.; REINER, N. E.; GONG, H.; SEE, R. H.; FUNG, K. P.; LEUNG, P. C. Synergistic effects of baicalein with ciprofloxacin against NorA over-expressed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and inhibition of MRSA pyruvate kinase. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 767-773, 2011.

CHANG, M. R.; CORREIA, F. P.; COSTA, L. C.; XAVIER, P. C.; PALHARES, D. B.; TAIRA, D. L.; PANIAGO, A. M. M.; PONTES, E. R. J.; MACHADO, V. E. *Candida* bloodstream infection: data from a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo**, v. 50, n. 5, p. 265-268, 2008.

CHEN, L.; DOU, J.; SU, Z.; ZHOU, H.; WANG, H.; ZHOU, W.; GUO, Q.; ZHOU, C. Synergistic activity of baicalein with ribavirin against influenza A (H1N1) virus infections in cell culture and in mice. **Antiviral Research**, v. 91, n. 3, p. 314-320, 2011.

CHEN, L. Y.; LIAO, S. Y.; KUO, S. C.; CHEN, S. J.; CHEN, F. D.; WANG, F. D.; YANG, S. P.; FUNG, C. P. Changes in the incidence of candidaemia during 2000-2008 in a tertiary medical centre in northern Taiwan. **Journal of Hospital Infection**, v. 78, n. 1, p. 50-53, 2009.

- CHEN, P. L.; LO, H. J.; WU, C. J.; LEE, H. C.; CHANG, C. M.; LEE, N. Y.; WANG, A. H.; LIN, W. L.; KO, N. Y.; LEE, C. C.; KO, W. C. Species distribution and antifungal susceptibility of blood *Candida* isolates at a tertiary hospital in southern Taiwan, 1999-2006. **Mycoses**, v. 54, n. 4, p. e17-e23, 2011.
- CISTERNA, R.; EZPELETA, G.; TELLERIA, O.; GUINEA, J.; REGUEIRO, B.; GARCIA-RODRÍGUEZ, J.; ESPERALBA, J. Nationwide sentinel surveillance of bloodstream *Candida* infections in 40 tertiary care hospitals in Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 11, p. 4200-4206, 2010.
- CLARK, T. A.; SLAVINSKI, S. A.; MORGAN, J.; LOTT, T.; ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; BRANDT, M. E.; WEBB, R. M.; CURRIER, M.; FLOWERS, R. H.; FRIDKIN, S. K.; HAJJEH, R. A. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4468-4472, 2004.
- COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.
- COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON SKAGGES, B.; MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816-2823, 2006.
- COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L. R. B. F.; MONFARDINI, L. P. A.; CUNHA, A. K. B.; RADY, P.; ALVES, T.; ROSAS, R. C. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 28, n. 5, p. 570-576, 2007.
- CÓRDOBA, S.; VIVOT, W.; BOSCO-BORGEAT, M. E.; TAVERNA, C.; SZUSZ, W.; MURISENGO, O.; ISLA, G.; DAVEL, G. Species distribution and susceptibility profile of yeasts isolated from blood cultures: results of a multicenter active laboratory-based surveillance study in Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 43, n. 3, p. 176-185, 2011.
- CUENCA-ESTRELLA, M.; RODERO, L.; GARCÍA-EFFRÓN, G.; RODRIGUEZ TUDELA, J. L. Antifungal susceptibilities of *Candida* spp. isolated from blood in Spain and Argentina, 1996-1999. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 981-987, 2002.
- CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **Antimicrobial Agents**, v. 26, n. 5, p. 343-356, 2005.
- DAI, B.; CAO, Y. Y.; HUANG, S.; XU, Y.; GAO, P.; WANG, Y.; JIANG, Y. Baicalein induces programmed cell death in *Candida albicans*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 8, p. 803-809, 2009.
- DAS, I.; NIGHTINGALE, P.; PATEL, M.; JUMAA, P. Epidemiology, clinical characteristics, and outcome of candidemia: experience in a tertiary referral center in the UK. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 11, p. e759-e763, 2011.

- DIEKEMA, D.; ARBEFEVILLE, S.; BOYKEN, L.; KROEGER, J.; PFALLER, M. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 1, p. 45-48, 2012.
- ELLEPOLA, A. N.; MORRISON, C. J. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. **The Journal of Microbiology**, v. 43, n. S, p. 65-84, 2005.
- ELEWSKI, B. E.; OHIO, C. M. D. Mechanisms of action of systemic antifungal agents, **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 28, n. 5, p. S28-S34, 1993.
- FAVALESSA, O. C.; MARTINS, M. A.; HAHN, R. C. Mycological aspects and susceptibility in vitro the yeast of the genus *Candida* from HIV-positive patients in the State of Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 6, p. 673-677, 2010.
- FRANÇA, J. C. B.; RIBEIRO, C. E. L.; QUEIROZ-TELLES, F. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 1, p. 23-28, 2008.
- FORTÚN, J.; MARTÍN-DÁVILA, P.; GÓMEZ-GARCÍA DE LA PEDROSA, E.; PINTADO, V.; COBO, J.; FRESCO, G.; MEIJE, Y.; ROS, L.; ALVAREZ, M. E.; LUENGO, J.; AGUNDEZ, M.; BELSO, A.; SÁNCHEZ-SOUSA, A.; LOZA, E.; MORENO, S. Emerging trends in candidemia: a higher incidence but a similar outcome. **The Journal of Infection**, v. 65, n. 1, p. 64-70, 2012.
- FU, Z.; LU, H.; ZHU, Z. Y.; YAN, L.; JIANG, Y. Y.; CAO, Y. Y. Combination of baicalein and amphotericin B accelerates *Candida albicans* apoptosis. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 2, p. 214-218, 2011.
- FURLANETO, M. C.; ROTA, J. F.; QUESADA, R. M. B.; FURLANETO-MAIA, L.; RODRIGUES, R.; ODA, S.; OLIVEIRA, M. T.; SERPA, R.; FRANÇA, E. J. G. Species distribution and *in vitro* fluconazole susceptibility of clinical *Candida* isolates in a Brazilian tertiary-care hospital over a 3-year period. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 595-599, 2011.
- GEORGOPAPADAKOU, N. H. Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, n. 5, p. 547-557, 1998.
- GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 501-517, 1999.
- GIRI, S.; KINDO, A. J. A review of *Candida* species causing blood stream infection. **India Journal of Medical Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 270-278, 2012.
- GODOY, P.; TIRABOSCHI, I. N.; SEVERO, L. C.; BUSTAMANTE, B.; CALVO, B.; ALMEIDA, L. P.; MATTA, D. A.; COLOMBO, A. L. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin America Hospitals. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 401-405, 2003.

GONÇALVES, S. S.; AMORIM, C. S.; NUCCI, M.; PADOVAN, A. C.; BRIONES, M. R.; MELO, A. S.; COLOMBO, A. L. Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *Candida parapsilosis* species complex: results from a nationwide surveillance of candidaemia in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 7, p. 885-887, 2010.

GUBBINS, P. O.; ANAISSIE, E. J. Antifungal therapy. In: ANAISSIE, E. J.; MCGINNIS, M. R.; PFALLER, M. A. **Clinical Mycology**. [S. l.]: Elsevier Health Sciences, 2009. p. 165-168.

GUIMARÃES, T.; NUCCI, M.; MENDONÇA, J. S.; MARTINEZ, R.; BRITO, L. R.; SILVA, N.; MORETTI, M. L.; SALOMÃO, R.; COLOMBO, A. L. Epidemiology and predictors of a poor outcome in elderly patients with candidemia. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. e442-e447, 2012.

GÜRCÜOĞLU, E.; ENER, B.; AKALIN, H.; SINIRTAŞ, M.; EVCI, C.; AKÇAĞLAR, S.; YILMAZ, E.; HEPER, Y. Epidemiology of nosocomial candidaemia in a university hospital: a 12-year study. **Epidemiology and Infection**, v. 138, n. 9, p. 1328-1335, 2010.

HASSAN, I.; POWELL, G.; SIDHU, M.; HART, W. M.; DENNING, D. W. Excess mortality, length of stay and cost attributable to candidaemia. **Journal of Infection**, v. 59, n. 5, p. 360-365, 2009.

HAYNES, K. Virulence in *Candida* species. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 12, p. 591-595, 2001.

HINRICHSEN, S. L.; FALCÃO, E.; VILELLA, T. A. S.; RÊGO, L.; LIRA, C.; ALMEIDA, L.; MARTINS, M.; ARAÚJO, C.; DUARTE, M.; LOPES, G. *Candida* isolates in Tertiary Hospitals in Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 325-328, 2009.

HIRUNUMA, M.; SHOYAMA, Y.; SASAKI, K.; SAKAMOTO, S.; TAURA, F.; SHOYAMA, Y.; TANAKA, H.; MORIMOTO, S. Flavone-catalyzed apoptosis in *Scutellaria baicalensis*. **Phytochemistry**, v. 72, n. 8, p. 752-760, 2011.

HU, Z.; YANG, X.; HO, P. C. L.; CHAN, S. Y.; HENG, P. W. S.; CHAN, E.; DUAN, W.; KOH, H. L.; ZHOU, S. Herb-drug interactions. **Drugs**, v. 65, n. 9, p. 1239-1282, 2005.

HUANG, S.; CAO, Y. Y.; DAI, B. D.; SUN, X. R.; ZHU, Z. Y.; CAO, Y. B.; WANG, Y.; GAO, P. H.; JIANG, Y. Y. In vitro synergism of fluconazole and baicalein against clinical isolates of *Candida albicans* resistant to fluconazole. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 12, p. 2234-2236, 2008.

JOHARI, J.; KIANMEHR, A.; MUSTAFA, M. R.; ABUBAKAR, S.; ZANDI, K. Antiviral activity of baicalein and quercetin against the japanese encephalitis virus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 12, p. 16785-16795, 2012.

KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 1, p. 1020-128, 2008.

KANG, K.; FONG, W.; TSANG, P. W. Antifungal activity of baicalein against *Candida krusei* does not involve apoptosis. **Mycopathologia**, v. 170, n. 6, p. 391-396, 2010.

- KETT, D. H.; AZOULAY, E.; ECHEVERRIA, P. M.; VINCENT, J. L. Extended prevalence of infection in the ICU study (EPIC II) group of investigators. *Candida* bloodstream infections in intensive care units: analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study. **Critical Care Medicine**, v. 39, n. 4, p. 665-670, 2011.
- LABELLE, A. J.; MICEK, S. T.; ROUBINIAN, N.; KOLLEF, M. H. Treatment-related risk factors for hospital mortality in *Candida* bloodstream infections. **Critical Care Medicine**, v. 36, n. 11, p. 2967-2972, 2008.
- LAUPLAND, K. B.; GREGSON, D. B.; CHURCH, D. L.; ROSS, T.; ELSAYED, S. Invasive *Candida* species infections: a 5 year population-based assessment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 3, p. 532-537, 2005.
- LI, Y. L.; LEAW, S. N.; CHEN, J. H.; CHANG, H. C.; CHANG, T. C. Rapid identification of yeasts commonly found in positive blood cultures by amplification of the internal transcribed spacer regions 1 and 2. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 693-696, 2003.
- LIN, M. Y.; CARMELI, Y.; ZUMSTEG, J.; FLORES, E. L.; TOLENTINO, J.; SREERAMOJU, P.; WEBER, S. G. Prior Antimicrobial therapy and risk for hospital-acquired *Candida glabrata* and *Candida krusei* fungemia: a case-case-control study. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4555-4560, 2005.
- LOCKHART, S. R.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 8, p. 2659-2664, 2008.
- LORTHOLARY, O.; DESNOS-OLLIVIER, M.; SITBON, K.; FONTANET, A.; BRETAGNE, S.; DROMER, F. French Mycosis Study Group. Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2,441 patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 532-538, 2011.
- LUO, G.; MITCHELL, T. G. Rapid identification of pathogenic fungi directly from culture by using multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 2860-2865, 2002.
- MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. P.; OLIVEIRA, T. T. Flavonoids and potential therapeutic. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, n. ½, p. 33-39, 2008.
- MALANI, A. N.; PSARROS, G.; MALANI, P. N.; KAUFFMAN, C. A. Is age a risk factor for *Candida glabrata* colonization. **Mycoses**, v. 54, n. 6, p. 531-537, 2010.
- MARCHETTI, O.; BILLE, J.; FLUCKIGER, U.; EGGIMANN, P.; RUEF, C.; GARBINO, J.; CALANDRA, T.; GLAUSER, M. P.; TÄUBER, M. G.; PITTET, D. Fungal infection network of Switzerland. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 3, p. 311-320, 2004.

- MARRA, A. R.; CAMARGO, L. F.; PIGNATARI, A. C.; SUKIENNIK, T.; BEHAR, P. R.; MEDEIROS, E. A.; RIBEIRO, J.; GIRÃO, E.; CORREA, L.; GUERRA, C.; BRITES, C.; PEREIRA, C. A.; CARNEIRO, I.; REIS, M.; DE SOUZA, M. A.; TRANCHESI, R.; BARATA, C. U.; EDMOND, M. B. Brazilian SCOPE Study Group. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian Hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1866-1871, 2011.
- MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, v. 17, n. 6, p. 271-278, 2002.
- MATSUMOTO, F. E.; GANDRA, R. F.; RUIZ, L. S.; AULER, M. E.; MARQUES, S. A. V.; PIRES, M. F. C.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R. Yeasts isolated from blood and catheter in children from a Public Hospital of São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v. 154, n. 2, p. 63-69, 2001.
- MEDRANO, D. J. A.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F. G.; RABENHORST, S. H. B.; SIDRIM, J. J. C. Candidemia in a Brazilian hospital: The importance of *Candida parapsilosis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo**, v. 48, n. 1, p. 17-20, 2006.
- NEGRI, M.; SILVA, S.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R. Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious**, v. 31, n. 7, p. 1399-1412, 2012.
- NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBÓN, A. M.; RESTREPO, A.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clinical Infectious Disease**, v. 51, n. 5, p. 561-570, 2010.
- ODDS, F. C.; BERNAERTS, R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 8, p. 1923-1929, 1994.
- ORTEGA, M.; MARCO, F.; SORIANO, A.; ALMELA, M.; MARTÍNEZ, J. A.; LÓPEZ, J.; PITART, C.; MENSA, J. *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. **Journal of Hospital Infection**, v. 77, n. 2, p. 157-161, 2011.
- PAPPAS, P. G.; REX, J. H.; LEE, J.; HAMILL, R. J.; LARSEN, R. A.; POWDERLY, W.; KAUFFMAN, C. A.; HYSLOP, N.; MANGINO, J. E.; CHAPMAN, S.; HOROWITZ, H. W.; EDWARDS, J. E.; DISMUKES, W. E.; NIAID Mycoses Study Group. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, n. 5, p. 634-643, 2003.

PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; QUINDÓS, G.; ERASO, E.; ALCOBA, J.; GUINEA, J.; MERINO, P.; RUIZ-PÉREZ-DE-PIPAON, M. T.; PÉREZ-DEL-MOLINO, L.; LINARES-SICILIA, M. J.; MARCO, F.; GARCÍA, J.; ROSELLÓ, E. M.; GÓMEZ-G-DE-LA-PEDROSA, E.; BORRELL, N.; PORRAS, A.; YAGÜE, G. Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 5, p. 1181-1187, 2012.

PFALLER, M. A.; HOUSTON, A.; COFFMANN, S. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 58-61, 1996.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133-163, 2007.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; MOET, G. J.; JONES, R. N.; CASTANHEIRA, M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 1, p. 65-69, 2011.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 123, n. 1A, p. s3-s13, 2012.

PIERCE, B. A. Tecnologia do DNA Recombinante. In: PIERCE, B. A. **Genética: Um enfoque conceitual**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 490-529.

PLAYFORD, E. G.; NIMMO, G. R.; TILSE, M.; SORRELL, T. C. Increasing incidence of candidaemia: long-term epidemiological trends Queensland, Australia, 1999-2008. **The Journal of Hospital Infection**, v. 76, n. 1, p. 46-51, 2010.

POIKONEN, E.; LYYTIKÄINEN, O.; ANTTILA, V. J.; KOIVULA, I.; LUMIO, J.; KOTILAINEN, P.; SYRJÄLÄ, H.; RUUTU, P. Secular trend in candidemia and the use of fluconazole in Finland, 2004-2007. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, n. 312, p. 1-7, 2010.

RIBEIRO, E. L.; GUIMARÃES, R. I.; INÁCIO, M. C. C.; FERREIRA, W. M.; CARDOSO, C. G.; DIAS, S. M. S.; NAVES, P. L. F. Aspectos das leveduras de *Candida* vinculadas as infecções nosocomiais. **NewsLab**, ed. 64, p. 106-128, 2004.

RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; ARENDRUP, M. C.; CUENCA-ESTRELLA, M.; DONNELLY, J. P.; LASS-FLORL, C. Eucast breakpoints for antifungals. **Drug News & Perspectives**, v. 23, n. 2, p. 93-97, 2010.

SAAG, M. S.; DISMUKES, W. E. Azole Antifungal agents: emphasis on new triazoles. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 32, n. 1, p. 1-8, 1988.

SCHMALRECK, A. F.; WILLINGER, B.; HAASE, G.; BLUM, G.; LASS-FLÖRL, C.; FEGELER, W.; BECKER, K. antifungal susceptibility testing-afst study group. species and susceptibility distribution of 1062 clinical yeast isolates to azoles, echinocandins, flucytosine and amphotericin B from a multi-centre study. **Mycoses**, v. 55, n. 3, p. e124-e137, 2012.

SELLAMI, A.; SELLAMI, H.; NÉJI, S.; MAKNI, F.; ABBES, S.; CHEIKHROUHOU, F.; CHELLY, H.; BOUAZIZ, M.; HAMMAMI, B.; BEN JEMAA, M.; KHALED, S.; AYADI, A. Antifungal susceptibility of bloodstream *Candida* isolates in Sfax Hospital: Tunisia. **Mycopathologia**, v. 171, n. 6, p. 417-422, 2011.

SERPA, R.; FRANÇA, E. J. G.; FURLANETO-MAIA, L.; ANDRADE, C. G. T. J.; DINIZ, A.; FURLANETO, M. C. In vitro antifungal activity of the flavonoid baicalein against *Candida* species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61; p. 1704-1708, 2012.

SHALINI, K.; KUMAR, N.; DRABU, S.; SHARMA, P. K. Advanced in synthetic approach to and antifungal activity of triazoles, **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 7, n. 7, p. 668-677, 2011.

SHIN, J. H.; NOLTE, F. S.; MORRISON, C. J. Rapid identification of *Candida* species in blood cultures by a clinically useful PCR method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 1454-1459, 1997.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 288-305, 2012.

SPILIOPOULOU, A.; VAMVAKOPOULOU, S.; BARTZAVALI, C.; DIMITRACOPOULOS, G.; ANASTASSIOU, E. D.; CHRISTOFIDOU, M. Eleven-year retrospective survey of candidaemia in a university hospital in southwestern Greece. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 9, p. 1378-1381, 2010.

SPILIOPOULOU, A.; DIMITRIOU, G.; JELASTOPULU, E.; GIANNAKOPOULOS, I.; ANASTASSIOU, E. D.; CHRISTOFIDOU, M. Neonatal intensive care unit candidemia: epidemiology, risk factors, outcome, and critical review of published case series. **Mycopathologia**, v. 173, n. 4, p. 219-228, 2012.

SPOLIDORIO, D. M. P.; BORIOLLO, M. F.G.; ESTRELA, C.; SPOLIDORIO, L. C. Different phenotypic methods for isolation and identification of *Candida* species. **Robrac**, v. 18, n. 45, p. 18-26, 2009.

ST-GERMAIN, G.; LAVERDIÈRE, M.; PELLETIER, R.; RENÉ, P.; BOURGAULT, A. M.; LEMIEUX, C.; LIBMAN, M. Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream *Candida* isolates in Quebec: Report on 453 cases between 2003 and 2005. **The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 55-62, 2008.

TAVANTI, A.; DAVIDSON, A. D.; GOW, N. A. R.; MAIDEN, M. C. J.; ODDS, F. C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* Groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 284-292, 2005.

TORTORANO, A. M.; KIBBLER, C.; PEMAN, J.; BERNHARDT, H.; KLINGSPOR, L.; GRILLOT, R. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. 5, p. 359-366, 2006.

TORTORANO, A. M.; DHO, G.; PRIGITANO, A.; BREDA, G.; GRANCINI, A.; EMMI, V.; CAVANNA, C.; MARINO, G.; MORERO, S.; OSSI, C.; DELVECCHIO, G.; PASSERA, M.; CUSUMANO, V.; DAVID, A.; BONACCORSO, G.; CORONA, A.; FAVARO, M.; VISMARA, C.; GARAU, M. G.; FALCHI, S.; TEJADA, M. R.; ECMM-FIMUA Study Group. Invasive fungal infections in the intensive care unit: a multicentre, prospective, observational study in Italy (2006–2008). **Mycoses**, v. 55, n. 1, p. 73-79, 2012.

TRAGIANNIDIS, A.; FEGELER, W.; RELLENSMANN, G.; DEBUS, V.; MÜLLER, V.; HOERNIG-FRANZ, I.; SIAM, K.; PANA, Z. D.; JÜRGENS, H.; GROLL, A. H. Candidaemia in a European Pediatric University Hospital: a 10-year observational study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 2, p. E27-E30, 2012.

TRICK, W. E.; FRIDKIN, S. K.; EDWARDS, J. R.; HAJJEN, R. A.; GAYNES, R. P.; Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. **Clinical and Infectious Diseases**, v. 35, n. 5, p. 627-630, 2002.

TROFA, D.; GÁCSEK, A.; NOSANCHUK, J. D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 4, p. 606-625, 2008.

UZUN, O.; ARIKAN, S.; KOGAGÖZ, S.; SANCAK, B.; UNAL, S. Susceptibility testing of voriconazole, fluconazole, itraconazole and amphotericin B against yeast isolates in a Turkish University Hospital and effect of time reading. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 38, n. 2, p. 101-107, 2000.

WARNOCK, D. W. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v. 48, n. 1, p. 1-12, 2007.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S. M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R. P.; EDMOND, M. B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 3, p. 309-317, 2004.

ZANDI, K.; TEOH, B. T.; SAM, S. S.; WONG, P. F.; MUSTAFA, M. R.; ABUBAKAR, S. Novel antiviral activity of baicalein against dengue virus. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 214, 2012.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS Editora, UFSC Editora, 2004. p. 577-614.

PARTE I

EPIDEMIOLOGIA, DISTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DE ISOLADOS SANGUÍNEOS DE *Candida spp.* DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

1 INTRODUÇÃO

Leveduras do gênero *Candida* são encontradas na microbiota da pele e mucosa do homem desde o nascimento (RIBEIRO et al., 2004). Estes micro-organismos comensais podem se tornar patogênicos caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro (revisado por COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). Infecções por *Candida* envolvem um espectro amplo de doenças superficiais e invasivas. Entre as infecções invasivas causadas pelo gênero *Candida*, salienta-se a relevância clínica dos casos de infecções de corrente sanguínea, conhecida como candidemia ou candidíase hematogênica.

O aumento no emprego de processos invasivos como nutrição parenteral, cateter venoso central, processos cirúrgicos e também o uso de antimicrobianos de amplo espectro, tem propiciado o aumento da sobrevida de pacientes criticamente comprometidos, levando por consequência ao aumento no risco de aquisição de infecções sanguíneas por *Candida*.

Alguns autores relatam o gênero *Candida* como o quarto patógeno mais frequentemente encontrado em amostras sanguíneas (WISPLINGHOFF et al., 2004; CHEN et al., 2010). Amplo estudo realizado em hospitais brasileiros apontou *Candida spp.* como o sétimo micro-organismo mais prevalente em pacientes que apresentavam infecção sanguínea. Dentre as infecções causadas por fungos, 92,6% foram apontadas como sendo do gênero *Candida*. As taxas de morte causadas por *Candida spp.* foram as maiores observadas, sendo de até 85,9% em pacientes de UTI (Unidade de Terapia Intensiva) (MARRA et al., 2011). As doenças fúngicas invasivas estão associadas com uma alta taxa de mortalidade e o tratamento é de alto custo (HASSAN et al., 2010; KETT et al., 2011).

Candida albicans ainda é a espécie mais associada a infecções, entretanto, nos últimos anos têm se observado um aumento na ocorrência de espécies de *Candida* não-*albicans* (COLOMBO et al., 2007; CHANG et al., 2008; HINRICHSEN et al., 2009;

POIKONEM et al., 2010; DIEKEMA et al., 2012). Algumas espécies de *Candida* não-*albicans* apresentam propensão à resistência ou são menos suscetíveis aos antifúngicos comumente utilizados na rotina clínica (CUENCA-ESTRELLA et al., 2011; SCHMALRECK et al., 2012). O aumento na disponibilidade de diferentes tipos de antifúngicos tem levado ao aumento no uso dos mesmos, levando a pressão seletiva e resistência emergente (RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2010).

Até o momento, ainda são escassos os estudos relativos à candidemia no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina. Furlaneto et al. (2011) foram os primeiros pesquisadores a relatar a distribuição e o perfil de resistência ao fluconazol de espécies de *Candida* nesta instituição. Os estudos apontaram uma tendência na prevalência de isolados pertencentes às espécies de *Candida* não-*albicans* em diversos sítios anatômicos avaliados, incluindo secreção traqueal, lesão de pele/unha e sangue. O trabalho também reportou a baixa frequência de resistência ao fluconazol com exceção a isolados de *Candida glabrata*.

Diferenças epidemiológicas, assim como, diferenças quanto à suscetibilidade fúngica são encontradas não apenas em âmbito regional como também em âmbito institucional. Desta forma é necessário um estudo contínuo para analisar possíveis mudanças no perfil de resistência e frequência de espécies, assim como nos fatores de risco associados à candidemia.

1.1 OBJETIVOS

- Avaliar a distribuição de espécies de *Candida* associadas a episódios de candidemia em pacientes do Hospital Universitário (HU) da Universidade Estadual de Londrina/PR (UEL) no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2011;
- realizar levantamento, em prontuário médico, de características relacionadas aos pacientes, quanto a sexo, idade, unidade de internação e doenças de base, assim como, levantamento dos fatores de risco associados aos episódios de candidemia;
- avaliar o perfil de suscetibilidade dos isolados frente aos antifúngicos fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Características Clínicas

O estudo foi realizado no Hospital Universitário de Londrina, localizado no estado do Paraná, Brasil, hospital terciário com 333 leitos, incluindo 43 leitos de Unidade de Terapia Intensiva. Os isolados fúngicos foram obtidos de amostras sanguíneas de pacientes internados na instituição no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2011. Os dados clínicos foram obtidos a partir de prontuários médicos e incluíram: sexo, idade, unidade de internação, doenças de base, e levantamento dos fatores de risco associados aos episódios de candidemia.

2.2 MATERIAIS BIOLÓGICOS

Um total de 102 isolados clínicos sanguíneos de *Candida* spp. provenientes de pacientes internados no Hospital Universitário (HU) da cidade de Londrina foram analisados quanto a distribuição de espécies e suscetibilidade a antifúngicos. Destes, 68 isolados foram obtidos nos anos de 2010 e 2011, e 34 isolados obtidos em estudo anterior realizado por nosso grupo (FURLANETO et al., 2011) de pacientes internados nos anos de 2006 e 2007.

Os isolados foram armazenados em meio Sabouraud com glicerol 20% a -20°C e depositados junto à coleção de isolados de *Candida* spp. do Laboratório de Fisiologia e Biologia Molecular de Fungos da Universidade Estadual de Londrina. Os isolados de controle de qualidade do American Type Culture Collection (ATCC), *C. parapsilosis* 22019 e *C. krusei* 6258 foram incluídos nos testes de suscetibilidade.

2.3 IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES

A identificação presuntiva dos isolados foi realizada empregando-se o meio de cultivo cromogênico diferencial CHROMagar® *Candida* (CHROMagar, Company Ltda., Paris, France) (ODDS; BERNAERTS, 1994), conforme instruções do fabricante. Após 48 horas de incubação a 37°C, os isolados foram classificados como *C. albicans*, ao dar origem a colônias de coloração verde, *C. tropicalis*, colônia azul metálico e *C. krusei*, colônia rosa rugosa. As colônias de coloração branca e violeta foram classificadas como *Candida* sp.

Identificação definitiva dos isolados clínicos do gênero *Candida* foi realizada pelo emprego da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). O DNA genômico utilizado na PCR foi obtido como descrito anteriormente por Furlaneto-Maia e colaboradores (2008).

As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de PCR espécie específicos podem ser vistos na Tabela 1. As condições ótimas para execução da PCR foi realizado conforme descrito por Furlaneto e colaboradores (2011).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na identificação de *Candida spp.*

Espécies	Sequência (5' - 3') ^a	Tamanho do amplicon (pb) ^b	Fonte
<i>C. albicans</i>	TCA ACT TGT CAC ACC AGA TTA TT	402	(LI <i>et al.</i> , 2003)
<i>C. tropicalis</i>	AAG AAT TTA ACG TGG AAA CTT A	149	
<i>C. parapsilosis</i>	GGC GGA GTA TAA ACT AAT GGA TAG	126	
<i>C. glabrata</i>	CAC GAT TCG ACA CTT TCT AAT T	632	
<i>C. krusei</i>	GAT TTA GTA CTA CAC TGC GTG A	475	
Oligonucleotídeo universal reverso (ITS4)	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC		
<i>C. parapsilosis</i> strito sensu	F - AGA CTT GGG TAT TAC GTT GT R - CAG GAG TCA TGA TTA CCC	727	(TAVANTI <i>et al.</i> , 2005)

^a F: oligonucleotídeo iniciador “forward”; R: oligonucleotídeo iniciador reverso;

^b pb: pares de base.

2.4 AGENTES ANTIFÚNGICOS E TESTES DE SUSCETIBILIDADE

A técnica utilizada para determinação da Concentração Inibitória Mínima dos agentes antifúngicos foi a de Microdiluição em Caldo, proposta pelo “Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing” com modificações (AFST-EUCAST, 2008). Os agentes antifúngicos utilizados nos testes e as respectivas concentrações foram: fluconazol (0,125-64 µg/mL), itraconazol (0,015-8 µg/mL), voriconazol (0,015-8 µg/mL) e o polieno anfotericina B (0,03-16 µg/mL) (todas as drogas utilizadas foram fornecidas por Sigma-Aldrich®). As soluções estoque foram preparadas em Dimetilsulfóxido (DMSO), com concentrações 200 vezes superior a de maior concentração relativa à série de diluições usada no teste (AFST-EUCAST, 2008). Os estoques foram armazenados em freezer -80°C até o momento do preparo das placas de microdiluição.

Para o preparo das diluições em série dos antifúngicos, foi utilizado o meio sintético RPMI 1640, suplementado com glutamina sem bicarbonato e sem a adição de Vermelho de Fenol. A concentração original de 0,2% de glicose foi alterada para 2%. O meio, ainda foi tamponado com ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico (MOPS) em concentração final de 0,165 mol/L (EUCAST, 2008). O pH do meio foi ajustado para 7,0 com NaOH 1 M e em seguida foi esterilizado por meio de filtração em membrana 0.2 μm e armazenados a 4°C. As diluições resultantes, dos agentes antifúngicos, foram distribuídas nas microplacas de 96 poços e então armazenadas em freezer -80°C. Tanto o RPMI como os agentes antifúngicos foram preparados em concentração 2x superior a de uso.

Cada isolado a ser testado, a partir dos estoques, foi cultivado em Sabouraud dextrose ágar, por 24h a 37°C. Após, células dos cultivos foram diluídas em solução salina a 0,85% (p/v) e contadas com auxílio de Câmara de Neubauer. Após contagem celular, foi realizada nova diluição em H₂O ajustando a concentração celular para $2,5 \times 10^5$ UFC/mL. Em cada poço da microplaca foi inoculado 100 μL da suspensão de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL. Ao final, após a adição do inóculo, a concentração final das drogas, a densidade final do inóculo ($1,25 \times 10^5$ UFC/mL) e a concentração final do meio RPMI 1640 2% G foram alcançadas. Os isolados de controle de qualidade do American Type Culture Collection (ATCC), *C. parapsilosis* 22019 e *C. krusei* 6258 foram utilizadas em todos os testes de suscetibilidade. CIM's (Concentração Inibitória Mínima) destes isolados foram comparados aos limites de controle previamente publicados (AFST-EUCAST, 2008).

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos azóis foi determinada como sendo a menor concentração da droga capaz de inibir 50% do crescimento fúngico detectável pelas técnicas de leitura. Para o polieno anfotericina B foi usado o CIM₉₀ que corresponde a menor concentração da droga que inibe 90% do crescimento fúngico com relação ao controle positivo. As leituras espectrofotométricas foram realizadas em um comprimento de onda de 450nm.

2.5 CRITÉRIOS DE INTERPRETAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Interpretações dos pontos de corte para a anfotericina B, fluconazol e voriconazol foram realizadas segundo recomendações do EUCAST. Isolados com CIM >1 $\mu\text{g/mL}$ para anfotericina B foram considerados resistentes, para todas as espécies. Resistência ao fluconazol foi considerada aos isolados de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* que

apresentaram CIM >4 µg/mL. Todos os isolados de *C. krusei* foram classificados como resistentes. Os pontos de corte de resistência para o voriconazol foi >0.125 µg/mL para *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*. Já para as espécies de *C. glabrata* e *C. krusei* CIM >1 µg/mL foi considerado para resistência (CUENCA-ESTRELA et al., 2011).

Recente ponto de corte clínico (CBP) determinado para o fluconazol, por Pfaller e colaboradores (2010a), foi adotado para *C. glabrata* (MIC >32 µg/mL). Com relação ao itraconazol, foram aplicados pontos de corte epidemiológicos (ECV) espécie-específica recentemente publicados (PFALLER et al., 2012a). Os CIM's de resistência foram >0,5 µg/mL para *C. albicans*, *C. parapsilosis*, e *C. tropicalis*. Sendo >1 µg/mL for *C. glabrata* e >2 µg/mL for *C. krusei*.

2.6 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

As variáveis categóricas foram expressas por meio de porcentagem. Teste exato de Fisher, quando apropriado, foi realizado para comparação de variáveis categóricas. As variáveis contínuas foram comparadas por meio do Teste t ou Teste Tukey. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

2.7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Estadual de Londrina UEL (registro CONEP 268), segundo o parecer PF nº234/09.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Para os isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* a identificação presuntiva, realizada por cultivo em meio cromogênico diferencial CHROMagar® Candida, resultou em 100% de concordância com a identificação molecular realizada por meio da técnica de PCR. Alta concordância entre os dois métodos de identificação realizados, também foi observada por Furlaneto-Maia et al. (2008). Porém, alguns autores relataram a presença de colônias de *Candida* com colorações atípicas quando do emprego do meio CHROMagar® Candida (ARAÚJO et al., 2005; SAUNTE et al., 2005).

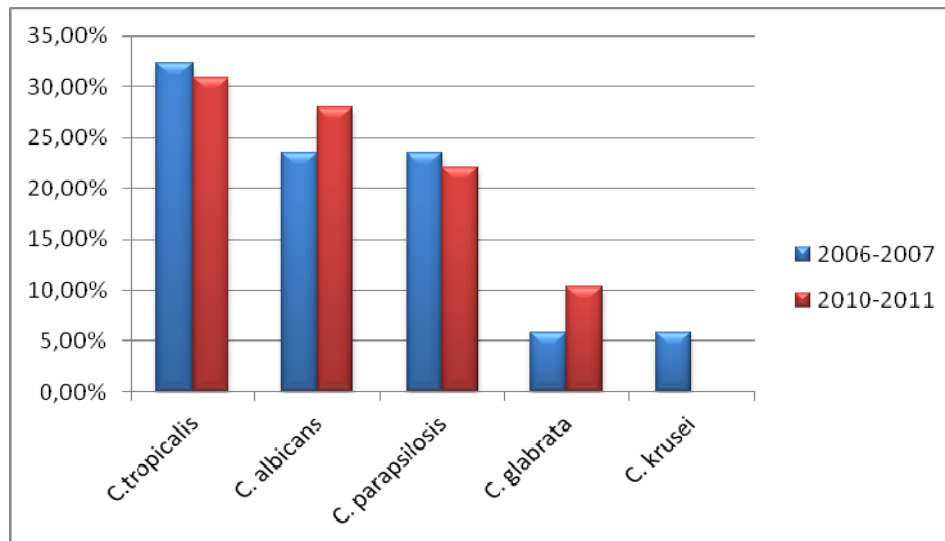
A metodologia molecular, por meio de oligonucleotídeos espécies específicos, permitiu a confirmação da identificação de isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* previamente identificadas em meio CHROMagar® Candida, e propiciou, ainda, a identificação de isolados pertencentes as espécies *C. glabrata* e *C. parapsilosis* stricto sensu. Pfaller e colaboradores (2012b) ressaltam a importância da aplicação dos métodos moleculares como um auxiliador na identificação de leveduras, incluindo espécies de *Candida*.

3.2 DISTRIBUIÇÕES DE ESPÉCIES

No período de janeiro de 2010 a dezembro de 2011 foi observado um total de 68 episódios de candidemia no HU da Universidade Estadual de Londrina. Neste período, *C. tropicalis* foi a espécie mais frequente (30,9%) seguida por *C. albicans* (27,9%), *C. parapsilosis* stricto sensu (22,1%) e *C. glabrata* (10,3%) (Figura 1).

Nos últimos anos, vem aumentando o número de infecções invasivas causadas por espécies de *Candida* não-*albicans* em diversas partes do mundo. No entanto, há variações geográficas significativas no padrão etiológico destas infecções documentadas em diferentes países (revisado por WARNOCK, 2007; DIEKEMA et al., 2012). Na América do Norte, mais especificamente nos Estados Unidos, *C. albicans* permanece como a espécie mais prevalente, sendo *C. glabrata* a espécie mais frequente entre as *Candidas* não-*albicans* (DIEKEMA et al., 2012). Perfil semelhante ocorre na Europa, porém diferença neste padrão pode ser observada em países como a Espanha, onde *C. parapsilosis* é a mais prevalente entre as *Candidas* não-*albicans* (revisado por TORTORANO et al., 2006; ORTEGA et al., 2011).

Figura 1 – Perfil comparativo da distribuição de espécies do gênero *Candida*, de isolados sanguíneos, Hospital Universitário de Londrina, nos períodos 2006-2007 e 2010-2011.



Estudos brasileiros apontam, em sua maioria, *C. albicans* como a espécie mais prevalente, sendo que *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* são as mais frequentes entre as *Candidas* não-*albicans*. Ora são relatadas como a segunda mais prevalente ora como a terceira (AQUINO et al., 2005; COLOMBO et al., 2006; NUCCI; COLOMBO, 2007; FRANÇA et al., 2008; BONFIETTI et al., 2012). Porém alguns estudos, também realizados em regiões brasileiras, relatam espécies de *Candida* não-*albicans* como as mais frequentemente isoladas de sangue (MEDRANO et al., 2006; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010). Nestes estudos *C. parapsilosis* foi a espécie predominante, sendo que *C. albicans* foi relatada como a segunda mais prevalente. Em estudo anterior, realizado por nosso grupo no período de 2006-2007, foi observado que *C. tropicalis* foi a espécie mais frequente em amostras sanguíneas (FURLANETO et al., 2011). No Brasil, *C. glabrata* ainda é pouco frequente ocupando apenas a quarta posição (AQUINO et al., 2005; CHANG et al., 2008; FRANÇA et al., 2008; COLOMBO et al., 2007; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010; BONFIETTI et al., 2012).

Perfil comparativo da distribuição de espécies de *Candida*, relativo a isolados sanguíneos, nos anos de 2006-2007 e 2010-2011 podem ser vistos na Figura 1. A frequência de isolados de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* apresentou pouca variação entre os períodos analisados. Quanto a *C. albicans* foi observado um aumento na frequência no segundo período avaliado de 23,5% para 27,9%. *C. krusei* e *C. glabrata* apresentaram uma frequência de 5,8% no primeiro período. Porém, no segundo período *C. krusei* não foi

relatada e *C. glabrata* teve um aumento na frequência, sendo de quase o dobro da anterior (10,3%). Apesar das diferenças de frequência para algumas espécies, principalmente no que se refere a *C. glabrata*, não foi encontrada diferença estatística entre os dois períodos de estudo, provavelmente devido ao baixo número encontrado, da referida espécie.

O aumento no uso de fluconazol, ocorrido durante a década de 90, é considerado como o provável fator responsável pelo aumento na frequência de *C. glabrata* a partir deste período (TRICK et al., 2002). Em nosso estudo não foi encontrada relação do aumento na frequência de *C. glabrata* com o uso prévio de fluconazol. Do total de pacientes tratados previamente, nenhum dos mesmos foi diagnosticado com *C. glabrata*. Mais recentemente, Diekema et al. (2012) sugeriram que outros fatores, além do uso prévio de fluconazol, podem estar relacionados com o aumento de *C. glabrata*. Outros autores sugerem, mais especificamente, que a exposição prévia a determinados antibióticos pode estar mais associada com o desenvolvimento de *C. glabrata* do que ao uso prévio do fluconazol (LIN et al., 2005).

Os dados obtidos neste estudo reforçam o aumento na frequência de *Candida não-albicans* no Brasil e nos alertam para a atenção que deve ser dada aos estudos, não apenas em âmbito regional, mas sim, em âmbito institucional. Perfis epidemiológicos distintos são observados em uma mesma região, e podem desorientar supostos tratamentos empíricos.

3.3 DADOS DEMOGRÁFICOS E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

No período de estudo foi observado um total de 68 episódios de infecção sanguínea por espécies de *Candida*. Do total de pacientes associados a estas infecções, quatro apresentaram mais de uma espécie de *Candida* na corrente sanguínea. A hemocultura de dois pacientes demonstrou a ocorrência de três espécies, sendo estas *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Já a hemocultura de outros dois pacientes revelou a ocorrência de duas espécies de *Candida*. Um destes pacientes foi diagnosticado com *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, enquanto que o outro paciente foi diagnosticado com *C. tropicalis* e *C. albicans*.

Devido a ocorrência destas infecções múltiplas e pelo fato de que alguns prontuários médicos não se encontravam no local de estudo, dos 68 episódios foi possível realizar a análise de dados clínicos de somente 57 pacientes.

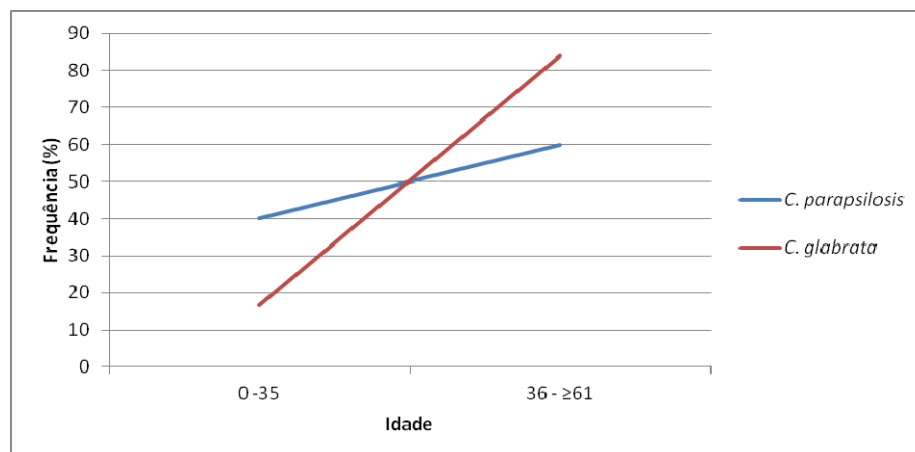
As características clínicas e os dados demográficos dos episódios de candidemia do Hospital Universitário de Londrina nos anos de 2010 e 2011 são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Características demográficas e clínicas de pacientes com candidemia do Hospital Universitário de Londrina (n=57).

	2010 (%)	2011 (%)	Total (%)
Sexo			
Masculino	20 (74.1)	16 (53.3)	36 (63.2)
Idade			
Neonatos	2 (7.4)	6 (20)	8 (14.0)
≤1 – 18	5 (18.5)	4 (13.3)	9 (15.8)
19 – 35	2 (7.4)	5 (16.7)	7 (12.3)
36 -60	8 (29.6)	9 (30)	17 (29.8)
≥61	10 (37)	6 (20)	16 (28.1)
Localização			
UTI neonatal	1 (3.7)	5 (16.7)	6 (10.5)
UTI pediátrica	2 (7.4)	4 (13.3)	6 (10.5)
UTI adulto	15 (55.5)	9 (30)	24 (42.1)
UTI queimados	0 (0)	7 (23.3)	7 (12.3)
Pediatria	1 (3.7)	1 (3.3)	2 (3.5)
Outros	8 (29.6)	4 (13.3)	12 (21)
Doenças Subjacentes/Condição			
Prematuros	1 (3.7)	4 (13.3)	5 (8.8)
Trauma	5 (18.5)	2 (6.7)	7 (12.3)
Queimados	1 (3.7)	8 (26.7)	9 (15.8)
Doenças do trato gastrointestinal	11 (40.7)	12 (40)	23 (40.3)
Insuficiência Renal	10 (37)	8 (26.7)	18 (31.6)
Diabetes mellitus	6 (22.2)	3 (30)	9 (15.8)
Doenças cardiovasculares	13 (48.1)	11 (36.7)	24 (42.1)
Câncer	4 (14.8)	3 (10)	7 (12.3)
Leucemia	0 (0)	1 (3.3)	1 (1.7)
Doença neurológica	6 (22.2)	6 (20)	12 (21)
Doença do trato respiratório	24 (88.9)	21 (66.7)	45 (78.9)
Fatores de Risco			
Uso prévio de antibiótico	26 (96.3)	29 (96.7)	55 (96.5)
Uso prévio de Fluconazol	8 (29.6)	10 (33.3)	18 (31.6)
Uso de corticoides	17 (63)	17 (56.7)	34 (59.6)
Ventilação Mecânica	19 (70.4)	25 (83.3)	44 (77.2)
Cateter Urinário	18 (66.7)	24 (80)	42 (73.7)
Cirurgia abdominal prévia	8 (29.6)	7 (23.3)	15 (26.3)
Cateter Venoso Central	16 (59.2)	9 (30)	25 (43.9)
Nutrição Parenteral	10 (37)	12 (40)	22 (38.6)
Cirurgia não abdominal	13 (48.1)	20 (66.7)	33 (57.9)
Neutropenia	2 (7.4)	6 (20)	8 (14)
Quimioterapia	2 (7.4)	2 (6.7)	4 (7)

Do total de pacientes envolvidos aos episódios de candidemia ocorreu predomínio do sexo masculino (63,2%). Houve um predomínio significativo de adultos de 36 a 60 anos (29.8%) e idosos acima de 60 anos (28.1%) ($p < 0,05$). Neonatos corresponderam a 14% ($n=8$) indivíduos do total de pacientes. Neste grupo de pacientes, *C. albicans* foi a mais frequente (28.6%), seguida por *C. tropicalis* (17.6%) e por fim *C. parapsilosis* (8.3%). Apesar do baixo número de isolados de *C. glabrata* encontrados em nosso estudo, os mesmos predominaram em pacientes adultos (83,3%). Como pode ser visto na Figura 2, houve um aumento na frequência de *C. glabrata* paralelo ao aumento da idade dos pacientes. Para *C. parapsilosis* esse aumento foi menos pronunciado.

Figura 2 – Frequência de isolados sanguíneos de *C. parapsilosis* e *C. glabrata* com relação à idade dos pacientes internados no Hospital Universitário de Londrina, 2010-2011.



A maioria dos estudos aponta *C. albicans* como a espécie mais prevalente entre neonatos e crianças, sendo *C. parapsilosis* a de maior frequência entre as espécies de *Candida* não-*albicans* (revisado por TORTORANO et al., 2006; SPILIOPOULOU et al., 2010; TRAGIANNIDIS et al., 2012). Porém, perfis distintos podem ser observados em outros estudos que apontam *C. parapsilosis* e até mesmo *C. tropicalis* como as mais prevalentes em crianças (AWASTHI et al., 2011; MATSUMOTO et al., 2001). Em revisão de Tortorano et al. (2006) é apresentada uma correlação entre a redução da porcentagem de *C. parapsilosis* e o aumento de *C. glabrata* com o aumento da idade dos pacientes. Além da idade dos pacientes outros fatores parecem estar relacionados à prevalência de determinadas espécies. Estudo brasileiro apontou candidemia devido a *C. tropicalis* com frequência significativamente superior em pacientes idosos, porém essa associação foi encontrada apenas em pacientes com câncer (GUIMARÃES et al., 2012).

Vários fatores de risco parecem estar associados aos episódios de candidemia, destacando o uso prévio de antibióticos (96,5%), a realização de processo cirúrgico (84,21%) sendo a cirurgia abdominal representada por 26,3%, a ventilação mecânica (77,2%), o internamento em unidade de terapia intensiva (75,4%) e o uso de cateter urinário (73,7%). Entre as doenças de base, as de maior frequência foram doença do trato respiratório (78,9%), doenças cardiovasculares (42,1%), doença do trato gastrointestinal (40,3%) e insuficiência renal (31,6%). Os fatores mencionados são amplamente distribuídos e conhecidos em várias regiões do mundo (FRANÇA et al., 2008; CHEN et al., 2011; ORTEGA et al., 2011; SELLAMI et al., 2011; DIEKEMA et al., 2012; FORTÚN et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2012).

Do total de pacientes diagnosticados com candidemia, 75,4% encontravam-se internados em UTI. Altas taxas de internamento em UTI em pacientes com infecção sanguínea causada por *Candida* spp. têm sido relatadas (CHANG et al., 2008; FRANÇA et al., 2008; HINRICHSEN et al., 2009). Estudo multicêntrico realizado por Pfaller e colaboradores (2011) apontou que a frequência de pacientes internados em UTI diagnosticados com infecção sanguínea devido ao gênero *Candida* foi maior na América Latina (56,5%) em comparação com a Europa (44,4%) e América do Norte (39,6%).

Quanto a distribuição das espécies, *C. parapsilosis* stricto sensu foi a mais frequente (75%) entre os pacientes de UTI, seguida por *C. albicans* (71%) e por fim *C. tropicalis* (58,8%), considerando as três espécies mais prevalentes do nosso estudo. Não houve diferença significativa entre as frequências encontradas. Apesar do relato de apenas 6 espécies de *C. glabrata*, 83,3% foram isoladas de pacientes de UTI.

Com relação aos pacientes que foram submetidos a processo cirúrgico abdominal houve um maior número de isolados de *C. tropicalis* (35,3%) comparativamente a *C. albicans* (28,6%), *C. parapsilosis* (16,6%) e *C. glabrata* (16,6%), embora não tenha havido diferenças estatisticamente significativas. Revisão apresentada por Chai e colaboradores (2010) relatou que a colonização gastrointestinal por *C. tropicalis* é comum em indivíduos saudáveis (até 30%), sendo um fator de risco reconhecido para o desenvolvimento de candidíase invasiva. Porém Kao et al. (1999), não encontrou essa relação apontando *C. guilliermondii* como a espécie mais comumente encontrada em pacientes que sofreram cirurgia abdominal. Isolados de *C. tropicalis* também foram prevalentes (47,0%) entre os pacientes que apresentavam doenças gastrointestinais, prevalecendo sobre *C. albicans* (42,9%), não havendo, no entanto, diferenças significativas.

Em relação à nutrição parenteral houve predomínio de *C. parapsilosis* (50%), seguida por *C. albicans* (42.9%) e *C. tropicalis* (41.2%). A nutrição parenteral tem sido considerada um dos fatores associados ao aumento de risco de infecção sanguínea por *C. parapsilosis* (CLARK et al., 2004). Caracteristicamente, *C. parapsilosis* tem uma elevada afinidade por nutrição parenteral (revisado por TROFA et al., 2008).

Entre os anos de 2010 e 2011 o número de episódios de candidemia foi semelhante, sendo 27 e 30, respectivamente. Porém, na ala de queimados do hospital, foram observados 07 casos de candidemia em 2011, sendo que em 2010, nenhum caso havia sido relatado. Apesar dos poucos relatos de queimados como um fator de risco para candidemia (revisado por TORTORANO et al., 2006) é necessária atenção no possível aumento de episódios, visto serem pacientes, em geral, com vasta porta de entrada para infecções. Entre as três espécies mais prevalentes de nosso estudo, *C. parapsilosis* (33.3%) foi a mais frequente entre os queimados diagnosticados com candidemia, seguida por *C. albicans* (14.28%) e por fim por *C. tropicalis* (5.9%). Apesar de não ter sido observada diferença estatística entre as frequências relatadas, possivelmente devido ao baixo número amostral analisado, os dados apontam a importância da realização do processo de higienização, adequado, das mãos dos profissionais de saúde visto que *C. parapsilosis* é uma espécie frequentemente encontrada nas mãos destes profissionais.

Vigilância contínua é necessária para que sejam avaliadas as mudanças epidemiológicas da instituição, e assim, permita a prática de uma terapia e profilaxia adequadas.

3.4 TESTE DE SUSCETIBILIDADE

Neste estudo foi avaliado um total de 102 isolados sanguíneos de pacientes internados no Hospital Universitário de Londrina nos anos de 2006-2007 e 2010-2011. Os CIM's apresentados pelos isolados do gênero *Candida* podem ser vistos na Tabela 3. A Tabela 4 sumariza a frequência de resistência apresentada pelos isolados frente aos antifúngicos testados.

Quanto ao antifúngico anfotericina B, apenas um isolado de *C. albicans* foi resistente (0,98%) do total de isolados analisados. Resistência de *Candida spp.* a anfotericina B é rara e quando encontrada, a frequência é baixa (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2003; CISTERNA et al., 2010; AWASTHI et al., (2011); CÓRDOBA et al., 2011; PÉMAN et al., 2012). Estudos brasileiros realizados anteriormente não relatam resistência de isolados de

Candida frente à anfotericina B (COLOMBO et al., 2006; MATTA et al., 2007; BONFIETTI et al., 2012). Apesar da baixa porcentagem de resistência encontrada em nosso trabalho é necessário atenção no surgimento de novos casos, visto que até o momento é rara a resistência de *C. albicans* a anfotericina B.

A frequência de resistência ao fluconazol entre os isolados de *C. parapsilosis* foi de 30,4%, sendo de apenas 3,7% para *C. albicans* e de 3,1% para *C. tropicalis* (Tabela 4). Em trabalhos recentes foi observado que, ao adotarem os novos pontos de corte clínico (CBPs) e compará-los aos anteriormente usados, houve um aumento nas taxas de resistência de *C. parapsilosis* ao fluconazol de 0% para 5,5% (CANTÓN et al., 2011) e de 0% para 4,1% (PEMÁN et al., 2012). Se aplicássemos os pontos de corte clássicos, de resistência definidos pelo CLSI, para o fluconazol (≥ 64) em nossos isolados de *C. parapsilosis*, a taxa de resistência passaria de 30,4% para 0%. Os novos CBPs adotados para o antifúngico fluconazol são mais sensíveis na detecção de resistência, devido a isso, espécies do gênero *Candida* antes conhecidas por apresentarem alta suscetibilidade ao fluconazol (LAUPLAND et al., 2005; ALMIRANTE et al., 2006; MATTA et al., 2007), podem apresentar um aumento na taxa de resistência a partir de estudos realizados com aplicação dos novos pontos de corte clínico definidos.

Ainda com relação ao fluconazol, altos CIM's foram encontrados (16-32 $\mu\text{g/mL}$), para os isolados de *C. glabrata* (Tabela 3). Apesar dos altos CIM's observados, todos os isolados foram considerados suscetíveis. Estudo anterior realizado por nosso grupo, em que analisou a suscetibilidade ao fluconazol de 205 isolados de *Candida spp.* observou perfil semelhante. Altos CIM's para *C. glabrata* foram encontrados com variação entre 0,25-32 $\mu\text{g/mL}$ (FURLANETO et al., 2011). Outro estudo brasileiro recente também relatou ausência de resistência ao fluconazol para esta espécie (BONFIETTI et al., 2012). Panorama geográfico mundial a respeito da suscetibilidade de *C. glabrata* ao fluconazol apresentado por Pfaller et al. (2010b), mostra o Brasil com uma das maiores taxa de suscetibilidade (92,0%). O autor relata que a taxa de suscetibilidade de *C. glabrata* ao fluconazol é altamente variável em diferentes regiões geográficas e até mesmo dentre países da mesma região.

Resistência foi incomum com relação ao voriconazol entre os isolados de *C. albicans* (3,7%) e de *C. tropicalis* (3,2%). Os isolados de *C. parapsilosis* foram 100% suscetíveis ao voriconazol (Tabela 4). Apesar dos altos CIM's (0,25 $\mu\text{g/mL}$ -1 $\mu\text{g/mL}$) encontrados tanto para os isolados de *C. glabrata* quanto para os isolados de *C. krusei*, segundo CIM de resistência espécie específico (>1) definido pelo EUCAST, todos isolados

foram suscetíveis. No geral, a taxa de resistência ao voriconazol, entre as espécies de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* é baixa. Já para *C. glabrata* e *C. krusei* resistência é encontrada com maior frequência (CUENCA-ESTRELLA et al., 2011; CÓRDOBA et al., 2011; SELLAMI et al., 2011). Estudo realizado apenas com a espécie *C. glabrata* aponta variabilidade nas taxas de suscetibilidade em diferentes regiões e dentro da mesma região. Na América Latina, por exemplo, pode-se observar uma taxa de suscetibilidade de 55% na Venezuela e de 94,4% no Brasil (PFALLER et al., 2010b).

Do total de isolados resistentes ao fluconazol (09), 02 apresentaram resistência cruzada ao voriconazol, sendo estes, um isolado de *C. albicans* e o outro de *C. tropicalis* (Tabela 4). A resistência entre os azóis voriconazol e fluconazol geralmente está mais correlacionada, assim como, ocorre entre os azóis itraconazol e posaconazol (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2003). Estudo realizado com *C. albicans* relatou que uma mutação pontual na enzima alvo dos azóis, resultou em um aumento significativo de resistência ao fluconazol e ao voriconazol, porém o efeito na alteração da suscetibilidade foi menor com relação ao itraconazol e posaconazol, provavelmente devido a diferenças estruturais encontradas nestes antifúngicos (XIAO et al., 2004). Trabalhos recentes também relataram a presença de resistência cruzada entre os azóis fluconazol e voriconazol para espécies de *Candida* (SCHMALRECK et al., 2011; BONFIETTI et al., 2012).

Tabela 3 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) de isolados sanguíneos de *Candida spp.* do Hospital Universitário de Londrina.

Espécies (n)	CIM (µg/mL)							
	Fluconazol		Itraconazol		Voriconazol		Anfotericina	
	Intervalo CIM	CIM50	Intervalo CIM	CIM50	Intervalo CIM	CIM50	Intervalo CIM	CIM90
<i>C. albicans</i> (27)	0.12-64	0.25	0.01-0.25	0.03	0.015-0.5	0.015	0.12-2	0.5
<i>C. tropicalis</i> (32)	0.12-32	0.5	0.03-0.25	0.06	0.015-0.25	0.03	0.12-1	0.5
<i>C. parapsilosis</i> (23)	0.5-16	1	0.01-0.5	0.03	0.015-0.12	0.015	0.12-1	0.5
<i>C. glabrata</i> (9)	16-32	16	0.25-1	0.5	0.25-1	0.5	0.25-1	0.5
<i>C. krusei</i> (2)	64-64	64	0.12-0.25	0.12-0.25	0.25-1	0.25-1	1-1	1
<i>C. sp</i> (9)	0.25-2	1	0.01-0.06	0.03	0.015-0.06	0.015	0.12-1	1

Com relação ao antifúngico itraconazol foi observado CIM50 de 0,03 µg/mL - 0,06 µg/mL para os isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Por outro lado, para *C. glabrata* e *C. krusei* os CIM's observados foram maiores, variando de 0,25 µg/mL - 1 µg/mL para a primeira espécie e de 0,125 µg/mL - 0,25 µg/mL para a última. Apesar dos maiores CIM's encontrados para as duas últimas espécies, 100% dos isolados foram suscetíveis ao itraconazol tornando-se, desta maneira, o antifúngico de melhor resposta frente aos isolados testados (Tabela 4).

Tabela 4 – Frequência de resistência entre 102 isolados sanguíneos do gênero *Candida* de pacientes do Hospital Universitário de Londrina.

Espécies (n)	Frequência (%) de resistência para: ^a			
	ANF	FLU	ITR	VOR
<i>C. albicans</i> (27)	3,7	3,7	0	3,7
<i>C. tropicalis</i> (32)	0	3,1	0	3,1
<i>C. parapsilosis</i> (23)	0	30,4	0	0
<i>C. glabrata</i> (9)	0	0	0	0
<i>C. krusei</i> (2)	0	0	0	0
Total	0,98	8,82	0	1,96

ANF, anfotericina B; FLU, fluconazol; ITR, itraconazol; VOR, voriconazol.
^a Novos pontos de corte clínico e pontos de corte epidemiológico foram aplicados (veja texto).

Péman et al. (2012) em seu estudo relatou o itraconazol, como a droga menos ativa entre os isolados do gênero *Candida*, apresentando um total de 5,4% de isolados resistentes. As maiores taxas de resistência observadas foram para os isolados de *C. glabrata* (24,1%) e *C. krusei* (81,5%). Altas taxas de resistência (20%) também foram relatadas por Ostrosky-Zeichner et al. (2003), sendo os isolados de *C. glabrata* e *C. krusei* os que apresentaram os maiores CIMs. Segundo Pfaller et al. (2012a) o fato de o antifúngico itraconazol estar sendo subvalorizado pode estar relacionado a baixa atividade deste antifúngico frente ao gênero *Candida*, quando aplicado os pontos de corte clínicos conservativos estabelecidos e usados até o momento.

No geral, resistência a anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol entre isolados sanguíneos de *Candida* de instituições brasileiras ainda é incomum. Entre os

antifúngicos analisados, itraconazol apresentou os melhores resultados. Embora não tenha sido relatada resistência entre os isolados de *C. glabrata* e *C. krusei*, especial atenção é necessária na escolha do tratamento devido os altos CIMs encontrados.

REFERÊNCIAS

- ALMIRANTE, B.; RODRÍGUEZ, D.; CUENCA-ESTRELLA, M.; ALMELA, M.; SANCHEZ, F.; AYATS, J.; ALONSO-TORRES, C.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; PAHISSA, A. Epidemiology, Risk Factors, and Prognosis of *Candida parapsilosis* Bloodstream Infections: Case-Control Population-Based Surveillance Study of Patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1681-1685, 2006.
- AQUINO, V. R.; LUNARDI, L. W.; GOLDANI, L. Z.; BARTH, A. L. Prevalence, Susceptibility Profile for Fluconazole and Risk Factors for Candidemia in a Tertiary Care Hospital in Southern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 5, p. 411-418, 2005.
- ARAUJO, C. R.; MIRANDA, K. C.; PASSOS, X. S.; SOUZA, L. K. H.; LEMOS, J. A.; KHRAIS, C. H. A.; COSTA, C. R.; SILVA, M. R. R.; FERNANDES, O. F. L. Identificação das Leveduras do Gênero *Candida* por Métodos Manuais Convencionais e pelo Método Cromógeno Chromagar™ *Candida*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 1, p. 37-42, 2005.
- AWASTHI, A. K.; JAIN, A.; AWASTHI, S.; AMBAST, A.; SINGH, K.; MISHRA, V. Epidemiology and Microbiology of Nosocomial Pediatric Candidemia at a Northern Indian Tertiary Care Hospital. **Mycopathologia**, v. 172, n. 4, p. 269-277, 2011.
- BONFIETTI, L. X.; SZESZS, M. W.; CHANG, M. R.; MARTINS, M. A.; PUKINSKAS, S. R. B. S.; NUNES, M. O.; PEREIRA, G. H.; PANIAGO, A. M. M.; PURISCO, S. U.; MELHEM, M. S. C. Ten-Year Study of Species Distribution and Antifungal Susceptibilities of *Candida* Bloodstream Isolates at a Brazilian Tertiary Hospital, **Mycopathologia**, [Epub ahead of print], 2012.
- BRUDER-NASCIMENTO, A.; CAMARGO C. H.; SUGIZAKI, M. F.; SADATSUNE, T.; MONTELLI, A. C.; MONDELLI, A. L.; BAGAGLI, E. Species distribution and susceptibility profile of *Candida* species in a Brazilian public tertiary hospital, **Research Notes**, v. 3, n. 1, p. 1-5, 2010.
- CANTÓN, E.; PEMÁN, J.; QUINDÓS, G.; ERASO, E.; MIRANDA-ZAPICO, I.; ÁLVAREZ, M.; MERINO, P.; CAMPOS-HERRERO, I.; MARCO, F.; DE LA PEDROSA, E. G. G.; YAGÜE, G.; GUNA, R.; RUBIO, C.; MIRANDA, C.; PAZOS, C.; VELASCO, D. Prospective Multicenter Study of the Epidemiology, Molecular Identification, and Antifungal Susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* Isolated from Patients with Candidemia. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 55, n. 12, p. 5590-5596, 2011.
- CHANG, M. R.; CORREIA, F. P.; COSTA, L. C.; XAVIER, P. C.; PALHARES, D. B.; TAIRA, D. L.; PANIAGO, A. M. M.; PONTES, E. R. J.; MACHADO, V. E. *Candida* Bloodstream Infection: Data from a Teaching Hospital in Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 50, n. 5, p. 265-268, 2008.

CHEN, L. Y.; LIAO, S. Y.; KUO, S. C.; CHEN, S. J.; CHEN, F. D.; WANG, F. D.; YANG, S. P.; FUNG, C. P. Changes in the incidence of candidaemia during 2000-2008 in a tertiary medical centre in northern Taiwan. **Journal of Hospital Infection**, v. 78, n. 1, p. 50-53, 2011.

CISTERNA, R.; EZPELETA, G.; TELLERIA, O.; GUINEA, J.; REGUEIRO, B.; GARCIA-RODRÍGUEZ, J.; ESPERALBA, J. Nationwide sentinel surveillance of bloodstream *Candida* infections in 40 tertiary care hospitals in Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 11, p. 4200-4206, 2010.

CLARK, T. A.; SLAVINSKI, S. A.; MORGAN, J.; LOTT, T.; ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; BRANDT, M. E.; WEBB, R. M.; CURRIER, M.; FLOWERS, R. H.; FRIDKIN, S. K.; HAJJEH, R. A. Epidemiologic and Molecular Characterization of an Outbreak of *Candida parapsilosis* Bloodstream Infections in a Community Hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4468-4472, 2004.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON SKAGGES, B.; MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816-2823, 2006.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L. R. B. F.; MONFARDINI, L. P. A.; CUNHA, A. K. B.; RADY, P.; ALVES, T.; ROSAS, R. C. Prospective Observational Study of Candidemia in São Paulo, Brazil: Incidence Rate, Epidemiology, and Predictors of Mortality. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 28, n. 5, p. 570-576, 2007.

CÓRDOBA, S.; VIVOT, W.; BOSCO-BORGEAT, M. E.; TAVERNA, C.; SZUSZ, W.; MURISENGO, O.; ISLA, G.; DAVEL, G. Species distribution and susceptibility profile of yeasts isolated from blood cultures: results of a multicenter active laboratory-based surveillance study in Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 43, n. 3, p. 176-185, 2011.

CUENCA-ESTRELLA, M.; GOMEZ-LOPEZ, A.; CUESTA, I.; ZARAGOZA, O.; MELLADO, E.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. Frequency of voriconazole resistance in vitro among Spanish clinical isolates of *Candida* spp. According to breakpoints established by the Antifungal Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 4, p. 1794-1797, 2011.

DIEKEMA, D.; ARBEFEVILLE, S.; BOYKEN, L.; KROEGER, J.; PFALLER, M. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 1, p. 45-48, 2012.

FORTÚN, J.; MARTÍN-DÁVILA, P.; GÓMEZ-GARCÍA DE LA PEDROSA, E.; PINTADO, V.; COBO, J.; FRESCO, G.; MEIJE, Y.; ROS, L.; ALVAREZ, M. E.; LUENGO, J.; AGUNDEZ, M.; BELSO, A.; SÁNCHEZ-SOUSA, A.; LOZA, E.; MORENO, S. Emerging trends in candidemia: a higher incidence but a similar outcome. **The Journal of Infection**, v. 65, n. 1, p. 64-70, 2012.

- FRANÇA, J. C. B.; RIBEIRO, C. E. L.; QUEIROZ-TELLES, F. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 1, p. 23-28, 2008.
- FURLANETO, M. C.; ROTA, J. F.; QUESADA, R. M. B.; FURLANETO-MAIA, L.; RODRIGUES, R.; ODA, S.; OLIVEIRA, M. T.; SERPA, R.; FRANÇA, E. J. G. Species distribution and *in vitro* fluconazole susceptibility of clinical *Candida* isolates in a Brazilian tertiary-care hospital over a 3-year period. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 595-599, 2011.
- FURLANETO-MAIA, L.; SPECIAN, A. F.; BIZERRA, F. C.; OLIVEIRA, M. T.; FURLANETO, M. C. In vitro evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida spp.* obtained from elderly healthy individuals. **Mycopathologia**, v. 166, n. 4, p. 209-217, 2008.
- GUIMARÃES, T.; NUCCI, M.; MENDONÇA, J. S.; MARTINEZ, R.; BRITO, L. R.; SILVA, N.; MORETTI, M. L.; SALOMÃO, R.; COLOMBO, A. L. Epidemiology and predictors of a poor outcome in elderly patients with candidemia. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. e442-e447, 2012.
- HASSAN, I.; POWELL, G.; SIDHU, M.; HART, W. M.; DENNING, D. W. Excess mortality, length of stay and cost attributable to candidaemia. **Journal of Infection**, v. 59, n. 5, p. 360-365, 2009.
- HINRICHSEN, S. L.; FALCÃO, E.; VILELLA, T. A. S.; RÊGO, L.; LIRA, C.; ALMEIDA, L.; MARTINS, M.; ARAÚJO, C.; DUARTE, M.; LOPES, G. *Candida* Isolates in Tertiary Hospitals in Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 325-328, 2009.
- KAO, A. S.; BRANDT, M. E.; PRUITT, W. R.; CONN, L. A.; PERKINS, B. A.; STEPHENS, D. S.; BAUGHMAN, W. S.; REINGOLD, A. L.; ROTHROCK, G. A.; PFALLER, M. A.; PINNER, R. W.; HAJJEH, R. A. The epidemiology of candidemia in two United States cities: Results of a Population-Based Active Surveillance. **Clinical and Infectious Diseases**, v. 29, n. 5, p. 1164-1170, 1999.
- KETT, D. H.; AZOULAY, E.; ECHEVERRIA, P. M.; VINCENT, J. L. Extended Prevalence of Infection in the ICU Study (EPIC II) Group of Investigators. *Candida* bloodstream infections in intensive care units: Analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study. **Critical Care Medicine**, v. 39, n. 4, p. 665-670, 2011.
- LAUPLAND, K. B.; GREGSON, D. B.; CHURCH, D. L.; ROSS, T.; ELSAYED, S. Invasive *Candida* species infections: a 5 year population-based assessment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 3, p. 532-537, 2005.
- LI, Y. L.; LEAW, S. N.; CHEN, J. H.; CHANG, H. C.; CHANG, T. C. Rapid identification of yeasts commonly found in positive blood cultures by amplification of the internal transcribed spacer regions 1 and 2. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 693-696, 2003.

LIN, M. Y.; CARMELI, Y.; ZUMSTEG, J.; FLORES, E. L.; TOLENTINO, J.; SREERAMOJU, P.; WEBER, S. G. Prior Antimicrobial Therapy and Risk for Hospital-Acquired *Candida glabrata* and *Candida krusei* Fungemia: a Case-Case-Control Study, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4555-4560, 2005.

MATSUMOTO, F. E.; GANDRA, R. F.; RUIZ, L. S.; AULER, M. E.; MARQUES, S. A. V.; PIRES, M. F. C.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R. Yeasts isolated from blood and catheter in children from a Public Hospital of São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v. 154, n. 2, p. 63-69, 2001.

MATTA, D. A.; ALMEIDA, L. P.; MACHADO, A. M.; AZEVEDO, A. C.; KUSANO, E. J. U.; TRAVASSOS, N. F.; SALOMÃO, R.; COLOMBO, A. L. Antifungal Susceptibility of 1000 *Candida* Bloodstream Isolates to 5 Antifungal Drugs: Results of a Multicenter Study Conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 57, n. 4, p. 300-404, 2007.

MARRA, A. R.; CAMARGO, L. F.; PIGNATARI, A. C.; SUKIENNIK, T.; BEHAR, P. R.; MEDEIROS, E. A.; RIBEIRO, J.; GIRÃO, E.; CORREA, L.; GUERRA, C.; BRITES, C.; PEREIRA, C. A.; CARNEIRO, I.; REIS, M.; DE SOUZA, M. A.; TRANCHESI, R.; BARATA, C. U.; EDMOND, M. B. Brazilian SCOPE Study Group. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian Hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1866-1871, 2011.

MEDRANO, D. J. A.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F. G.; RABENHORST, S. H. B.; SIDRIM, J. J. C. Candidemia in a Brazilian Hospital: The Importance of *Candida parapsilosis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 48, n. 1, p. 17-20, 2006.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, n. 1, p. 77-82, 2007.

ODDS, F. C.; BERNAERTS, R. CHROMagar *Candida*, a New Differential Isolation Medium for Presumptive Identification of Clinically Important *Candida* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 8, p. 1923-1929, 1994.

ORTEGA, M.; MARCO, F.; SORIANO, A.; ALMELA, M.; MARTÍNEZ, J. A.; LÓPEZ, J.; PITART, C.; MENSA, J. *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. **Journal of Hospital Infection**, v. 77, n. 2, p. 157-161, 2011.

OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REX, J. H.; PAPPAS, P. G.; HAMILL, R. J.; LARSEN, R. A.; HOROWITZ, H. W.; POWDERLY, W. G.; HYSLOP, N.; KAUFFMAN, C. A.; CLEARY, J.; MANGINO, J. E.; LEE, J. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstreams *Candida* isolates in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 10, p. 3149-3154, 2003.

PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; QUINDÓS, G.; ERASO, E.; ALCOBA, J.; GUINEA, J.; MERINO, P.; RUIZ-PÉREZ-DE-PIPAON, M. T.; PÉREZ-DEL-MOLINO, L.; LINARES-SICILIA, M. J.; MARCO, F.; GARCÍA, J.; ROSELLÓ, E. M.; GÓMEZ-G-DE-LA-PEDROSA, E.; BORRELL, N.; PORRAS, A.; YAGÜE, G. Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 5, p. 1181-1187, 2012.

PFALLER, M. A.; ANDES, D.; DIEKEMA, D. J.; ESPINEL-INGROFF, A.; SHEEHAN, D. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. **Drug Resistance Updates**, v. 13, n. 6, p. 180-195, 2010a.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; GIBBS, D. L.; NEWELL, V. A.; BARTON, R.; BIJIE, H.; BILLE, J.; CHANG, S. C.; DA LUZ MARTINS, M.; DUSE, A.; DZIERZANOWSKA, D.; ELLIS, D.; FINQUELIEVICH, J.; GOULD, I.; GUR, D.; HOOSSEN, A.; LEE, K.; MALLATOVA, N.; MALLIE, M.; PENG, N. G.; PETRIKOS, G.; SANTIAGO, A.; TRUPL, J.; VANDEN ABEELE, A. M.; WADULA, J.; ZAIDI, M. Geographic variation in the frequency of isolation and fluconazole and voriconazole susceptibilities of *Candida glabrata*: an assessment from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Program. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 67, n. 2, p. 162-171, 2010b.

PFALLER, M. A.; ESPINEL-INGROFF, A.; CANTON, E.; CASTANHEIRA, M.; CUENCA-ESTRELLA, M.; DIEKEMA, D. J.; FOTHERGILL, A.; FULLER, J.; GHANNOUM, M.; JONES, R. N.; LOCKHART, S. R.; MARTIN-MAZUELOS, E.; MELHEM, M. S.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PAPPAS, P.; PELAEZ, T.; PEMA, J.; REX, J.; SZESZS, M. W. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B, flucytosine, and itraconazole and *Candida* spp. as determined by CLSI broth microdilution. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 2040-2046, 2012a.

PFALLER, M. A.; WOOSLEY, L. N.; MESSER, S. A.; JONES, R. N.; CASTANHEIRA, M. Significance of molecular identification and antifungal susceptibility of clinically significant yeasts and moulds in a global antifungal surveillance programme. **Mycopathologia**, v. 174, n. 4, p. 259-271, 2012b.

POIKONEN, E.; LYYTIKÄINEN, O.; ANTTILA, V. J.; KOIVULA, I.; LUMIO, J.; KOTILAINEN, P.; SYRJÄLÄ, H.; RUUTU, P. Secular trend in candidemia and the use of fluconazole in Finland, 2004-2007. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, n. 312, p. 1-7, 2010.

RIBEIRO, E. L.; GUIMARÃES, R. I.; INÁCIO, M. C. C.; FERREIRA, W. M.; CARDOSO, C. G.; DIAS, S. M. S.; NAVES, P. L. F. Aspectos das Leveduras de *Candida* Vinculadas as Infecções Nosocomiais. **NewsLab**, 64 ed., p. 106-128, 2004.

RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; ARENDRUP, M. C.; CUENCA-ESTRELLA, M.; DONNELLY, J. P.; LASS-FLORL, C. EUCAST breakpoints for antifungals. **Drug News & Perspectives**, v. 23, n. 2, p. 93-97, 2010.

SAUNTE, D. M.; KLINGSPOR, L.; JALAL, S.; ARNAU, J.; ARENDRUP, M. C. Four cases of *Candida albicans* infections with isolates developing Pink colonies on CHROMagar *Candida* plates. **Mycoses**, v. 48, n. 6, p. 378-381, 2005.

- SCHMALRECK, A. F.; WILLINGER, B.; HAASE, G.; BLUM, G.; LASS-FLÖRL, C.; FEGELER, W.; BECKER, K. Antifungal Susceptibility Testing-AFST Study Group. Species and susceptibility distribution of 1062 clinical yeast isolates to azoles, echinocandins, flucytosine and amphotericin B from a multi-centre study. **Mycoses**, v. 55, n. 3, p. e124-e137, 2012.
- SELLAMI, A.; SELLAMI, H.; NÉJI, S.; MAKNI, F.; ABBES, S.; CHEIKHROUHOU, F.; CHELLY, H.; BOUAZIZ, M.; HAMMAMI, B.; BEN JEMAA, M.; KHALED, S.; AYADI, A. Antifungal Susceptibility of Bloodstream *Candida* Isolates in Sfax Hospital: Tunisia. **Mycopathologia**, v. 171, n. 6, p. 417-422, 2011.
- SPILIOPOULOU, A.; VAMVAKOPOULOU, S.; BARTZAVALI, C.; DIMITRACOPOULOS, G.; ANASTASSIOU, E. D.; CHRISTOFIDOU, M. Eleven-year retrospective survey of candidaemia in a university hospital in southwestern Greece. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 9, p. 1378-1381, 2010.
- SUBCOMMITTEE ON ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY TESTING (AFST) OF THE ESCMID EUROPEAN COMMITTEE FOR ANTIMICROBIAL FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (EUCAST). EUCAST Definitive Document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 4, p. 398-405, 2008.
- TAVANTI, A.; DAVIDSON, A. D.; GOW, N. A. R.; MAIDEN, M. C. J.; ODDS, F. C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* Groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 284-292, 2005.
- TORTORANO, A. M.; KIBBLER, C.; PEMAN, J.; BERNHARDT, H.; KLINGSPOR, L.; GRILLOT, R. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. 5, p. 359-366, 2006.
- TRAGIANNIDIS, A.; FEGELER, W.; RELLENSMANN, G.; DEBUS, V.; MÜLLER, V.; HOERNIG-FRANZ, I.; SIAM, K.; PANA, Z. D.; JÜRGENS, H.; GROLL, A. H. Candidaemia in a European Pediatric University Hospital: a 10-year observational study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 2, p. E27-E30, 2012.
- TRICK, W. E.; FRIDKIN, S. K.; EDWARDS, J. R.; HAJJEN, R. A.; GAYNES, R. P.; Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. **Clinical and Infectious Diseases**, v. 35, n. 5, p. 627-630, 2002.
- WARNOCK, D. W. Trends in the Epidemiology of Invasive Fungal Infections. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v. 48, n. 1, p. 1-12, 2007.
- WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S. M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R. P.; EDMOND, M. B. Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals: Analysis of 24,179 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 3, p. 309-317, 2004.
- XIAO, L.; MADISON, V.; CHAU, A. S.; LOEBENBERG, D.; PALERMO, R. E.; MCNICHOLAS, P. M. Three-Dimensional Models of Wild-Type and Mutated Forms of Cytochrome P450 14 alpha-Sterol Demethylases from *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* Provide Insights into Posaconazole Binding. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 2, p. 568-574, 2004.

PARTE II

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO FLAVONOIDE BAICALEÍNA CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE *Candida parapsilosis* STRICTO SENSO

1 INTRODUÇÃO

As leveduras do gênero *Candida* têm grande importância pela alta frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano. A convivência entre levedura e hospedeiro ocorre durante toda a vida (revisado por RIBEIRO et al., 2004), no entanto, estes micro-organismos comensais podem se tornar patogênicos caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro.

A relevância das infecções fúngicas por *Candida* em ambiente hospitalar passou a ganhar importância a partir da década de 80. Em países como os Estados Unidos e Taiwan o gênero *Candida* foi relatado como o quarto patógeno mais frequentemente encontrado em amostras sanguíneas (WISPLINGHOFF et al., 2004; CHEN et al., 2010). Estudo brasileiro recente apontou *Candida spp.* como o sétimo micro-organismo mais prevalente em pacientes que apresentavam infecção sanguínea, porém as taxas de morte foram as mais elevadas, sendo de até 85,9% em pacientes de UTI (Unidade de Terapia Intensiva) (MARRA et al., 2011).

Entre as espécies do gênero *Candida*, no geral, *C. albicans* tem sido a mais associada a infecções, entretanto nos últimos anos, vem aumentando o número de infecções invasivas causadas por espécies de *Candida* não-*albicans* em diversas partes do mundo (COLOMBO et al., 2007; CHANG et al., 2008; HINRICHSEN et al., 2009; POIKONEM et al., 2010; DIEKEMA et al., 2012). O aumento na incidência pode ser atribuído a um aperfeiçoamento nos métodos de identificação, mas também pode ser um reflexo dos maiores níveis de resistência, exibido por algumas espécies de *Candida* não-*albicans* (SILVA et al., 2012).

Enquanto na América do Norte ocorre o predomínio de *C. glabrata* entre as espécies de *Candida* não-*albicans*, na América do Sul, particularmente no Brasil, observa-se o predomínio de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (AQUINO et al., 2005; COLOMBO et al., 2006;

NUCCI; COLOMBO, 2007; FRANÇA et al., 2008; FURLANETO et al., 2011; BONFIETTI et al., 2012).

Em 2005, foi revista a classificação do complexo *C. parapsilosis*, sendo proposto duas novas espécies para substituir as espécies anteriormente designadas como *C. parapsilosis* grupo II e III. Desde então são caracterizadas três espécies do complexo: *C. parapsilosis* stricto sensu, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* (TAVANTI et al., 2005).

A espécie *C. parapsilosis* tem sido relatada com maior frequência em crianças e recém-nascidos prematuros (MATSUMOTO et al., 2001; ALMIRANTE et al., 2006). No Brasil, *C. parapsilosis* é responsável por 20-30% dos episódios de candidemia, com prevalência similar entre populações adulta e pediátrica (BRITO et al., 2006). Caracteristicamente, *C. parapsilosis* tem uma elevada afinidade pela nutrição parenteral, tem grande capacidade de produzir biofilme em superfícies proteicas e cateteres venosos centrais e frequentemente coloniza as mãos de profissionais da saúde (revisado por COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; CLARCK et al., 2004; revisado por TROFA et al., 2008).

O aumento na disponibilidade de diferentes tipos de antifúngicos tem levado ao aumento no uso dos mesmos, levando a pressão seletiva e resistência emergente (RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2010). Recentemente, alguns autores ao adotar os novos pontos de corte clínico definidos por Pfaller e colaboradores (2010), têm demonstrado um aumento da resistência em espécies de *C. parapsilosis* frente ao fluconazol (CANTÓN et al., 2011; PEMÁN et al., 2012). Também vem sendo demonstrado menor suscetibilidade de *C. parapsilosis*, frente a mais nova classe de antifúngicos, as equinocandinas (PFALLER et al., 2008; SILVA et al., 2009).

Resistência aos antimicrobianos tem se tornado um problema global, surgindo à necessidade de busca de drogas antifúngicas eficazes. Neste contexto, destacam-se substâncias naturais, de origem vegetal, que têm sido fonte particularmente rica de compostos com atividade antimicrobiana (revisado por CUSHNIE; LAMB, 2005).

Scutellaria baicalensis é uma erva medicinal chinesa, amplamente utilizada na medicina oriental tradicional e moderna. São várias as potenciais atividades dos extratos e flavonas obtidos de *S. baicalensis*, incluindo atividade anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana, antiviral e antitumoral (revisado por BLACH-OLSZEWSKA et al., 2008).

O flavonoide baicaleína é relatado como o responsável pelo efeito antimicrobiano de *S. baicalensis* (revisado por HU et al., 2005; CUSHNIE; LAMB, 2005). A baicaleína tem sido considerada como alternativa promissora na inibição de diversos micro-

organismos, incluindo espécies de *Candida* (DAI et al., 2009; KANG et al., 2010; SERPA et al., 2012).

A combinação de baicaleína com antifúngicos comumente utilizados, atuando em sinergismo também vem sendo estudada com sucesso na inibição de *C. albicans* (HUANG et al., 2008; FU et al., 2010). No entanto, ainda são poucos os trabalhos relacionados à investigação do potencial antifúngico e sinérgico da baicaleína contra *C. parapsilosis*, incluindo trabalho recente desenvolvido pelo nosso grupo, onde foram testados isolados clínicos e de referência (SERPA et al., 2012).

1.1 OBJETIVOS

- Avaliar o potencial antifúngico do flavonoide baicaleína sobre isolados clínicos de *C. parapsilosis* sensíveis e resistentes ao fluconazol;
- avaliar o potencial sinérgico de baicaleína com fluconazol, sobre isolados de *C. parapsilosis* sensíveis e resistentes ao fluconazol;
- avaliar interferência da baicaleína na viabilidade celular.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS BIOLÓGICOS

Um total de 15 isolados clínicos sanguíneos de *C. parapsilosis* foi analisado neste estudo. Dentre os isolados, 09 são sensíveis ao fluconazol e 06 são resistentes. Os isolados foram armazenados em meio Sabouraud com glicerol 25% a -20°C e depositados junto à coleção de isolados de *Candida spp.* do Laboratório de Fisiologia e Biologia Molecular de Fungos da Universidade Estadual de Londrina. O isolado do American Type Culture Collection (ATCC), *C. parapsilosis* 22019 foi incluído em todos os testes de suscetibilidade.

A identificação dos isolados do complexo *C. parapsilosis* foi realizada empregando-se a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). O DNA genômico utilizado na PCR foi obtido como descrito anteriormente por Furlaneto-Maia e colaboradores (2008).

As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de PCR espécie específicos podem ser vistos na Tabela 1. As condições ótimas para execução da PCR foi realizado conforme descrito por Furlaneto e colaboradores (2011).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na identificação de *Candida parapsilosis*.

Espécie	Sequência (5' - 3') ^a	Tamanho do amplicon (pb) ^b	Fonte
Complexo <i>C. parapsilosis</i> Oligonucleotídeo universal reverso (ITS4)	GGC GGA GTA TAA ACT AAT GGA TAG TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	126	(LI <i>et al.</i> , 2003)
<i>C. parapsilosis</i> stricto sensu	F - AGA CTT GGG TAT TAC GTT GT R - CAG GAG TCA TGA TTA CCC	727	(TAVANTI <i>et al.</i> , 2005)

^a F: oligonucleotídeo iniciador “forward”; R: oligonucleotídeo iniciador reverso;

^b pb: pares de base.

2.2 TESTE DE SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA

A determinação da Concentração Inibitória Mínima dos isolados de *C. parapsilosis* frente ao fluconazol (Sigma-Aldrich®) e baicaleína (Sigma-Aldrich®) foi realizada pela metodologia de Microdiluição em Caldo, proposta pelo Antifungal

Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (AFST-EUCAST, 2008). As soluções estoque tanto do flavonoide quanto do antifúngico sintético foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO), com concentrações 200 vezes superior a de maior concentração relativa à série de diluições usada no teste (AFST-EUCAST, 2008). Os estoques foram armazenados em freezer -80°C até o momento do preparo das placas de microdiluição.

Para o preparo das diluições em série dos antifúngicos foi utilizado o meio sintético RPMI 1640, suplementado com glutamina sem bicarbonato e sem a adição de vermelho de fenol. A concentração original de 0,2% de glicose foi alterada para 2%. O meio foi tamponado com ácido 3-(N-morfolino) propano sulfônico (MOPS) em concentração final de 0,165 mol/L (EUCAST, 2008). O pH do meio foi ajustado para 7,0 com NaOH 1 M e em seguida foi esterilizado por meio de filtração em membrana 0.2 μm e armazenados a 4°C . As diluições resultantes, das drogas, foram distribuídas nas microplacas de 96 poços e então armazenadas em freezer -80°C . As concentrações das drogas utilizadas foram de 0,125-64 $\mu\text{g/mL}$ para o fluconazol e de 0,5-256 $\mu\text{g/mL}$ para a baicaleína. A concentração final do diluente DMSO compreendeu $<1\%$ do total do volume testado.

Cada isolado testado foi cultivado, a partir das soluções-estoque, em Sabouraud dextrose ágar, por 24h a 37°C . Após, células dos cultivos foram diluídas em solução salina a 0,85% (p/v) e contadas com auxílio da Câmara de Neubauer. Posteriormente foi realizada nova diluição em H_2O ajustando a concentração celular para $2,5 \times 10^5$ UFC/mL. Os experimentos foram realizados em triplicata e as médias da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram calculadas. Os valores de CIM₅₀, menores concentrações da droga capaz de inibir 50% do crescimento fúngico foram considerados. O CIM₈₀ também foi utilizado, sendo considerado como a menor concentração da droga que inibe 80% do crescimento fúngico com relação ao controle positivo. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 450nm.

2.3 AVALIAÇÃO DA COMBINAÇÃO ENTRE A BAICALEÍNA E O FLUCONAZOL

O método utilizado na avaliação da ação conjunta de fluconazol e baicaleína sobre os isolados clínicos e ATCC 22019 foi baseado no teste do “chequerboard” (tabuleiro de xadrez) segundo a metodologia de microdiluição em caldo, proposta pelo EUCAST (AFST-EUCAST, 2008).

As diluições dos antifúngicos foram realizadas em RPMI 1640, conforme descrito no item 2.2. As drogas foram preparadas em concentração 4 vezes superior a concentração final e então as microplacas de 96 poços foram preparadas. Um total de 50 µl de cada concentração de baicaleína foi adicionado nas linhas de A-H e as concentrações do fluconazol foram distribuídas nas colunas de 2 a 11. A coluna 1 da microplaca se referia ao controle de esterilidade onde foi adicionados 100 µl do meio de cultura com 100 µl de H₂O. A coluna 12 era referente ao controle de crescimento que continha apenas meio de cultura com a adição do inóculo.

As concentrações finais das drogas após a adição de 100 µl de inóculo ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL) foram de 16 µg/mL - 0,031 µg/mL para o fluconazol e de 16 µg/mL - 0,125 µg/mL para a baicaleína. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e as leituras espectrofotométricas foram realizadas a 450nm. Os experimentos foram realizados em duplicata, sendo repetido três vezes em testes independentes e as médias da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram calculadas. Utilizamos o CIM₅₀ e CIM₈₀, o primeiro foi determinado como sendo a menor concentração da droga capaz de inibir 50% do crescimento fúngico detectável pelas técnicas de leitura e o último como a menor concentração da droga que inibe 80% do crescimento fúngico com relação ao controle positivo.

A interpretação da interação dos compostos foi baseada no índice FICI (*Fractional Inhibitory Concentration Index*) que foi calculado segundo a fórmula $FICI = (Ac/Ai) + (Bc/Bi)$, onde Ac e Bc correspondem aos CIMs das drogas A e B em combinação e Ai e Bi se refere aos CIMs das drogas A e B testadas isoladamente. A interação dos compostos foi definida como: sinergismo ($FICI \leq 0.5$), sinergismo parcial ($FICI > 0.5 - 1.0$), aditivo ($FICI = 1$), indiferente ($FICI > 1.0 - 4.0$) ou antagonismo ($FICI \geq 4.0$) (ELIOPOULOS; MOELLERING, 1996).

2.4 VIABILIDADE CELULAR

Os testes para análise de viabilidade celular foram baseados nos testes de tempo de morte (GUO et al., 2010). O teste foi realizado com o isolado 65.10 (fluconazol-sensível) e o isolado 357.10 (fluconazol-resistente). Os isolados foram preparados em inóculo inicial de 10^5 UFC/mL em frascos contendo 5 mL de meio RPMI 1640.

As concentrações de baicaleína usadas para o isolado 65.10 foram de 4 µg/mL e 16 µg/mL, que correspondem respectivamente ao CIM₅₀ e CIM₈₀ definido pelo teste

de microdiluição em caldo. Com relação ao isolado 357.10 foram usadas as concentrações de $8\mu\text{g/mL}$ e $32\mu\text{g/mL}$, também referentes ao CIM_{50} e CIM_{80} encontrados no teste de microdiluição em caldo. A concentração final do diluente DMSO compreendeu $<1\%$ do total do volume testado. Aos frascos contendo as diferentes concentrações de baicaleína, assim como, o frasco correspondente ao controle (sem o flavonoide), foi adicionado inóculo inicial de 10^5 UFC/mL e foram incubadas a 37°C em agitação de 180rpm. Nos tempos de 12, 24, 36 e 48 horas após a incubação, uma alíquota de $100\mu\text{L}$ de cada cultivo foi submetida a diluição seriada (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}). Subsequentemente, $100\mu\text{L}$ de cada diluição foram plaqueadas em placas de petri contendo meio Sabouraud Agar. A contagem das colônias foi realizada após incubação a 37°C por 48 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.5 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Todos os dados foram expressos por meio de média de valores. As variáveis contínuas foram comparadas pelo Teste Tukey. O valor de $p<0,05$ foi considerado significativo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

As atividades antifúngicas do fluconazol e da baicaleína sobre isolados clínicos de *C. parapsilosis* podem ser vistos na Tabela 2. A linhagem ATCC 22019 foi incluída como controle dos ensaios. Do total de isolados clínicos analisados, 09 eram suscetíveis ao fluconazol, os quais apresentaram valores de CIM₅₀ de 0,5 a 2 µg/mL, para este antifúngico. Já os 6 isolados resistentes ao fluconazol (CIM₅₀ > 4) (RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2010) apresentaram valores de CIM₅₀ de 8 a 16 µg/mL.

Quanto aos CIMs referentes ao flavonoide baicaleína, os valores de CIM₅₀, assim como, de CIM₈₀ foram avaliados. Os resultados mostraram que todos os 6 isolados classificados como resistentes ao fluconazol, apresentaram valores de CIM₅₀ de 8 µg/mL para a baicaleína. Já entre os isolados classificados como sensíveis ao fluconazol, houve variações nos valores de CIM₅₀ de 4-8 µg/mL, sendo que, a maioria (66,67%) apresentou CIM₅₀ de 4 µg/mL.

Já com relação ao CIM₈₀, para baicaleína, foi observada uma variação de 8-32 µg/mL e de 16-32 µg/mL para os isolados sensíveis e resistentes ao fluconazol, respectivamente. Esses resultados mostram que a baicaleína, de forma isolada, apresenta atividade antifúngica contra isolados de *C. parapsilosis*, tanto àqueles sensíveis como aos resistentes ao fluconazol. Huang e colaboradores (2008), ao analisar o efeito da baicaleína sobre isolados de *C. albicans* resistentes ao fluconazol, obtiveram valores médios de CIM₈₀ de 128 µg/mL. Diferentemente, Fu et al. (2011) encontraram CIM's entre 2 e 32 µg/mL para isolados de *C. albicans*, também resistentes ao fluconazol. O primeiro trabalho em que foi avaliado a ação da baicaleína sobre uma espécie de *Candida* não-*albicans* (*C. krusei*) relatou valores de CIM₈₀ de 2,7 µg/mL, demonstrando maior suscetibilidade desta espécie (KANG et al., 2010), em relação a *C. albicans*. Segundo os autores, a baicaleína parece apresentar mecanismos de ação diferenciados entre as espécies do gênero *Candida*.

Os baixos CIM's obtidos no teste de suscetibilidade sugerem que o flavonoide baicaleína apresenta uma ação antifúngica contra os isolados de *C. parapsilosis*, resistentes e sensíveis ao fluconazol. Em *C. albicans* foi relatada inibição em bombas de efluxo, relacionadas à resistência, quando as mesmas foram crescidas em presença de baicaleína (Huang et al., 2008). Posteriormente, Dai e colaboradores (2009) demonstraram que o tratamento com baicaleína induziu a apoptose em *C. albicans*.

3.2 AÇÃO ANTIFÚNGICA DA BAICALEÍNA EM COMBINAÇÃO COM FLUCONAZOL

Os valores da Concentração Inibitória Mínima resultante da combinação da baicaleína com o fluconazol podem ser vistos na Tabela 2. De acordo com o índice FICI (Fractional Inhibitory Concentration Index) a ação conjunta de fluconazol e baicaleína, contra *C. parapsilosis*, em termos de CIM₅₀, foi indiferente com relação à ação individual de cada droga, para a maioria dos isolados (68,75%). Sinergismo parcial ocorreu em dois isolados 551.10 e 275.10, sendo estes, sensível e resistente ao fluconazol, respectivamente. Já em termos de CIM₈₀, sinergismo parcial ocorreu em 43,75% dos isolados incluindo a linhagem ATCC 22019. Antagonismo não foi observado para nenhum isolado em ambos CIM's analisados.

Tabela 2 – Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do fluconazol e baicaleína (de forma isolada e em combinação) contra 15 isolados clínicos de *Candida parapsilosis* e a cepa de referência 22019.

¶	CIM-50					CIM-80					
	Isolado		Em combinação			¶	Isolado		Em combinação		
	FLC µg/ml	BE µg/ml	FLC µg/ml	BE µg/ml	FLC µg/ml		BE µg/ml	FLC µg/ml	BE µg/ml	¶	
	CIM	CIM	CIM	CIM	FICI	CIM	CIM	CIM	CIM	FICI	
Isolados clínicos de <i>Candida parapsilosis</i> FLC-S											
44.10	1	4	0,5	2	1 ^b	2	16	1	2	0,625 ^d	
65.10	0,5	4	0,5	2	1,25 ^c	1	16	0,5	2	0,625 ^d	
288.10	1	8	2	4	2,5 ^c	4	16	4	1	1,06 ^c	
471.10	0,5	4	0,5	2	1,5 ^c	1	16	1	4	1,25 ^c	
551.10	0,5	8	0,25	0,25	0,53 ^d	2	16	1	2	0,625 ^d	
122.11	2	8	2	8	2 ^c	8	32	4	8	0,75 ^d	
230.11	0,5	4	0,5	2	1,5 ^c	1	8	1	2	1,25 ^c	
255.11	0,5	4	0,5	1	1,25 ^c	0,5	8	1	1	2,125 ^c	
450.11	1	4	1	0,5	1,125 ^c	1	16	1	0,5	1,03 ^c	
Isolados clínicos de <i>Candida parapsilosis</i> FLC-R											
262.10	16	8	4	8	1,25 ^c	32	32	8	8	0,5 ^e	
275.10	8	8	4	2	0,75 ^d	16	16	4	8	0,75 ^d	
357.10	8	8	1	0,5	0,187 ^e	32	32	1	8	0,28 ^e	
390.10	8	8	8	8	2 ^d	16	16	16	8	1,5 ^c	
117.11	8	8	4	4	1 ^b	16	16	4	8	0,75 ^d	
185.11	16	8	4	8	1,25 ^c	32	16	16	8	1 ^b	
ATCC-22019	1	8	1	2	1,25 ^c	2	16	1	0,5	0,53 ^d	

^a FLC-S - Isolados sensíveis ao fluconazol (CIM ≤ 2); FLC-R - Isolados resistentes ao fluconazol (CIM > 4). Os valores de resistência são baseados no CIM₅₀. FICI-(Fractional Inhibitory Concentration Index) ^b Aditivo (FICI=1), ^c Indiferente (FICI >1.0 - 4.0), ^d Sinergismo parcial (FICI >0.5-1.0), ^e Sinergismo (FICI ≤ 0.5).

O uso combinado de fluconazol e baicaleína não resultou em ação sinérgica contra isolados de *C. parapsilosis* sensíveis ao fluconazol, porém entre os isolados resistentes, foi observado sinergismo em 1 isolado em termos de CIM₅₀ (357.10). Neste caso o CIM₅₀ para o fluconazol passou de 8 µg/mL (resistente) para 1 µg/mL (sensível). Já em termos de CIM₈₀ sinergismo foi observado para 2 isolados (262.10 e 357.10). Houve redução de 4 vezes na concentração de ambas substâncias para o primeiro isolado e de até 32 vezes para o último. Sinergismo entre o antifúngico fluconazol e o flavonoide baicaleína também foram observados por Huang et al. (2008) para espécie de *C. albicans*. Trabalho anterior realizado por nosso grupo, ao estudar a combinação entre fluconazol e baicaleína em isolados de *Candida* não-*albicans* verificou a presença de sinergismo para um isolado clínico de *C. parapsilosis* (SERPA et al., 2012).

A ocorrência ou não de sinergismo em isolados resistentes de uma mesma espécie, sugere possíveis mecanismos de resistência distintos entre os isolados testados. Se relacionarmos nossos dados aos resultados encontrados por Huang e colaboradores (2008), em que a baicaleína parece ser responsável por inibir bombas de efluxo relacionadas à resistência, poderíamos sugerir que o mecanismo de resistência presente nos isolados (262.10 e 357.10) possa também estar relacionado à presença de bombas de efluxo.

As baixas concentrações de baicaleína encontradas, frente aos isolados, mostram potencial promissor do flavonoide como agente antifúngico. Estudos futuros são necessários para determinar o mecanismo de ação da baicaleína e assim elucidar a ação do mesmo como agente antifúngico tanto de forma isolada como em combinação.

3.3 VIABILIDADE CELULAR FRENTE AO FLAVONOIDE BAICALEÍNA

A exposição dos isolados 65.10 (sensível ao fluconazol) e 357.10 (resistente ao fluconazol) a baicaleína em concentrações referentes aos valores de CIM₅₀ e CIM₈₀ de cada isolado e a correspondente viabilidade celular obtida em diferentes tempos pode ser vista na Tabela 3. No primeiro tempo analisado (12 horas) já houve queda na viabilidade celular com relação ao controle para ambos isolados ($p < 0,05$). Para o isolado fluconazol-sensível (65.10) os melhores resultados foram obtidos em 24 horas, já para o isolado resistente (357.10) os melhores resultados foram observados em 24 horas e manteve-se em 36 horas. O aumento na porcentagem de células viáveis a partir dos tempos de 36 horas para o isolado 65.10 e de 48 horas para o isolado 357.10 deve estar relacionada à redução na disponibilidade do flavonoide nos tempos finais ou até mesmo na possível alteração do pH do meio.

Tabela 3 – Concentração Inibitória Mínima da baicaleína contra *C. parapsilosis* (resistente e sensível ao fluconazol) e o efeito na viabilidade celular.

Tempo	Viabilidade celular (% de UFC)			
	Isolado 357.10		Isolado 65.10	
	8 µg/ml	32 µg/ml	4 µg/ml	16 µg/ml
12h	56,98*	31,02*	83,41*	45,13*
24h	37,58*	16,32*	51,85*	35,55*
36h	37,03*	15,74*	90,85	72,63*
48h	73,67	38,7*	90,39	77,92

* p < 0,05 quando comparado ao respectivo controle.

De um modo geral, a baicaleína teve maior ação sobre o isolado 357.10 tanto nas concentrações referentes ao CIM₅₀ quanto para as referentes ao CIM₈₀. Ao compararmos as concentrações de 8 µg/mL (CIM₅₀) do isolado 357.10 com a concentração de 16 µg/mL (CIM₈₀) do isolado 65.10, podemos notar semelhanças de viabilidade nos tempos de 12, 24 e 48 horas, porém em 36 horas o flavonoide se mostrou mais eficiente para o isolado resistente (357.10) mesmo frente a uma concentração menor da droga. Guo e colaboradores (2010) ao comparar a ação do composto natural ácido pseudolárico B sobre isolados de *C. albicans*, sensíveis e resistentes ao fluconazol, verificou que o tratamento foi mais efetivo no isolado resistente. No presente estudo, para o isolado resistente (357.10), as concentrações referentes ao CIM₈₀, com relação às concentrações referentes ao CIM₅₀, foram mais eficientes (p<0,05) na queda da viabilidade celular em todos os tempos testados. Porém para o isolado 65.10 a queda significativa da viabilidade celular, com relação a maior concentração do flavonoide, ocorreu apenas no tempo de 12 horas.

Os dados obtidos sugerem que o flavonoide baicaleína apresenta atividade antifúngica contra isolados de *C. parapsilosis* independente dos mesmos apresentarem resistência ao fluconazol. Os resultados de viabilidade celular demonstraram uma melhor ação do flavonoide contra o isolado FLC-resistente, sugerindo, desta maneira, um mecanismo de ação diferente entre os dois compostos.

4 CONCLUSÕES

- Os dados obtidos reforçam a importância do aumento de *Candida* não-*albicans* no Brasil e nos alertam para a atenção que deve ser dada aos estudos, não apenas em âmbito regional, mas também em âmbito institucional. Perfis epidemiológicos diferentes, em uma mesma região são encontrados e podem desorientar supostos tratamentos empíricos;
- No geral, resistência a anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol entre isolados sanguíneos de *Candida* de instituições brasileiras ainda é incomum. Entre os antifúngicos analisados, itraconazol apresentou os melhores resultados. Embora não tenha sido relatada resistência entre os isolados de *C. glabrata* e *C. krusei*, especial atenção é necessária na escolha do tratamento, devido os altos CIM's encontrados;
- Os dados de suscetibilidade fúngica e viabilidade celular mostram potencial promissor da baicaleína como agente antifúngico, independente dos isolados apresentarem resistência ao fluconazol;
- Com relação, ainda, aos testes de viabilidade celular os resultados obtidos indicam uma melhor ação do flavonoide baicaleína contra isolado FLC-resistente, sugerindo, desta maneira, um mecanismo de ação diferente entre os dois compostos.

REFERÊNCIAS

- ALMIRANTE, B.; RODRÍGUEZ, D.; CUENCA-ESTRELLA, M.; ALMELA, M.; SANCHEZ, F.; AYATS, J.; ALONSO-TORRES, C.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; PAHISSA, A. Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1681-1685, 2006.
- AQUINO, V. R.; LUNARDI, L. W.; GOLDANI, L. Z.; BARTH, A. L. Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in Southern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 5, p. 411-418, 2005.
- BLACH-OLSZEWSKA, Z.; LAMER-ZARAWSKA, E. Come back to root – therapeutic activities of *Scutellaria baicalensis* root in aspect of innate immunity regulation – Part I. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 17, n. 3, p. 337-345, 2008.
- BONFIETTI, L. X.; SZESZS, M. W.; CHANG, M. R.; MARTINS, M. A.; PUKINSKAS, S. R. B. S.; NUNES, M. O.; PEREIRA, G. H.; PANIAGO, A. M. M.; PURISCO, S. U.; MELHEM, M. S. C. Ten-year study of species distribution and antifungal susceptibilities of *Candida* bloodstream isolates at a Brazilian tertiary hospital, **Mycopathologia**, [Epub ahead of print], 2012.
- BRITO, L. R.; GUIMARÃES, T.; NUCCI, M.; ROSAS, R. C.; ALMEIDA, L. P.; MATTA, D. A.; COLOMBO, A. L. Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *Candida parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. **Medical Mycology**, v. 44, n. 3, p. 261-266, 2006.
- CANTÓN, E.; PEMÁN, J.; QUINDÓS, G.; ERASO, E.; MIRANDA-ZAPICO, I.; ÁLVAREZ, M.; MERINO, P.; CAMPOS-HERRERO, I.; MARCO, F.; DE LA PEDROSA, E. G. G.; YAGÜE, G.; GUNA, R.; RUBIO, C.; MIRANDA, C.; PAZOS, C.; VELASCO, D. Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 12, p. 5590-5596, 2011.
- CHANG, M. R.; CORREIA, F. P.; COSTA, L. C.; XAVIER, P. C.; PALHARES, D. B.; TAIRA, D. L.; PANIAGO, A. M. M.; PONTES, E. R. J.; MACHADO, V. E. *Candida* bloodstream infection: data from a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 50, n. 5, p. 265-268, 2008.
- CLARK, T. A.; SLAVINSKI, S. A.; MORGAN, J.; LOTT, T.; ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; BRANDT, M. E.; WEBB, R. M.; CURRIER, M.; FLOWERS, R. H.; FRIDKIN, S. K.; HAJJEH, R. A. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4468-4472, 2004.
- COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON SKAGGES, B.; MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816-2823, 2006.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L. R. B. F.; MONFARDINI, L. P. A.; CUNHA, A. K. B.; RADY, P.; ALVES, T.; ROSAS, R. C. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 28, n. 5, p. 570-576, 2007.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **Antimicrobial Agents**, v. 26, n. 5, p. 343-356, 2005.

DAI, B.; CAO, Y. Y.; HUANG, S.; XU, Y.; GAO, P.; WANG, Y.; JIANG, Y. Baicalein induces programmed cell death in *Candida albicans*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 8, p. 803-809, 2009.

DIEKEMA, D.; ARBEFEVILLE, S.; BOYKEN, L.; KROEGER, J.; PFALLER, M. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 1, p. 45-48, 2012.

ELIOPOULOS, G. M.; MOELLERING JR, R. C. Antimicrobial combinations. In: LORIAN, V. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 4. ed., Baltimore, MD, USA: Williams & Wilkins Co, 1996, p. 330-96.

FRANÇA, J. C. B.; RIBEIRO, C. E. L.; QUEIROZ-TELLES, F. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 1, p. 23-28, 2008.

FU, Z.; LU, H.; ZHU, Z. Y.; YAN, L.; JIANG, Y. Y.; CAO, Y. Y. Combination of baicalein and amphotericin B accelerates *Candida albicans* apoptosis. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 2, p. 214-218, 2011.

FURLANETO, M. C.; ROTA, J. F.; QUESADA, R. M. B.; FURLANETO-MAIA, L.; RODRIGUES, R.; ODA, S.; OLIVEIRA, M. T.; SERPA, R.; FRANÇA, E. J. G. Species distribution and *in vitro* fluconazole susceptibility of clinical *Candida* isolates in a Brazilian tertiary-care hospital over a 3-year period. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 595-599, 2011.

HINRICHSEN, S. L.; FALCÃO, E.; VILELLA, T. A. S.; RÊGO, L.; LIRA, C.; ALMEIDA, L.; MARTINS, M.; ARAÚJO, C.; DUARTE, M.; LOPES, G. *Candida* isolates in tertiary hospitals in Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 325-328, 2009.

HU, Z.; YANG, X.; HO, P. C. L.; CHAN, S. Y.; HENG, P. W. S.; CHAN, E.; DUAN, W.; KOH, H. L.; ZHOU, S. Herb-drug interactions. **Drugs**, v. 65, n. 9, p. 1239-1282, 2005.

- HUANG, S.; CAO, Y. Y.; DAI, B. D.; SUN, X. R.; ZHU, Z. Y.; CAO, Y. B.; WANG, Y.; GAO, P. H.; JIANG, Y. Y. In vitro synergism of fluconazole and baicalein against clinical isolates of *Candida albicans* resistant to fluconazole. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 12, p. 2234-2236, 2008.
- GUO, N.; LING, G.; LIANG, X.; JIN, J.; FAN, J.; QIU, J.; SONG, Y.; HUANG, N.; WU, X.; WANG, X.; DENG, X.; DENG, X.; YU, L. In vitro synergy of pseudolaric acid B and fluconazole against clinical isolates of *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 54, n. 5, p. e400-e406, 2010.
- KANG, K.; FONG, W.; TSANG, P. W. Antifungal activity of baicalein against *Candida krusei* does not involve apoptosis. **Mycopathologia**, v. 170, n. 6, p. 391-396, 2010.
- LI, Y. L.; LEAW, S. N.; CHEN, J. H.; CHANG, H. C.; CHANG, T. C. Rapid identification of yeasts commonly found in positive blood cultures by amplification of the internal transcribed spacer regions 1 and 2. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 693-696, 2003.
- MARRA, A. R.; CAMARGO, L. F.; PIGNATARI, A. C.; SUKIENNIK, T.; BEHAR, P. R.; MEDEIROS, E. A.; RIBEIRO, J.; GIRÃO, E.; CORREA, L.; GUERRA, C.; BRITES, C.; PEREIRA, C. A.; CARNEIRO, I.; REIS, M.; DE SOUZA, M. A.; TRANCHESI, R.; BARATA, C. U.; EDMOND, M. B.; THE BRAZILIAN SCOPE STUDY GROUP. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1866-1871, 2011.
- MATSUMOTO, F. E.; GANDRA, R. F.; RUIZ, L. S.; AULER, M. E.; MARQUES, S. A. V.; PIRES, M. F. C.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R. Yeasts isolated from blood and catheter in children from a public hospital of São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v. 154, n. 2, p. 63-69, 2001.
- NUCCI, M.; COLOMBO, A. L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, n. 1, p. 77-82, 2007.
- ODDS, F. C.; BERNAERTS, R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 8, p. 1923-1929, 1994.
- PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; QUINDÓS, G.; ERASO, E.; ALCOBA, J.; GUINEA, J.; MERINO, P.; RUIZ-PÉREZ-DE-PIPAON, M. T.; PÉREZ-DEL-MOLINO, L.; LINARES-SICILIA, M. J.; MARCO, F.; GARCÍA, J.; ROSELLÓ, E. M.; GÓMEZ-G-DE-LA-PEDROSA, E.; BORRELL, N.; PORRAS, A.; YAGÜE, G. Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 5, p. 1181-1187, 2012.
- PFALLER, M. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; KROEGER, J.; MESSER, S. A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D. J. In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 1, p. 150-156, 2008.

- PFALLER, M. A.; ANDES, D.; DIEKEMA, D. J.; ESPINEL-INGROFF, A.; SHEEHAN, D. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. **Drug Resistance Updates**, v. 13, n. 6, p. 180-195, 2010.
- POIKONEN, E.; LYYTIKÄINEN, O.; ANTTILA, V. J.; KOIVULA, I.; LUMIO, J.; KOTILAINEN, P.; SYRJÄLÄ, H.; RUUTU, P. Secular trend in candidemia and the use of fluconazole in Finland, 2004-2007. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, n. 312, p. 1-7, 2010.
- RIBEIRO, E. L.; GUIMARÃES, R. I.; INÁCIO, M. C. C.; FERREIRA, W. M.; CARDOSO, C. G.; DIAS, S. M. S.; NAVES, P. L. F. Aspectos das leveduras de *Candida* vinculadas as infecções nosocomiais. **NewsLab**, 64 ed. p. 106-128, 2004.
- RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; ARENDRUP, M. C.; CUENCA-ESTRELLA, M.; DONNELLY, J. P.; LASS-FLORL, C. EUCAST breakpoints for antifungals. **Drug News & Perspectives**, v. 23, n. 2, p. 93-97, 2010.
- SERPA, R.; FRANÇA, E. J. G.; FURLANETO-MAIA, L.; ANDRADE, C. G. T. J.; DINIZ, A.; FURLANETO, M. C. In vitro antifungal activity of the flavonoid baicalein against *Candida* species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, p. 1704-1708, 2012.
- SILVA, A. P.; MIRANDA, I. M.; LISBOA, C.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A. G. Prevalence, Distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 8, p. 2392-2397, 2009.
- SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 2, p. 288-305, 2012.
- SUBCOMMITTEE ON ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY TESTING (AFST) OF THE ESCMID EUROPEAN COMMITTEE FOR ANTIMICROBIAL FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (EUCAST). EUCAST Definitive Document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 4, p. 398-405, 2008.
- TAVANTI, A.; DAVIDSON, A. D.; GOW, N. A. R.; MAIDEN, M. C. J.; ODDS, F. C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* Groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 284-292, 2005.
- TROFA, D.; GÁCSER, A.; NOSANCHUK, J. D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 4, p. 606-625, 2008.